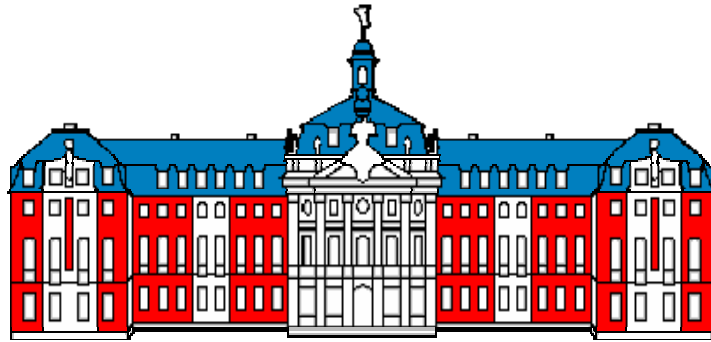


Eva-Maria Schurek

Expression und Funktion des Proteins KIBRA im Podozyten

2007

Biologie



Expression und Funktion des Proteins KIBRA im Podozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Eva-Maria Schurek
aus Berlin

-2007-

Dekan: Prof. Dr. Norbert Sachser

Erster Gutachter: Prof. Dr. Wolf-Michael Weber

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Hermann Pavenstädt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2007

Tag der Promotion: 20.04.2007

MEINER FAMILIE

INHALT

1. EINLEITUNG	1
1.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG : NIERE UND PODOZYTEN	1
1.2 PODOZYTEN UND SCHLITZMEMBRAN	2
1.3 ZELLMIGRATION UND ADHÄSION	5
1.3.1. ZELLMIGRATION	5
1.3.2. EXTRAZELLULÄRE MATRIX	6
1.3.3. AKTINFILAMENTE	6
1.3.4. INTEGRINE	7
1.4 ZELLPOLARITÄT	8
1.5 DAS PROTEIN PATJ	9
1.6 DAS PROTEIN KIBRA	10
1.6.1. DIE DOMÄNENSTRUKTUR VON KIBRA	10
1.6.1.1.WW-DOMÄNEN	11
1.6.1.2.C2-DOMÄNEN	11
1.6.2. BEKANNTE VORDATEN ZU KIBRA	12
1.7 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELE	13
2. MATERIAL	15
2.1 GERÄTE	15
2.2 CHEMIKALIEN UND LABORBEDARF	16
2.3 PUFFER UND LÖSUNGEN	18
2.3.1. <i>HOME MADE</i> ECL	21
2.4 MEDIEN	21
2.4.1. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN.....	21
2.4.1.1.LB-MEDIUM/AGARPLATTEN.....	21
2.4.1.2.SOB-MEDIUM.....	21
2.4.1.3.SOC-MEDIUM.....	22
2.4.1.4.TYM-MEDIUM.....	22
2.4.1.5.TfB1	22
2.4.1.6.TfB2	22
2.4.2. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON HEFEN.....	22
2.4.2.1.YPAD-MEDIUM/AGARPLATTEN.....	22

2.4.2.2.SD-SELEKTIONSMEDIUM/AGARPLATTEN	22
2.4.2.3.3-AT-LÖSUNG.....	23
2.4.3. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG EUKARYOTER ZELLEN	23
2.5 VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS	24
2.6 ENZYME	25
2.7 ANTIKÖRPER.....	26
2.8 BAKTERIEN (<i>ESCHERICHIA COLI</i>).....	27
2.9 HEFEN (<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>).....	27
2.10 EUKARYOTE ZELLEN.....	27
2.11 PLASMIDE UND VEKTOREN	28
2.12 OLIGONUKLEOTIDE	30
2.13 <i>SOFTWARE</i> UND INTERNETPROGRAMME	31

3. METHODEN 32

3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN..... 32

3.1.1. RNA-ISOLIERUNG.....	32
3.1.2. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	32
3.1.3. REVERSE TRANSKRIPTION	32
3.1.4. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	32
3.1.5. RESTRIKTIONSANALYSE	33
3.1.6. DEPHOSPHORYLIERUNG VON VEKTOR-DNA	34
3.1.7. AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	34
3.1.8. AUFREINIGUNG VON DNA-FRAGMENTEN.....	34
3.1.9. LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN.....	34
3.1.10. PLASMIDPRÄPARATION	34
3.1.11. PLASMIDPRÄPARATION MIT STET-PUFFER.....	35

3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN..... 35

3.2.1. PROTEINEXPRESSION UND PROTEINGEWINNUNG IM PROKARYOTEN SYSTEM ...	35
3.2.1.1.GST-PULLDOWN	35
3.2.1.2.HERSTELLUNG REKOMBINANTER GST-FUSIONSPROTEINE	36
3.2.1.3.KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER GST-FUSIONSPROTEINE.....	36
3.2.1.4.DURCHFÜHRUNG DES GST-PULLDOWNS.....	37
3.2.2. PROTEINEXPRESSION UND PROTEINGEWINNUNG IM EUKARYOTEN SYSTEM	37
3.2.3. PROTEINGEWINNUNG AUS ISOLIERTEN RATTENGLOMERULI.....	37

3.2.4. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	38
3.2.5. COOMASSIE-FÄRBUNG VON PROTEINGELEN	39
3.2.6. WESTERN BLOT.....	39
3.2.6.1.IMMUNOLOGISCHE NACHWEISE	39
3.2.7. PHALLOIDIN-FÄRBUNG DES AKTIN-ZYTOSKELETTS.....	39
3.2.8. IMMUNFLUORESCENZ	40
3.3 ZELLBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	41
3.3.1. ANZUCHT, KULTIVIERUNG UND LAGERUNG VON HEFEN, BAKTERIEN UND EUKARYOTEN ZELLEN.....	41
3.3.1.1.HEFEN (<i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>).....	41
3.3.1.2.BAKTERIEN (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)	41
3.3.1.3.KULTIVIERUNG EUKAROYTER ZELLEN	41
3.3.1.4.EINFRIEREN EUKARYOTER ZELLEN	42
3.3.1.5.AUFTAUEN EUKARYOTER ZELLEN.....	42
3.3.2. DAS <i>YEAST TWO-HYBRID</i> SYSTEM.....	42
3.3.2.1.HERSTELLUNG KOMPETENTER HEFEZELLEN	43
3.3.2.2.TRANSFORMATION VON HEFEZELLEN	43
3.3.2.3. β -GALAKTOSIDASE FILTER ASSAY (<i>β-GAL-ASSAY</i>).....	44
3.3.3. TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	44
3.3.3.1.HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIEN	44
3.3.3.2.TRANSFORMATION	45
3.3.4. TRANSFEKTION EUKARYOTER ZELLEN	45
3.3.5. ADHÄSIONSSASSAY.....	45
3.3.6. MIGRATIONSSASSAY	46
3.3.6.1.MIGRATIONSEXPERIMENTE MITTELS VIDEOMIKROSKOPIE	46
3.3.6.2.STATISTISCHE ABSICHERUNG.....	47
3.3.7. <i>WOUND HEALING</i> ASSAY	48
3.4 RNA-INTERFERENZ	48
3.4.1. KLONIERUNG VON <i>SHORT HAIRPIN</i> KONSTRUKTEN	50
3.4.2. HYBRIDISIERUNG SYNTHETISCHER OLIGONUKLEOTIDE	50
3.4.3. PHOSPHORYLIERUNG DER HYBRIDISIERTEN OLIGONUKLEOTIDE	50
3.4.4. ERMITTLUNG DER <i>KNOCK DOWN</i> EFFIZIENZ	51
3.4.5. UMKLONIERUNG DER <i>SHORT HAIRPIN</i> SEQUENZEN IN DAS LENTIVIRALE VEKTORSYSTEM.....	51

3.4.5.1.LENTIVIREN.....	51
3.4.5.2.DAS LENTIVIRALE VEKTORSYSTEM.....	52
3.4.5.3.PRODUKTION LENTIVIRALER TRANSFERVEKTOREN.....	52
3.4.6. TRANSDUKTION EUKARYOTER ZELLEN.....	53
4. ERGEBNISSE	54
4.1 DIE INTERAKTION KIBRA/PATJ.....	54
4.2 DIE INTERAKTION KIBRA/SRA-1.....	63
4.3 KIBRA-ÜBEREXPRESSION UND – <i>KNOCK DOWN</i> KULTIVierter PODOZyTEN.....	67
4.3.1. KIBRA-ÜBEREXPRESSION KULTIVierter MURINER PODOZyTEN.....	67
4.3.2. REDUZIERTE KIBRA-EXPRESSION KULTIVierter HUMANER PODOZyTEN.....	68
4.3.2.1.ERMITTLUNG DER REDUKTIONS- (<i>KNOCK DOWN</i>) EFFIZIENZ VERSCHIEDENER	
<i>SHORT HAIRPINS</i>	68
4.3.2.2.NACHWEIS DES KIBRA <i>KNOCK DOWN</i> IN PODOZyTEN.....	70
4.4 FLUORESCENZFARBSTOFF-MARKIERTE FÄRBUNGEN VON KIBRA <i>KNOCK DOWN</i>	
PODOZyTEN	72
4.4.1. NACHWEIS DES KIBRA <i>KNOCK DOWN</i> MIT EINEM KIBRA SPEZIFISCHEN	
ANTIKÖRPER.....	73
4.4.2. AUSWIRKUNGEN DES KIBRA <i>KNOCK DOWN</i> AUF DAS TUBULIN-ZYTOSKELETT	74
4.4.3. AUSWIRKUNGEN DES KIBRA <i>KNOCK DOWN</i> AUF DAS AKTIN-ZYTOSKELETT ...	75
4.5 ADHÄSIONSASSAY	77
4.6 MIGRATIONSSASSAY.....	78
4.7 <i>WOUND HEALING</i> ASSAY.....	82
4.8 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	86
5. DISKUSSION.....	88
5.1 DIE INTERAKTION KIBRA/PATJ.....	88
5.2 DIE INTERAKTION KIBRA/SRA-1.....	92
5.3 KULTIVIERTE PODOZyTEN MIT FEHLREGULIERTER KIBRA-EXPRESSION.....	94
5.4 DER EINFLUSS EINES KIBRA <i>KNOCK DOWN</i> AUF DAS ZYTOSKELETT	96
5.5 EINFLUSS VON KIBRA AUF DIE ZELLADHÄSION.....	97
5.6 EINFLUSS VON KIBRA AUF DIE MIGRATION EINZELNER PODOZyTEN.....	98
5.7 EINFLUSS VON KIBRA AUF DIE MIGRATION VON PODOZyTEN IM ZELLVERBAND....	100

6. ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7. AUSBLICK.....	104
8. BIBLIOGRAPHIE	105
9. ANHANG	113
9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	113
9.2 TABELLENVERZEICHNIS	115
9.3 ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME.....	116
9.3.1. MATERIALIEN UND EINHEITEN.....	116
9.3.2. SYMBOLE FÜR DIE DNA- UND RNA-BASEN	119
9.3.3. SYMBOLE FÜR DIE AMINOSÄUREN.....	120
10. DANKSAGUNG	121

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung: Niere und Podozyten

Zu den Funktionen der Niere gehören die Exkretion von Stoffwechselendprodukten und Fremdstoffen, die Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure/Base-Haushalts sowie die Produktion von Hormonen. Um Stoffwechselendprodukte ausscheiden zu können, wird das Blut zunächst gefiltert, wobei der so genannte Primärharn entsteht. Dieser Primärharn wird in einem dem Filter nachgeschalteten Tubulussystem zu großen Teilen rückresorbiert. Die funktionellen Untereinheiten der Nieren sind Nephrone. Diese setzen sich aus dem Glomerulum, einem kapillaren Gefäßknäuel, und dem Tubulussystem mit den zugehörigen Blutgefäßen zusammen (Vgl. Abb.1.1).

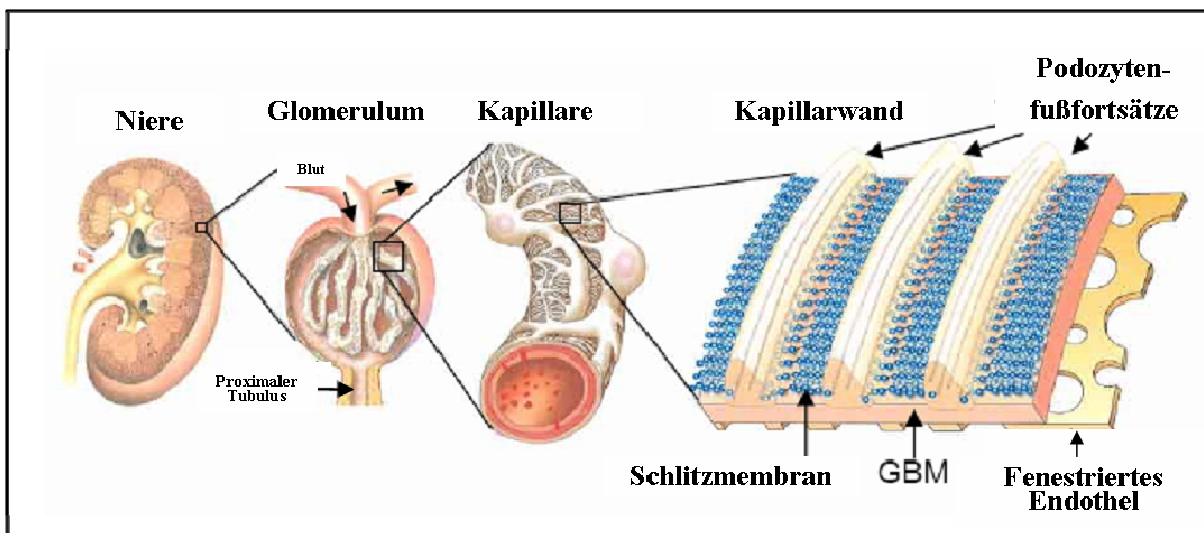


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der Säugerniere. Die Abbildung zeigt einen Querschnitt durch die Niere (links), ein heraus vergrößertes Glomerulum inklusive zu- und abführendem Gefäß und den sich anschließenden proximalen Tubulus (Mitte links). Weiter vergrößert stellt sich der Teil einer Kapillare mit aufliegenden Podozyten dar (Mitte rechts) sowie die Dreischichtung der glomerulären Filtrationsbarriere aus fenestriertem Endothel, glomerulärer Basalmembran (GBM) und Podozyten, zwischen deren Fußfortsätzen die Schlitzmembran ausgebildet wird (rechts) [106].

Das Glomerulum stellt die eigentliche Filtrationsbarriere für Proteine dar. Der Primärharn entsteht, indem das Blutplasma der Kapillaren in die Bowmannsche Kapsel abgepresst und von dort weiter in das Tubulussystem geleitet wird. Dabei werden innerhalb des Glomerulums drei Schichten passiert, die sich aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten zusammensetzen (Vgl. Abb.1.1). Bei den Podozyten handelt es sich um viszerale Epithelzellen, die eine eindrucksvolle Zytoarchitektur aufweisen (Vgl. Abb. 1.2). Die primären Fußfortsätze der Podozyten teilen sich in sekundäre Fußfortsätze, welche reißverschlussgleich mit den Fußfortsätzen

benachbarter Podozyten ineinander greifen. Zwischen diesen interdigitierenden sekundären Fußfortsätzen liegt die Schlitzmembran, ein hoch spezialisierter Zell-Zell-Kontakt.

Die Schädigung der Podozyten und der Schlitzmembran führt zu einem Funktionsverlust des Nierenfilters, der mit einer schweren Proteinurie einhergeht. Das daraus resultierende nephrotische Syndrom gehört zu den häufigsten klinischen Syndromen im Bereich der Nephrologie und ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Eiweißausscheidung, Hyperlipidämie, Hypoalbuminämie und Ödeme. Dies findet sich im Wesentlichen bei drei definierten Krankheitsbildern: *Minimal-change-Disease*, membranöse Glomerulonephritis und fokale segmentale Glomerulonephritis (FSGS), welche alle durch eine Schädigung des Podozyten hervorgerufen werden und zu einer Verschmelzung der Fußfortsätze führen (*Der Internist*, Springer Verlag, 2003.44:1075-1082, G. Walz, Freiburg) [67]. Die Bemühungen, die molekularen Vorgänge innerhalb des Podozyten im Detail zu verstehen, haben deshalb innerhalb der letzten Dekade stark zugenommen. Ziel dieser Grundlagenforschung ist es, tiefere Einblicke in die Funktionsweise des Nierenfilters zu gewinnen.

1.2 Podozyten und Schlitzmembran

Die Podozyten befinden sich außen, auf der dem Urin zugewandten Seite des endothelialen Kapillarknäuels (Vgl. Abb. 1.2) und werden von diesem durch die GBM getrennt. Diese setzt

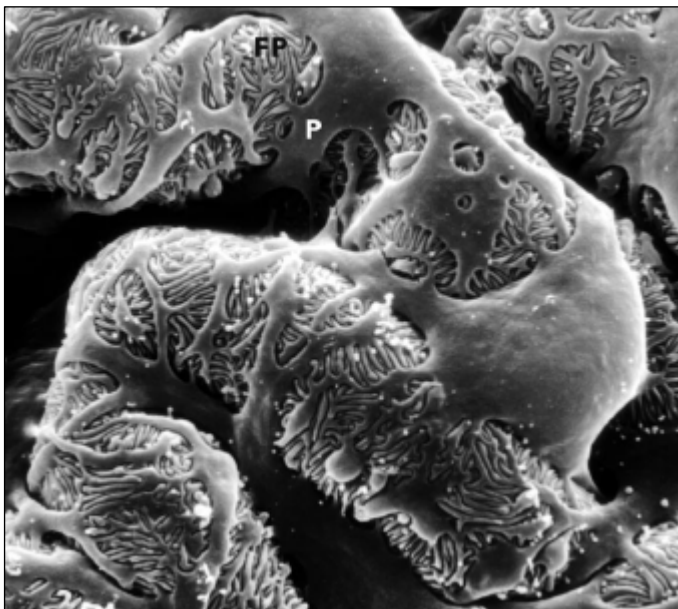


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines glomerulären Kapillarknäuels der Ratte. Die Abbildung zeigt die eindrucksvolle Zytoarchitektur einiger Podozyten und ihrer Fußfortsätze, die ein dichtes Netzwerk um die Kapillarschlingen innerhalb eines Glomerulums bilden. P=Podozyt; FP=Fußfortsatz. 6.000-fache Vergrößerung [67].

sich aus einem Kollagengerüst (Lamina densa) zusammen, an das sich beidseitig Proteoglykane und Glykoproteine (Lamina rara interna und externa) anlagern. Der größen- und ladungsselektive Filter aus Podozyten, GBM und Endothelzellen ist für Plasmaproteine wie Albumin (70 kD) nicht durchlässig. Die Permeabilität dieses Filters ist für Anionen aufgrund der negativ geladenen Heparansulfat-Seitenketten der Proteoglykane der GBM und der luminalen Glykokalix der Podozyten schlechter als für Kationen vergleichbarer Größe oder für ungeladene Moleküle.

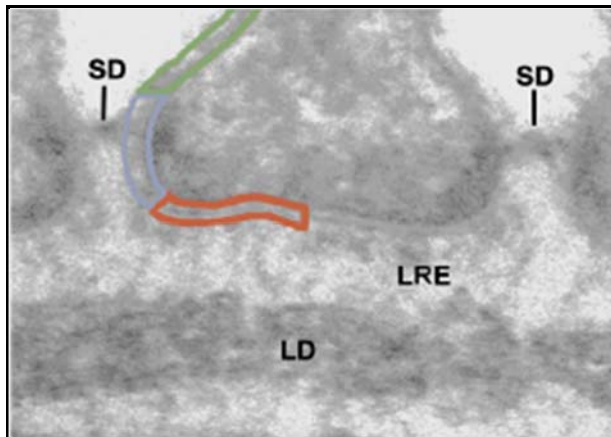


Abb. 1.3 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozytenfußfortsatzes. Die Membran des Fußfortsatzes unterteilt sich in einen apikal von der Schlitzmembran (SD) liegenden Bereich (grün), den Bereich der SD (blau) und die Basis des Fußfortsatzes (rot). LRE=Lamina rara externa, LD=Lamina densa. 140.000-fache Vergrößerung [39].

Die Zellmembran der sekundären Fußfortsätze eines Podozyten lässt sich in drei Bereiche unterteilen. Dabei wird zwischen der apikal über der Schlitzmembran (SD) liegenden Membran (Abb. 1.3, grün), dem Bereich der SD (Abb.1.3, blau) und der Basis des Fußfortsatzes (Abb. 1.3, rot) unterschieden.

Die hoch differenzierten Podozyten sind stark polarisierte Zellen, die ihre Teilungsfähigkeit größtenteils verloren haben. Die interdigitierenden Sekundärfortsätze der Podozyten sind über $\alpha_3\beta_1$ -

Integrin-Komplexe und Dystroglykane in der Lamina rara externa der GBM verankert [71;73]. Zwischen dem dichten Netzwerk der Sekundärfortsätze entstehen Filtrationsschlitze von 30 - 40 nm Weite, die von den Proteinen der Schlitzmembran überbrückt werden (Vgl. Abb. 1.4 a). Für deren Aufbau entscheidend sind bis zum heutigen Kenntnisstand die Proteine Nephrin, Podocin, CD2AP, ZO-1, Nephrin-3, P-Cadherin, Densin-180 und FAT1/FAT2 [3;15;31;36;38;41;74;80;88;90].

An der direkten Überbrückung der Filtrationsschlitze sind dabei die Proteine Nephrin, Nephrin-3, P-Cadherin und FAT1/FAT2 maßgeblich beteiligt (Vgl. Abb. 1.4 a). Mutationen der Gene dieser Schlitzmembrankomponenten können über die Schädigung der Podozyten zum nephrotischen Syndrom führen [81;107]. Aus diesem Grund liegt der Fokus der nephrologischen Forschung verstärkt auf der Untersuchung der Schlitzmembranproteine und

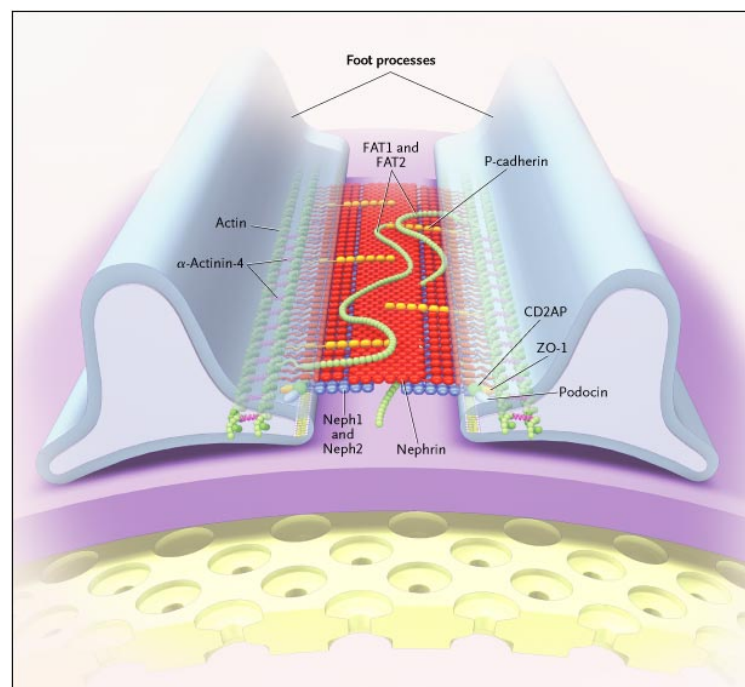


Abb. 1.4 a: Schematische Darstellung der Schlitzmembran. Die Abbildung zeigt die Proteine, die am strukturellen Aufbau der Schlitzmembran (SD) beteiligt sind. Dabei setzt sich die SD aus einem hochdynamischen und elastischen Multiproteinkomplex zusammen, der die Fußfortsätze benachbarter Podozyten überbrückt. (Footprocesses=Fußfortsätze) [106].

der Funktion der einzelnen Komponenten in dem Gesamtnetzwerk. Die Schlitzmembran ist der einzige Zell-Zell-Kontakt von Podozyten und weist Gemeinsamkeiten zu anderen Zell-Zell-Kontakten wie *tight junctions* oder *adherens junctions* auf [49;74]. Epitheliale *tight junctions* stellen nicht nur Barrieren dar, welche die apikobasale Zellpolarität aufrecht erhalten, sondern fungieren zusätzlich als regulatorische Organisationszentren, die Einfluss auf Zellwachstum, Proliferation und Differenzierungsprozesse nehmen [49]. Neben diesen funktionellen Gemeinsamkeiten zu der Schlitzmembran wird in den Fußfortsätzen von Podozyten das *tight junction*-assoziierte Protein ZO-1 (*Zonula Occludens-1*) exprimiert [87]. Die von der Schlitzmembran gebildeten interzellulären Filtrationsschlitze ähneln *adherens junctions*, die gleichermaßen Zellmembranen in einem vergleichbaren Abstand von 25 nm überbrücken. *Adherens junctions* dienen der Zell-Zell-Adhäsion und sind durch *linker* Proteine an das Aktin-Zytoskelett assoziiert. Die *linker* Proteine der Schlitzmembran sind unter anderem Catenine, ZO-1, CD2AP (*CD2 interacting protein*), CASK und MAGI-2 (Vgl. 1.4 Zellpolarität, 1.6.1.1 WW-Domänen) [50].

Die Funktion des dynamischen Multiproteinkomplexes, der die Schlitzmembran aufbaut, ist

nicht auf die Filtration beschränkt. Er dient des Weiteren als Plattform der Signaltransduktion und als regulatorisches Organisationszentrum bei Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts (Vgl. Abb. 1.4 b) [5;31]. Die Fußfortsätze der Podozyten bilden keine statische Einheit; vielmehr handelt es sich um hoch dynamische Strukturen, die einen kontraktile Apparat aus Aktin, Myosin-II, α -actinin-4, Talin und Vinculin beinhalten [16]. Durch den Filtrationsfluss sind Podozyten Scherkräften ausgesetzt, die durch stetige Reorganisationen des Aktin-

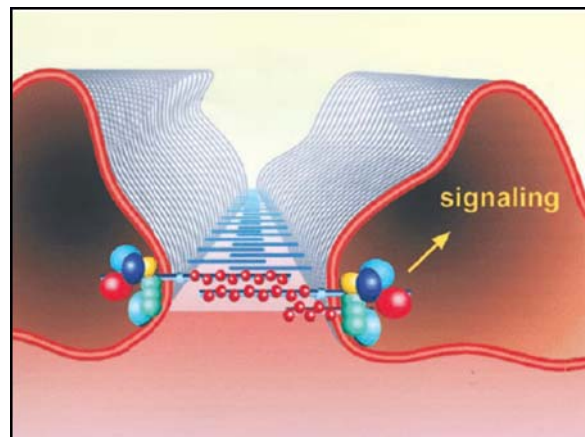


Abb. 1.4 b: Schematische Darstellung der Schlitzmembran (SD). Die SD ist ein spezialisierter Zell-Zell-Kontakt, der Bestandteil des glomerulären Filters der Nieren ist. Neben dieser Filterfunktion dient die SD als Plattform der Signaltransduktion und als regulatorisches Zentrum bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts [5].

Zytoskeletts und die Verankerung in der GBM kompensiert werden [18;19;26]. Alle Formen des nephrotischen Syndroms resultieren durch Veränderungen des Zytoskeletts der Podozyten in einem charakteristischen Ablösen der Fußfortsätze. Im Zuge dieser pathologischen Veränderung verlieren die Podozyten ihre Fähigkeit, sich durch migratorische Prozesse entlang der GBM zu bewegen [75].

1.3 Zellmigration und Adhäsion

Die Fortbewegung von Zellen und Zellverbänden auf einer Oberfläche wie der extrazellulären

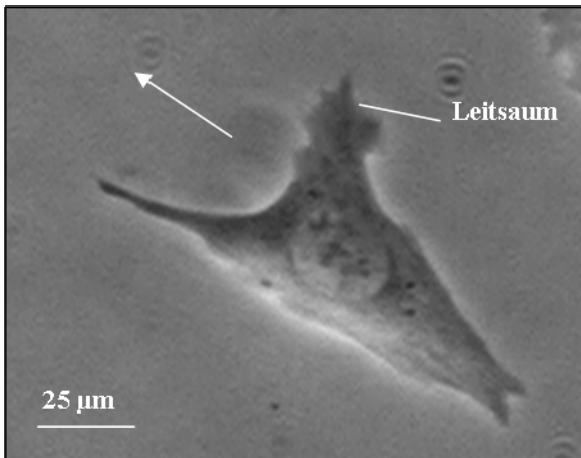


Abb. 1.5: Migrierende Zelle. Leitsaum und Hinterende des Podozyten lassen sich deutlich unterscheiden. Der Pfeil weist in die Richtung der Fortbewegung.

Matrix (ECM) oder in einem Gewebe, wird als Zellmigration bezeichnet und spielt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Eine der wichtigsten Aufgaben zellulärer Migration zeigt sich bei der Ontogenese, bei der Zellen durch gerichtetes Auswachsen Zellverbände bilden und den gesamten Organismus in seiner Form bestimmen. Auch der Verschluss von Wunden durch das Einwandern von Fibroblasten und Epithelzellen aus den Wundrändern beruht unter anderem auf der Zellmigration. Gleichermäßen

ist eine erfolgreiche Immunabwehr ohne das Migrationsverhalten der Abwehrzellen nicht vorstellbar. Das vielfältige Auftreten von Migrationsereignissen unterstreicht deren besondere Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer Reihe physiologischer Vorgänge im Organismus.

1.3.1 Zellmigration

Zellmigration ist eine Art der Fortbewegung, die ein konzertiertes Zusammenspiel von krafterzeugenden Komponenten des Zytoskeletts und kraftübertragenden Adhäsionsstrukturen erfordert [89]. Migrierende Zellen weisen in Bezug auf ihre Bewegungsrichtung eine Polarität auf (Vgl. 1.4, Zellpolarität), die sich in ein Zellvorder- und ein Zellhinterende differenzieren lässt (Vgl. Abb. 1.5). Das Zellvorderende (Leitsaum) wird durch dünne Fortsätze, die Lamellipodien, bestimmt, der Zellkörper mit Zellkern und Organellen bildet das Hinterende. Für die Migration eukaryoter

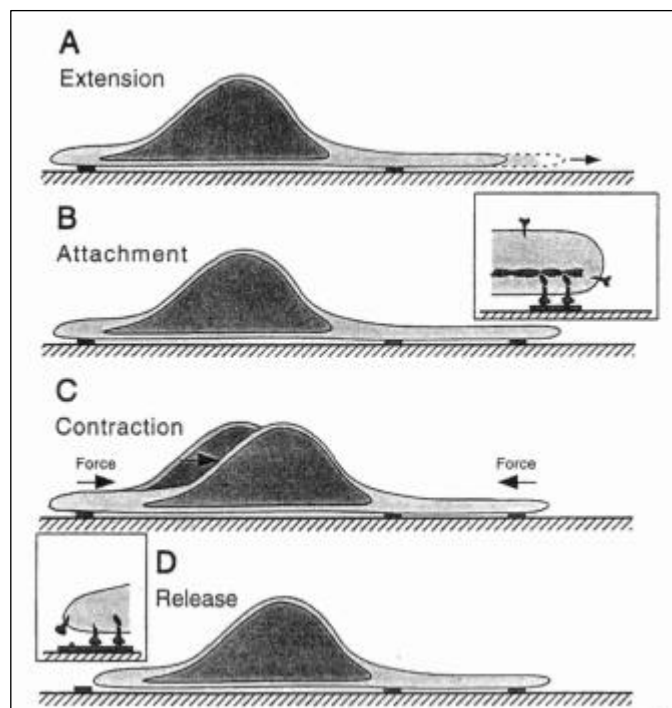


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Zellmigration. Die Abbildung zeigt die Ausbildung (A) und das Anheften (B) eines Lamellipodiums, die anschließende Kontraktion (C) der Zelle und das Ablösen (D) des Zellhinterendes. Abbildung entnommen aus Sheetz, 1999.[89]

Zellen ist im Allgemeinen kein einzelnes Bewegungsorganell verantwortlich. Die Fortbewegung ist vielmehr ein Zusammenspiel verschiedener Prozesse. Die Lamellipodien werden als dynamische Strukturen während der Migration stetig auf- und abgebaut und haften über Fokalkontakte an der extrazellulären Matrix (Vgl. Abb. 1.6). Nachdem die fokalen Adhäsionspunkte am Hinterende der Zelle gelöst sind, zieht sich die Zelle vorwärts, indem über die Fokalkontakte am Vorderende ein Zug auf die Matrix ausgeübt wird. Die Migrationsrichtung kann sich jederzeit verändern, womit auch die Morphologie der Zelle einem ständigen dynamischen Wandel unterliegt.

1.3.2 Extrazelluläre Matrix

Die Matrix, auf der die Zellen im Organismus anhaften, stellt zumeist das Bindegewebe dar, das zum Großteil aus Kollagen besteht. Der spezifische Charakter dieses Faserproteins hängt vom jeweiligen Kollagentyp und den in die Kollagenmatrix eingelagerten Molekülen ab. Gebildet wird Kollagen von Bindegewebszellen wie Fibroblasten oder Osteoblasten, die das Vorläufermolekül Prokollagen sezernieren. Durch das extrazelluläre Enzym Kollagenase wird die Selbstaggregation zu fertigen Kollagenfasern eingeleitet, indem das Enzym terminale Domänen des Prokollagens entfernt [14]. Dieser Mechanismus schützt die Zelle vor einer intrazellulären Polymerisation des Kollagens. Wie alle Basalmembranen besteht auch die GBM, auf der die Podozyten anhaften, aus Glykoproteinen (Laminin, Kollagen IV, Entactin/Nidogen) und Proteoglykanen (Agrin, Perlecan) [22].

1.3.3 Aktinfilamente

Aktinfilamente stellen neben Mikrotubuli und Intermediärfilamenten eine Hauptkomponente des Zytoskeletts dar und durchspannen die gesamte Zelle in Form eines Netzwerkes. Sie bestehen aus einer doppelsträngigen Helix globulärer Aktinmoleküle. Mit Hilfe aktinbindender Proteine wird das Verhalten der Aktinmonomere und der Aktinfilamente in Bezug auf ihre Polymerisation, Bündelung und Vernetzung bestimmt. Im Zellcortex, einer Region direkt unterhalb der Plasmamembran der Zelle, besteht die höchste Konzentration an Aktinfilamenten. Durch Umlagerung und Polymerisation von Aktinmolekülen finden hier die für die Zellmigration notwendigen Prozesse statt [94]. Die Ausbildung der Lamellipodien wird durch aktinbindende Proteine initiiert, die als Keimbildungsstelle für die Zusammenlagerung von Aktinmonomeren zu einem Filament dienen. Diese Anordnung wird von Rac und Cdc42 reguliert, kleinen GTPasen der Rho-Familie. Der am besten charakterisierte Nukleator neuer Aktinfilamente ist der Arp2/3 Komplex [1], der die schnelle

Ausbildung von Lamellipodien ermöglicht [96;101]. Der Arp2/3 Komplex wird durch Proteine der WASP (*Wiskott-Aldrich-Syndrome proteins*) und WAVE (*WASP family verprolin homologous proteins*) Familie aktiviert [8]. Durch das fortschreitende Anlagern von Aktinmonomeren am Plus-Ende des Filamentes wird die Polypeptidkette länger, die Plasmamembran wird nach außen gedrückt, und das Lamellipodium wächst aus. Zwischen der Oberfläche, auf der die Zelle migriert, und der Plasmamembran werden im Zuge des Auswachsens des Lamellipodiums über Transmembranproteine neue Verankerungspunkte ausgebildet. Diese Transmembranproteine, die Integrine, stellen eine direkte Verbindung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix her [110].

1.3.4 Integrine

Integrine sind transmembranäre Glykoproteine, die aus einer α - und einer β -Untereinheit bestehen und zu nichtkovalent gebundenen Heterodimeren assoziieren [34]. Sie bilden eine Superfamilie von Oberflächenrezeptoren, die für Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen notwendig sind, und in den 1980er Jahren erstmalig beschrieben wurden [33]. Nach dem Kontakt mit ihrem spezifischen Liganden bzw. ihrer Aktivierung, beginnen sich die Integrine in einem als *Clustering* bezeichneten Vorgang zusammenzulagern [11]. Dabei werden sie auf zytoplasmatischer Seite durch Proteine wie zum Beispiel Vinculin und Paxilin mit Aktinfilamenten vernetzt und bilden auf diese Weise einen Zell-Matrix-Kontakt aus [59]. Über diese Fokalkontakte werden die für die Migration notwendigen Zugbewegungen auf die Matrix ausgeübt. Fokale Adhäsionen können sich aus über 50 Proteinen zusammensetzen, was deren beträchtlichen Funktionsumfang erklärt [111]. Tatsächlich dienen sie nicht nur der Verankerung der Zelle, sondern fungieren darüber hinaus als Signalüberträger, die die Zelle über den Zustand der ECM informieren und somit ihr Verhalten beeinflussen [77].

Integrine vermitteln neben der Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix auch die Signaltransduktion durch die Zellmembran, Vorgänge die als *inside-out-* bzw. *outside-in-signaling* bezeichnet werden. Den Weg aus der Zelle heraus können Signale nehmen, die im Zuge des *inside-out-signaling* im Hinblick auf die Migration das Lösen der Integrin-Matrix-Verbindung steuern. Beim *outside-in-signaling* reagiert die Zelle mit einer Umorganisation des Zytoskeletts oder einer erhöhten Genexpression auf die Bindung eines Liganden an die extrazelluläre Domäne des Integrins [35]. Die Umorganisation des Zytoskeletts steht am Ende einer integrinvermittelten Signalkaskade, die, zum Beispiel über die Rho-Familie der kleinen GTPasen, Einfluss auf die Ausbildung von Lamellipodien nimmt [29].

den PAR Proteinen (*Partitioning defective*) ähnlich PALS1 und PATJ, Gerüstmoleküle mit multiplen Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Der Effektor dieses Komplexes ist die aPKC (atypische Proteinkinase C), die durch Phosphorylierungen einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation von Proteinen entlang eines Polaritätsgradienten nimmt (Vgl. 1.6.2). Beide Polaritätskomplexe, CRB3/PALS1/PATJ und PAR3/PAR6/aPKC interagieren miteinander, indem PALS1 und CRB3 direkt an PAR6 binden (Vgl. Abb. 1.8).

1.5 Das Protein PATJ

Die ursprünglich entdeckte Proteinsequenz der murinen Variante von PATJ, CIPP (*Channel interacting PDZ domain protein*, [46], beinhaltet vier so genannte PDZ-Domänen (Vgl. Abb. 1.9). Inzwischen ist bekannt, dass es sich bei der von Kurschner et al. 1998 gefundenen Sequenz um eine Verkürzungsmutante handelt und CIPP wie PATJ zehn PDZ-

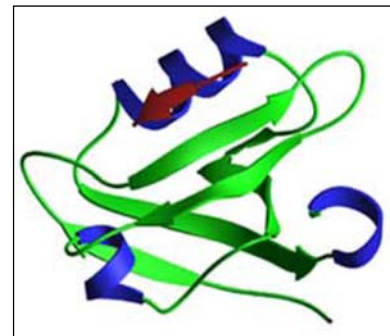


Abb. 1.9: Dreidimensionale schematische Darstellung einer PDZ-Domäne (<http://pawsonlab.mshri.on.ca/>).

Domänen beinhaltet. PDZ-Domänen (**DHRs**, *Discs-large homology regions*; GLGF repeats, *Gly-Leu-Gly-Phe*) sind Protein-Protein-Interaktionsmodule, die in der Struktur von Gerüstproteinen vermehrt anzutreffen sind. Der Name dieser ca. 90 Aminosäuren beinhaltenden Module setzt sich aus Mitgliedern der MAGUK-Proteinfamilie zusammen, in denen diese erstmals beschrieben wurden: PSD-95 [*Postsynaptic density*]/DLG [*Discs-large*]/ZO-1 [70;85]. Die meisten der bisher bekannten Bindungsmotive von PDZ-Domänen bestehen aus den letzten 4 C-terminalen Aminosäuren des Interaktionspartners, wobei Aminosäurereste bis hin zu Position -8 die Bindung beeinflussen können [32;43;63;95]. Inzwischen sind auch interne Bindungsmotive von PDZ-Domänen bekannt [69]. Aufgrund der unterschiedlichen Bindungsspezifität wurden PDZ-Domänen in drei Gruppen klassifiziert (Vgl. Tab. 1.1) [32].

Tab.1.1: Klassifizierung der PDZ-Domänen anhand der Konsensusbindungssequenz.

Klasse	C-terminale AS-Sequenz des Liganden
I	X-S/T-X-Φ
II	X-Φ-X-Φ
III	X-D/E-X-Φ

AS: Aminosäure, X: unspezifische AS, Φ: hydrophobe AS (V, L, I)

Die letzte Aminosäure des C-Terminus wird in allen drei Klassen durch einen hydrophoben Aminosäurerest wie Leucin, Valin oder Isoleucin dargestellt [95].

Neben den zehn PDZ-Domänen beinhaltet PATJ mit einer N-terminalen L27-Domäne ein weiteres Protein-Protein-Interaktionsmodul. Jede L27-Domäne setzt sich aus drei Helices zusammen, die mit anderen L27-Domänen Heterodimere bildet und auf diese Weise zur Ausbildung multipler Proteinkomplexe beiträgt [52].

Da PATJ von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von Zellpolarität ist [91;92], wurde in dieser Arbeitsgruppe ein *Yeast Two Hybrid Screen* mit den letzten vier C-Terminalen PDZ-Domänen der murinen Variante, CIPP, und einer humanen Podozyten cDNA Bank durchgeführt. Dabei konnte das Protein KIBRA als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden.

1.6 Das Protein KIBRA

Das Protein KIBRA wurde bei dem Versuch, neue Interaktionspartner des postsynaptischen Proteins Dendrin [30] zu identifizieren, von Kremerskothen et al. 2003 in einem *Yeast Two Hybrid Screen* mit einer humanen Gehirn cDNA Bank entdeckt [45].

Strukturanalysen ergaben, dass dieses bis dato unbekannte Protein zwei aminoterminalen WW-Domänen beinhaltet sowie eine interne C2-Domäne und einen glutaminsäurereichen Abschnitt (Vgl. Abb. 1.10). Die Forschergruppe konnte in ihrer Arbeit durch *Northern Blot* Analysen zeigen, dass die mRNA dieses Proteins vermehrt in der Niere und dem Gehirn exprimiert wird, was zu der Namensgebung KIBRA führte („*kidney*“ und „*brain*“).

1.6.1 Die Domänenstruktur von KIBRA

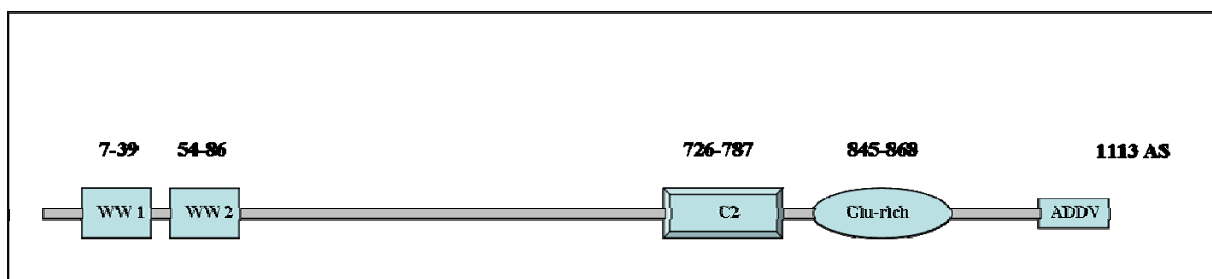


Abb. 1.10: Schematische Darstellung des Proteins KIBRA.

Die Abbildung zeigt die schematische Domänenstruktur des 1113 Aminosäuren beinhaltenden Proteins KIBRA mit zwei aminoterminalen WW-Domänen, einer zentralen C2-Domäne, gefolgt von einem glutaminsäurereichen Abschnitt und die letzten vier Aminosäuren des C-Terminus, ADDV.

1.6.1.1 WW-Domänen

Diese Protein-Protein-Interaktionsdomänen wurden ursprünglich nach zwei konservierten Tryptophanresten innerhalb ihrer Konsensussequenz benannt [68]. Mittlerweile sind auch WW-Domänen bekannt, die lediglich ein konserviertes Tryptophan aufweisen. Es handelt sich bei diesen Modulen um ca. 38 Aminosäuren lange Bereiche, die sich in drei antiparallelen β -Faltblättern anordnen (Vgl. Abb. 1.11). Hydrophobe Aminosäurereste innerhalb dieser Domänen bilden eine flache Bindungsfläche für die Liganden. Die WW-Domänen wurden initial anhand der Konsensussequenz ihrer Bindungspartner in vier Klassen unterteilt [55;102], die alle auf

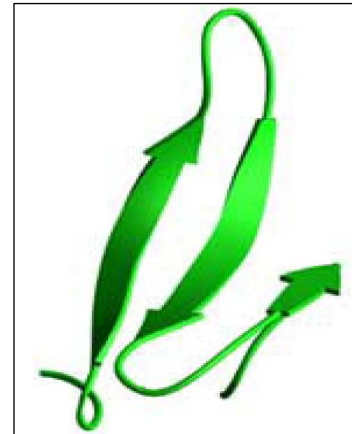


Abb. 1.11: Dreidimensionale schematische Darstellung einer WW-Domäne (<http://pawsonlab.mshri.on.ca/>).

einem prolinreichen Bindungsmotiv des Liganden basierten. Eine hohe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen zwischen den WW-Domänen von KIBRA und MAGI-1 konnten Kremerskothen et al. 2003 zeigen [45]. MAGI-1 gehört zu der Familie der MAGUK Proteine (Vgl. 1.4) und verfügt über eine ungewöhnliche Anordnung der Interaktionsmodule, was den Namen dieser Proteinfamilie erklärt (*Membrane associated guanylate kinase with an inverted arrangement of protein-protein interaction domains*) [13]. Patrie konnte 2005 eine Bindung der ersten WW-Domäne von MAGI-1 an MASCOT (*MAGI-1-associated coiled-coil tight junction protein; AMOTL 2, angiomin-like 2*) zeigen, die seitens von MASCOT über ein bis dahin unbekanntes LPxY-Motiv vermittelt wird [65].

1.6.1.2 C2-Domänen

Die aus etwa 130 Aminosäuren bestehenden C2-Domänen (Vgl. Abb. 1.12) binden Ca^{2+} -abhängig oder -unabhängig an Phospholipide und setzen sich aus acht antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die durch variable Schleifen an der Spitze und dem Boden des Moduls verbunden werden [78]. Die Funktion dieser Module ist sehr vielschichtig und reicht von Signaltransduktionswegen bis zu vesikulärem Transport. Eine Ca^{2+} -vermittelte Konformationsänderung führt bei einer Reihe von C2-Domänen beinhaltenden Proteinen zu Dimerisierungen [42] [10].

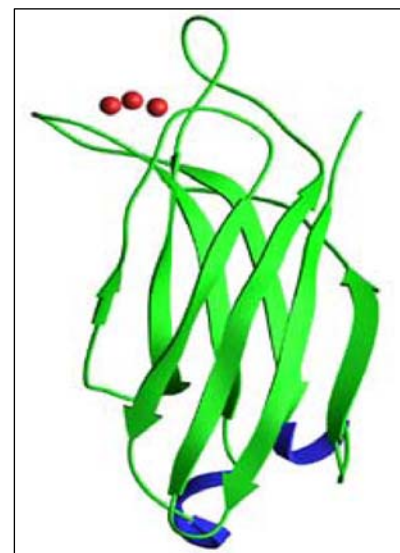


Abb. 1.12: Dreidimensionale schematische Darstellung einer C2-Domäne (<http://pawsonlab.mshri.on.ca/>).

1.6.2 Bekannte Vordaten zu KIBRA

Lokalisationsstudien mit rekombinantem KIBRA zeigten in kultivierten, renalen Meerkatzenzellen (CV1-Zellen) eine zytoplasmatische Verteilung des Proteins mit einer perinukleären Anreicherung [45]. Um KIBRA weiter zu charakterisieren und um potentielle Interaktionspartner zu ermitteln, wurde ein *Yeast Two Hybrid Screen* mit humanem KIBRA und einer humanen Gehirn cDNA Bank durchgeführt. Dabei konnte die Interaktion zwischen KIBRA und der atypischen Proteinkinase C ζ (aPKC ζ) nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Büther et al. zeigen, dass KIBRA ein Substrat für die aPKC ζ darstellt [9]. Die aPKC ζ wird, anders als die klassischen PKCs, nicht durch Ca²⁺ oder DAG aktiviert, sondern durch PIP3, was zu der Bezeichnung „atypisch“ führte. In einer Reihe von Publikationen konnte die Bedeutung der aPKC ζ bezüglich der Zellpolarität gezeigt werden (Vgl. 1.4 Zellpolarität [20;103]).

Bei dem Versuch, spezifische Bindungspartner der WW-Domänen von KIBRA zu identifizieren, konnte das Protein PIR121 identifiziert werden (Kremerskothen, unveröffentlichte Daten). PIR121 (*p53 inducible messenger RNA*, Sra-1 [*specifically Rac1-associated protein-1*], CYFIP, p40) gehört zusammen mit den Proteinen Nap1 (*Nck-associated protein*), Abi1 (*Ab1 interactor*) und WAVE2 zu einem Proteinkomplex, der über den Arp2/3-Komplex die Aktinpolymerisierung des Zytoskeletts aktiviert (Vgl. 1.3.3 Aktinfilamente). [8;27;37;101]. Steffen et al. konnten die Bedeutung der Proteine Sra-1 und Nap1 als wichtige Mediatoren bei der Ausbildung von Lamellipodien zeigen [97]. Das Protein Sra-1 beinhaltet in seiner Aminosäuresequenz das gleiche WW-Domänen-Bindungsmotiv (LPxY), über das MASCOT and die erste WW-Domäne von MAGI-1 bindet (Vgl. 1.6.1.1 WW-Domänen).

Untersuchungen des Proteins DLC1 (*Dynein light chain 1*), einem Bestandteil des Dynein Motorproteinkomplexes, der dem Transport entlang von Mikrotubuli dient, zeigten eine Bindung an KIBRA [72]. Das Protein DLC1 ist in Signaltransduktionswege des Zytoskeletts involviert und interagiert mit dem Östrogen-Rezeptor-Alpha (ER). Durch DLC1 aktiviert, kommt es zu einer erhöhten Expression der ER-Zielgene, wodurch das Wachstum von Brustkrebszellen stimuliert wird. Um den molekularen Mechanismus besser zu verstehen, durch den DLC1 die ER vermittelten Signalwege reguliert, wurde versucht, neue Interaktionspartner von DLC1 zu ermitteln. Die Forschergruppe um Rayala konnte zeigen, dass KIBRA sowohl mit DLC1 als auch mit ER interagiert, wobei insbesondere der KIBRA-

DLC1-Komplex wichtig für die Rekrutierung von ER und DLC1 zu deren Ziel-Chromatin ist. Des Weiteren wurde eine Interaktion von KIBRA mit Histon H3 nachgewiesen, die über den glutaminsäurereichen Bereich von KIBRA vermittelt wird. Diese Bindung beeinflusst nachhaltig die ER-Transaktivatorfunktion und die Proliferation Liganden-stimulierter Brustkrebszellen [72].

Bei einer das vollständige humane Genom umfassenden Untersuchung wurde KIBRA als ein Protein beschrieben, das an Gedächtnisleistungen assoziiert ist [64]. Eine im Hippocampus exprimierte Verkürzungsmutante von KIBRA, der die ersten 233 Aminosäuren fehlen, interagiert mit der aPKC ζ [9], welche an der Formation von Gedächtnisleistungen und der Etablierung des Langzeitgedächtnisses beteiligt ist [17;83]. Die C2-Domäne von KIBRA weist eine hohe Ähnlichkeit zu der C2-Domäne von Synaptotagmin auf, der die Rolle eines wichtigen Ca²⁺-Sensors bei der Exozytose synaptischer Vesikel zu kommt [45;108]. In drei unabhängigen Kohorten wurde die beschriebene KIBRA-Verkürzungsmutante von Papassotiropoulos und Kollegen in Gedächtnis-assozierten Gehirnregionen gefunden [64].

1.7 Aufgabenstellung und Ziele

Das Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über Polaritätskomplexe in Podozyten zu gewinnen. Bei der Durchführung eines *Yeast Two-Hybrid Screens* mit dem Polaritätsprotein PATJ und einer humanen Podozyten cDNA-Bank wurde das Protein KIBRA als potentieller Interaktionspartner identifiziert. Durch *in situ* Hybridisierungen humaner Nierenschnitte konnte die Expression von KIBRA mRNA und PATJ mRNA in Podozyten gezeigt werden. Die über KIBRA bekannten Daten zeigen einerseits die Interaktion mit Dendrin, das über α -actinin an das Zytoskelett assoziiert ist und andererseits die Bindung an die aPKC ζ , die eine wichtige Funktion in der Zellpolarität einnimmt [9;44]. In der aufgestellten Arbeitshypothese dient KIBRA als funktionelles Adapterprotein zwischen Zytoskelett und Polaritätskomplexen (Vgl. Abb. 1.13). Zu der Aufgabenstellung gehörte es, die vorläufigen Ergebnissen zu der potentiellen Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1, das an der Aktivierung der Aktinpolymerisierung des Zytoskeletts beteiligt ist, sowie zwischen KIBRA und dem Polaritätsprotein PATJ zu analysieren und zu bestätigen.

Um die spezifische Funktion von KIBRA in Podozyten zu untersuchen, sollten *Knock down*- und Überexpressions-Experimente in kultivierten Podozyten durchgeführt werden. Diese kultivierten Podozyten mit fehlregulierter KIBRA-Expression sollten anschließend in verschiedenen Ansätzen auf ihr Migrations- und Adhäsionsverhalten hin untersucht werden.

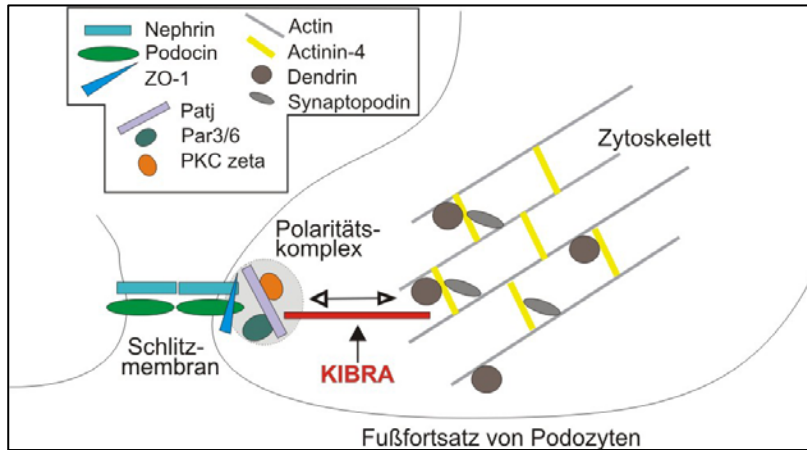


Abb. 1.13: Modell des Proteins KIBRA im Podozyten. Die Abbildung zeigt ein hypothetisches Modell der Funktion von KIBRA im Podozyten, indem KIBRA als Adapterprotein zwischen Zytoskelett und Schlitzmembran-assoziierten Polaritätskomplexen dient.

2. Material

2.1 Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH
Brutschränke Bakterien, Hefen	B5050	Heraeus
Brutschränke Zellkultur	Heracell 240	Heraeus
Elektrophoresekammern (Agarosegele)	Model B1	Peqlab Biotechnologie GmbH
Elektrophoresekammern (PAA-Gele)	Novex Mini-Cell	Invitrogen
Entwickler	Optimax X-Ray Film Processor	PROTEC Medizintechnik
Fluoreszenzkamera	AXIOCAM MRC	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	AXIOVERT 100	Zeiss
Geldokumentationssystem	Lumi-Imager F1	Roche
Luciferaseassay-dokumentationssystem	Mithras LB 940	Berthold
PCR-Gerät	GeneAmp® PCR-System 2700	Applied Biosystems
Phasenkontrastmikroskop	AXIOVERT 20, AXIOVERT 40c	Zeiss
pH-Meter	RS-232-C	Schott
Photometer	Smart Spec™	BioRad
Reinstwasseranlage	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
Schüttelinkubator Bakterien, Hefen	Certomat® IS	B.Braun Biotech International
Spannungsquellen	Power Pac HC™	BioRad

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Stahlrahmen, zum Einspannen von Siebgewebe	MESH N°. 270	RETSCH, Haan, Germany
Sterilwerkbank	HERAsafe	Heraeus
Thermostaten	Thermomixer comfort	Eppendorf
UV-Tisch (Transiluminator)	IL-200-M	H. Saur Laborbedarf D-Reutlingen
Videokamera	XC-ST70C	Hamatsu/Sony
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries, Inc. N.Y. USA
Waagen	Scout™Pro Explorer®Pro	OHAUS
Western-Blot-Apparatur	Semidry Transfercell	BioRad
Zentrifugen	Mikro 200 R Allegra™ X-22R Multifuge 3S-R	Hettich Beckman Heraeus

2.2 Chemikalien und Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA ladder	Promega
100 bp DNA ladder	Promega
2-Propanol	Roth
6 x Loading Dye Solution	MBI Fermentas
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Roth

MATERIAL

Bezeichnung	Hersteller
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS)	Sigma
Dual Luciferase Reporter Assay	Promega
Bromphenolblau	BioRad
Coomassie brilliant blue R-250	Sigma
Coumaridinsäure	Sigma
Crystal Clear Mounting Medium	Sigma
D-Glucose Monohydrat	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dithio-1,4-threitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	AppliChem
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Omnilab
Glutathion Sepharose	Amersham Biosciences
Glycerin (Glycerol)	Roth
Glycin	Roth
Hefe-Extrakt	Sigma
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), dioxanfrei	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Aldrich
Calciumchlorid	Sigma
LB-Broth Powder	Sigma
Luminol	Fluka
Methanol	Roth

Bezeichnung	Hersteller
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Fluka
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Fluka
PEG 4000	Roth
PMSF	AppliChem
Ponceau S Lösung	Sigma
Precision Plus Protein Dual Colour Standard	BioRad
Salzsäure (HCl) 37 %	Roth
Siebewebe aus Polyester, $\text{Ø}100 \mu\text{m}$ und $\text{Ø}51 \mu\text{m}$	Reichert Chemietechnik, Heidelberg
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, Trizma® Base)	Sigma
Triton® X-100	Sigma
Vectashield Hard Set™	Axxora
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	Sigma
β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma

2.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer, Lösungen und Medien werden mit Reinstwasser angesetzt. Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten sowie die Zellkultur werden für 30 Min bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgt, wenn nicht anders angegeben, bei RT.

MATERIAL

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
1 x PBS	<i>Dulbecco's Phosphate buffered Saline</i> mit und ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , PAA
2 x HEBS-Lösung	HEPES acid 10 g, NaCl 16 g, KCl 0.74 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, Glucose 2 g, 10 ml 10 x PBS, mit H_2O auf 11 auffüllen, pH 7.05 einstellen, Gebrauchslösung: 4°C, dauerhafte Lagerung: -20°C
AA-Stammlösung	40 % Acrylamid/Bis-Acrylamid Solution, BioRad, 4°C
Alexa Fluor® 594 Phalloidin	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA, -20°C
Calciumchloridlösung	0.25 M
<i>Columnbuffer</i>	200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 4°C
Coomassie-Gebrauchslösung	Coomassie-Stammlösung mit H_2O 1:10 verdünnen
Coomassie-Stammlösung	0.6 % (w/v) Coomassie <i>brilliant blue</i> , 10 % Essigsäure in H_2O
Entfärbelösung für Coomassiegele (<i>Destaining Solution</i>)	5 % Methanol, 7 % Essigsäure in H_2O
Fixierlösung (<i>Fixing Solution</i>)	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure in H_2O
Hepes 1M	PAA, 4°C (dauerhafte Lagerung -20°C)
Interferon γ	Roche, -20°C
IP-Puffer Gebrauchslösung	IP-Puffer Stammlösung + 0.25 mM PMSF (in EtOH) + 5 mM Na_3VO_4 , frisch ansetzen
IP-Puffer Stammlösung	1 % Triton X-100, 20 mM Tris/HCl pH 7.5, 25 mM NaCl, 50 mM NaF, 15 mM EDTA, 4°C
Kollagen A	1 mg/ml Biochrom, 4°C
Laemmli-Probenpuffer 2 x	20 % (v/v) Glycerol, 125 mM Tris/HCl pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) β -ME in H_2O , -20°C

MATERIAL

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Na ₃ VO ₄ (Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor)	100 mM Stammlösung, Sigma , -20°C
Paraformaldehyd (PFA)	2 % (w/v) Paraformaldehyd, 4% (w/v) Saccharose in 1 x PBS, -20°C
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	10mg/ml PMSF in EtOH Stammlösung, AppliChem -20°C
Protein-Laufpuffer 10 x (10 x <i>Running buffer</i>)	2 M Glycin, 0.5% (w/v) SDS, 250 mM Trizma Base
Protein-Laufpuffer 1 x (1 x <i>Running buffer</i>)	10 x Protein-Laufpuffer mit H ₂ O 1:10 verdünnen
STET-Puffer	8 % (w/v) Saccharose, 50mM EDTA, 5 % (v/v) TritonX-100, 50 mM Tris/HCl pH 8
TAE-Puffer	AppliChem
TBS-T (Tris Buffered Saline + Tween)	10 mM Tris pH 7.4, 0.05 % Tween 20, 150 mM NaCl
Transfer-Puffer 10 x	144 g Glycin, 30 g Trizma Base, mit H ₂ O auf 1l auffüllen
Transfer-Puffer 1 x	1/10 10x Transfer-Puffer, 1/5 Methanol, mit H ₂ O auffüllen
Trypsin-EDTA	PAA, Gebrauchslösung 4°C, dauerhafte Lagerung -20°C
X-Gal-Gebrauchslösung	10 ml Z-Puffer, 167 µl X-Gal-Stammlösung, 27 µl β-ME, -20°C
X-Gal-Stammlösung	20 mg/l 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl- β-D-galaktopyranosid in DMF, vor Licht schützen, -20°C
Z-Puffer	10.7 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 5.5 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, 0.75 g KCl, 0.246 g MgSO ₄ x 4H ₂ O, mit H ₂ O auf 1l auffüllen, pH 7.0

2.3.1 Home made ECL

Zur Analyse von Western Blots werden die benötigten Lösungen für die Peroxidasereaktion der verstärkten Chemilumineszenz (ECL, *enhanced chemiluminescence*) selbst hergestellt.

Die Lösungen A und B sind bei 4°C zwei Tage stabil. Sie werden in einem Verhältnis von 1:1 zusammengegeben. Für eine PVDF-Membran ist ein Volumen von 1 ml *Home made ECL* ausreichend. Das lichtensitive Luminol und die Coumaridinsäure werden in DMSO gelöst und aliquotiert bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.1 Home made ECL

Komponenten	Pipettiervolumen Lösung A	Pipettiervolumen Lösung B	Finale Konzentration
H ₂ O	8.7 ml	9 ml	
1 M Tris/HCl pH 8.5	1 ml	1 ml	100 mM
30 % H ₂ O ₂	---	6 µl	1.5 %
250 mM Luminol	200 µl	---	2.5 mM
90 mM Coumaridinsäure	88 µl	---	0.4 mM

2.4 Medien

Alle nachfolgend angeführten Medien werden, soweit nicht anders angegeben, autoklaviert bzw. sterilfiltriert. Die Lagerung der Medien und Agarplatten erfolgt bei 4°C.

2.4.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.4.1.1 LB-Medium/Agarplatten

Für die Flüssigkultur von Bakterien in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) werden 20 g LB-Broth (Sigma) in H₂O gelöst. Als Selektionsantibiotika werden je nach Bedarf nachträglich 100 µg/ml Ampicillin oder 35 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

LB-Agarplatten werden unter Zusatz von 20 g/l Agar analog dem LB-Medium hergestellt.

2.4.1.2 SOB-Medium

2 % (w/v) BactoTM-Trypton (Difco), 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt und 10 mM NaCl werden mit 2.5 mM KCl versetzt.

2.4.1.3 SOC-Medium

SOB-Medium wird mit 20 mM Glukose, 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ versetzt und aliquotiert bei -20°C gelagert.

2.4.1.4 TYM-Medium

2 % (w/v) BactoTM-Trypton (Difco), 0.5 % (w/v) Hefe-Extrakt und 10 mM MgSO₄ werden mit 100 mM NaCl versetzt.

2.4.1.5 Tfb1

15 % (v/v) Glycerin, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl, 50 mM MnCl₂ und 30 mM KOAc werden sterilfiltriert.

2.4.1.6 Tfb2

15 % (v/v) Glycerin, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl und 100 mM Na-MOPS (Roche) werden auf pH 7.0 eingestellt.

2.4.2 Medien zur Kultivierung von Hefen

2.4.2.1 YPAD-Medium/Agar-Platten

In einem Liter H₂O werden 10 g BactoTMYeast Extract (DIFCO), 20 g BactoTM-Pepton (BD), 20 g Glukose und 100 mg Adeninsulfat gelöst und autoklaviert. Für entsprechende Agarplatten wird vor dem Autoklavieren 20 g/l Agar hinzugefügt.

2.4.2.2 SD-Selektionsmedium/Agar-Platten

6.7 g *synthetic drop-out* (DIFCO, Hefe-Basis-Medium) werden in 850 ml H₂O gelöst und der pH-Wert auf 5.8 eingestellt. Für die Herstellung entsprechender Agarplatten wird 20 g/l Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren werden 50 ml einer Glukoselösung (40 %) und 100 ml 10 x *drop-out*-Lösung zugesetzt. Die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan stellen den synthetischen *drop in* dar und können sekundär zugesetzt werden.

10 x drop-out-Lösungen

300 mg/l	L-Isoleucin
1500 mg/l	L-Valin
200 mg/l	L-Adeninhemisulfat
200 mg/l	L-Arginin x HCl
200 mg/l	L-Methionin
300 mg/l	L-Lysin x HCl
500 mg/l	L-Phenylalanin
2000 mg/l	L-Threonin
300 mg/l	L-Tyrosin
200 mg/l	L-Uracil

100 x Stammlösungen

2 g/l	L-Histidin
10 g/l	L-Leucin
2 g/l	L-Tryptophan

2.4.2.3 3-AT-Lösung

Einige Hefestämme wachsen trotz Mutation im His3-Gen in geringem Maße auf histidindefizientem Medium. Aus diesem Grund wird das Medium mit 25 – 100 mM des kompetitiven Inhibitors dieses Genprodukts, 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT), ergänzt.

2.4.3 Medien zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
<i>Endlich</i> Zellkulturmedium	RPMI 1640 (PAA) + 5 % FCS (+ 75 mg/l Geneticin zur Selektion transduzierter Zellen) Kultivierung bei 33°C: + 10 U/ml γ -Interferon
FCS	BioChrom AG
HEK 293T Zellkulturmedium	DMEM (+L-Glutamin+high Glucose 4.5 g/l) PAA + 10 % FCS
AB 8 („MOIN“) Zellkulturmedium	RPMI 1640 (PAA) + 5 % FCS + 0.8 % <i>Supplements</i>
<i>Supplements</i>	0.1 % nicht-essentielle Aminosäuren (Bio Whittaker) 100 μ M Natriumpyruvat 10 μ g/ml Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit (Roche) 5 mM HEPES

2.5 Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
Bakterien Kulturröhrchen	Sarstedt
Blottingpapier	Schleicher & Schüll
Deckgläser	VWR
ECL-Filme	FUJIFILM Super RX
Flexi-Strip Schaber	BiWeX, Tilburg Holland
Gel- und PCR-Aufreinigungs- kit Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega
Objektträger	VWR
Petrischalen für die Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plasmid Miniprepkit, Wizard [®] Plus SV Minipreps	Promega
Plastikwaren für die Zellkultur	BD Falcon
PureLinkHiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen
PVDF-Immobilon Membran (0.45µm)	Millipore
Reaktionsgefäße (“Eppis”)	Eppendorf, Roth
RNeasy Minikit	Qiagen
Sterilfilter	Millipore
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon

2.6 Enzyme

Die angeführten Enzyme werden bei -20°C gelagert.

Enzym	Hersteller
Calf Intestine Alkaline Phosphatase, (CIAP), 1.000 U	Promega
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene
Go Taq DNA Polymerase	Promega
Lysozym	Roth
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Phusion High Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes
Proteinase K (PNK)	Promega
RNase A	AppliChem
Restriktionsendonukleasen	NEB, Promega
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
T4 Polynukleotid Kinase	Promega

2.7 Antikörper

Spezifität	Spezies	IF	WB	Hersteller
FLAG (M2)	Maus	-	1:10 000	Sigma
GFP	Kaninchen	-	1:500	Santa Cruz
h.KIBRA(#398)	Kaninchen	1:500	1:1500	Eurogentec
h.PATJ	Kaninchen	-	1:1000	Zur Verfügung gestellt von André Le Bivic, Marseille, F
h.PATJ	Kaninchen	-	1:1000	Zur Verfügung gestellt von Yair Horesh, Bar-Ilan, Israel
Sra-1	Maus	-	1:1	Hybridomaüberstand. Zur Verfügung gestellt von Theresia Stradal, Braunschweig
Sra-1 (4955 B)	Kaninchen	-	1:200	Zur Verfügung gestellt von Theresia Stradal, Braunschweig
V5	Kaninchen	-	1:1000	Biocompare/Biozol
β -Tubulin	Maus	1:1000	-	Sigma

2.8 Bakterien (*Escherichia coli*)

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i>	Invitrogen
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
TOP10	F ⁻ <i>mcr AΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80 lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 galU galK Δ(ara-leu)7697 rpsL (Str^R)endA1 nuG</i>	Invitrogen

2.9 Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Referenz
MAV 203	MATα, <i>leu2-3, 112, trp1-901, his3Δ200, ade2-101, cyh2^R, can1^R, gal4Δ, gal80 Δ, HIS3_{UASGAL1}::HIS3 LYS2, GAL1::lacZ, SPAL10::URA3</i>	Invitrogen

2.10 Eukaryote Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen (<i>Human Embryonic Kidney</i>) Kultivierung: 37°C	ATCC-Nr.CRL-1573
AB 8 ("MOIN")	Immortalisierte humane Podozyten; Kultivierung Proliferation: 33°C Kultivierung Ausdifferenzierung: 37°C	Saleem 2002
"Endlich"	Immortalisierte murine Podozyten; Kultivierung Proliferation: 33°C Kultivierung Ausdifferenzierung: 38°C	Schiwek 2004

2.11 Plasmide und Vektoren

Name	Beschreibung	Referenz
mod.pGEX.4T3.hPATJ. PDZ 7-10	PDZ-Domänen 7-10 von h.PATJ; (AS 1301-1891) GST-Tag	Katja Brinkmann, AG Pavenstädt, Münster
mod.pGEX.4T3.hPATJ. PDZ 8-10	PDZ-Domänen 8-10 von h.PATJ; (AS 1509-1891) GST-Tag	Katja Brinkmann, AG Pavenstädt, Münster
mod.pGEX.4T3.hPATJ. PDZ 9-10	PDZ-Domänen 9-10 von h.PATJ; (AS 1609-1891) GST-Tag	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster
pACT 2	<i>prey</i> -Vektor	Clontech
pACT 2-KIBRA	h.KIBRA, CDS, ohne Startmethionin	Thomas Liedtke, AG Barnekow, Münster
pAS 2.1	<i>bait</i> -Vektor	Clontech
pAS 2.1-h.Dendrin	h.Dendrin	Joachim Kremerskothen, AG Barnekow, Münster
pAS 2.1-m.Sra-1-LPxY	Fragment von m.Sra-1 (AS 632- 959), beinhaltet potentielles WW- Domänen-Bindungsmotiv (AS 852- 855)	Thomas Weide, AG Pavenstädt, Münster
pcDNA.3.1.h.KIBRA	h.KIBRA inkl. 3'UTR, V5-Tag (Ausgangsvektor: Invitrogen)	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pcDNA.6.h.KIBRA	h.KIBRA, CDS; FLAG- und His- Tag	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pCMV-dR8.74	Lentivirales Hilfsplasmid; kodiert für gag/pol Gene	Didier Trono, Genf, CH (www.tronolab.com)
pDBLeu	Y2H-System, <i>bait</i> -Vektor	Invitrogen (Matchmaker)
pDBLeu.h.PATJ.PDZ. 10	PDZ-Domäne 10 von h.PATJ; (AS 1760-1891)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.7	PDZ-Domäne 7 von h.PATJ; (AS 1301-1420)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.7- 10	PDZ-Domäne 7-10 von h.PATJ; (AS 1301-1891)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.7- 8	PDZ-Domäne 7-8 von h.PATJ; (AS 1301-1606)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.8	PDZ-Domäne 8 von h.PATJ; (AS 1509-1606)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster

Name	Beschreibung	Referenz
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.8-10	PDZ-Domäne 8-10 von h.PATJ; (AS 1509-1891)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDBLeu.h.PATJ.PDZ.9-10	PDZ-Domäne 9-10 von h.PATJ; (AS 1609-1891)	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDest22	<i>Gateway Destination prey</i> -Vektor	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDest22.KIBRA	h.KIBRA, CDS inkl. 3'UTR	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
pDest32	<i>Gateway Destination bait</i> -Vektor	Invitrogen
pDest32.PATJ.PDZ.9	PDZ-Domäne 9 von h.PATJ	Marc Schlüter, AG Pavenstädt, Münster
peGFP.C2	eukaryoter Expressionsvektor; exprimiert GFP	Clontech
peGFP.IJ.hKIBRA	h.KIBRA; GFP-Tag; peGFP.C2 mit MCS von pACTII, Clontech	Christian Plaas, AG Barnekow, Münster
pEXP AD 502	KIBRA-Klon (AS 359-1113)	Podozytenlibrary Invitrogen Pavenstädt/Benzing
pGEX.4T3, modifiziert (mod.)	prokaryoter Expressionsvektor; exprimiert GST	Christian Reinhardt, AG Walz, Freiburg
pGEX.h.KIBRA.C-term	C-Terminus von h.KIBRA; GST-Tag	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster
pGEX.h.KIBRA.C-term-4	C-Terminus von h.KIBRA ohne letzten 4 AA; GST-Tag	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster
pGEX-2TK-h.KIBRA.WW	WW-Domänen von h.KIBRA; (AS 1-86) WT o. dM; GST-Tag	Joachim Kremerskothen, AG Barnekow, Münster
pHURRA.F9.h.PATJ	h.PATJ, Flag- u. His-Tag	Christian Reinhardt, AG Pavenstädt, Münster
pLVTHM	Lentiviraler Vektor für RNAi	Didier Trono, Genf, CH (www.tronolab.com)
pLVTHM.sh1	<i>short hairpin</i> 1 h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pLVTHM.sh.3'UTR	<i>short hairpin</i> 3'UTR h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg

Name	Beschreibung	Referenz
pMD-2-VSVG	Lentivirales Hilfsplasmid; kodiert für <i>env</i> glycoprotein des <i>vesicular stomatitis virus</i> (VSV-G)	Didier Trono, Genf, CH (www.tronolab.com)
psiCHECK™-2 h.KIBRA	h.KIBRA inkl. 3'UTR; kodiert für 2 verschiedene Luciferasen als Reportergene (Ausgangsvektor: Promega)	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pSuper	eukaryoter Expressionsvektor, H1-Promoter	OligoEngine
pSuper.shKIBRA.1	<i>short hairpin</i> 1 h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pSuper.shKIBRA.3	<i>short hairpin</i> 3 h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pSuper.shKIBRA. 3'UTR	<i>short hairpin</i> 3'UTR h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pSuper.shKIBRA.4	<i>short hairpin</i> 4 h.KIBRA	Eva-Maria Schurek, AG Pavenstädt, Münster/AG Benzing, Freiburg
pSV42-Myc-KIBRA	h.KIBRA, inkl. 3'UTR; Myc-Tag	Stefan Veltel, AG Barnekow, Münster

2.12 Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
h.KIBRA.C-term- NdeI-for	CGCGCGCGCCAT ATGCTGGAGAAGCGGCAGATGG
h.KIBRA.C-term- BamHI-rev	CGCGGATCC TTAGACGTCATCTGCAGAGAGAGC
h.KIBRA.C-term-4- BamHI-rev	CGCGGATCC TTAAGAGAGAGCTGGGATATTCATC
h.KIBRA-MluI-for	CGCGGG ACGCGT ATGCCCCGGCCGGAGCTGCCC
h.Kibra-NotI-stop-rev	CGCGGG GCGGCCGCC TTAGACGTCATCTGCAGAGAG
h.Kibra-NotI-3'UTR- rev	CGCGGGGCGGCCGCC TGAATGGAGTCCCCACAGC

Name	Sequenz (5' → 3')
sh1 h.KIBRA-for	GATCCC GCAGCAACAAGACCAGAAA TTCAAGAGA (loop) TTTCTGGTCTTGTTGCTGC TTTTA
sh1 h.KIBRA-rev	AGCTTAAAAA GCAGCAACAAGACCAGAAA TCTCTTGAA (loop) TTTCTGGTCTTGTTGCTGC GGG
sh2 h.KIBRA-for	AGCTTAAAAA GCAGCAACAAGACCAGAAA TCTCTTGAA (loop) TTTCTGGTCTTGTTGCTGC GGG
sh2 h.KIBRA-rev	GATCCC GAATTCAGATTGCCCTGAA TTCAAGAGA (loop) TTCAGGGCAATCTGAATTC TTTTA
sh3 h.KIBRA-for	AGCTTAAAAA GAATTCAGATTGCCCTGAA TCTCTTGAA (loop) TTCAGGGCAATCTGAATTC GGG
sh3 h.KIBRA-rev	GATCCC AGGAGGCTCTGAGTGCACAA TTCAAGAGA (loop) TTGTGCACTCAGAGCCTCCT TTTTA
sh4 h.KIBRA-for	AGCTTAAAAA AGGAGGCTCTGAGTGCACAA TCTCTTGAA (loop) TTGTGCACTCAGAGCCTCCT GGG
sh4 h.KIBRA-rev	GATCCC GGACGCCTCAGACACTCTA TTCAAGAGA (loop) TAGAGTGTCTGAGGCGTCC TTTTA
sh3'UTR.h.KIBRA-for	AGCTTAAAAA GGACGCCTCAGACACTCTA TCTCTTGAA (loop) TAGAGTGTCTGAGGCGTCC GGG
sh3'UTR.h.KIBRA-rev	GATCCC CGTATTTCTTTGTTCCACT TTCAAGAGA (loop) AGTGGAACAAAGGAAATAC TTTTA

2.13 Software und Internetprogramme

Software/Programm	Anbieter/Hersteller
Axiovision 4.2	Zeiss
HiPic32, Hamatsu Photonics Deutschland GmbH	Hersching
Blockit RNAi	Invitrogen
http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/reference.php	Whitehead Institut
http://rsb.info.nih.gov/ij/	Image J
http://www.expasy.org/	(<i>Expert Protein Analysis System</i>) Swiss Institute of Bioinformatics
AMIRA	TGS Inc., San Diego, CA, USA

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die Standard-Methoden wurden dem Handbuch „*Molecular Cloning*“ von J. Sambrook, E. F. Fritsch und T. Maniatis, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, entnommen und gegebenenfalls wie beschrieben modifiziert. Andere Quellen sind im Folgenden angegeben.

3.1.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus eukaryoten Zellen wird das RNeasy Minikit von Qiagen nach Herstellerangaben (*Manual*) verwendet. Zur qualitativen Überprüfung der isolierten RNA werden ca. 150 ng in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Es sollten zwei distinkte Banden zu sehen sein (18 S und 28 S rRNA).

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA bzw. RNA wird photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Als Referenz dient das Lösungsmittel, in dem die Nukleinsäure in einer sinnvollen Verdünnung vorliegt. Eventuelle Verunreinigungen der Nukleinsäuren mit Proteinen werden durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm überprüft. Der Quotient OD 260 nm/OD 280 nm sollte zwischen 1.7 und 2.1 liegen.

3.1.3 Reverse Transkription

(Foley, 1993)[25]

Bei dieser Methode wird das retrovirale Enzym *Reverse Transkriptase* benutzt, um aus einer RNA-Matrize komplementäre DNA (cDNA) zu synthetisieren. Für eine Reverse Transkription (RT) werden pro 10 µl RT-Ansatz 100 ng RNA mit 1 µl dNTPs (10mM), 2 µl 5x RT-Puffer, 1 µl *Random Primer* (100 µM) und 0.1 µl M-MLV-RT (0,1 U/ng RNA) versetzt. Als Kontrolle einer eventuellen Verunreinigung mit genomischer DNA dient ein Ansatz ohne M-MLV-RT. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37°C, an die sich eine fünfminütige Inaktivierung bei 95°C anschließt.

3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Mullis et al. 1986[60])

Die Technik der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) wird eingesetzt, um spezifische DNA-Abschnitte mithilfe eines Sets von zwei DNA-Oligonukleotiden (*Primern*)

in einem Thermocycler zu amplifizieren. In Tabelle 3.1 sind verschiedene verwendete PCR-Bedingungen aufgelistet. Die amplifizierte DNA kann anschließend in einem Agarosegel durch elektrophoretische Auftrennung analysiert oder für eine Klonierung aufgereinigt werden. Die Reaktionsansätze für Sequenzierungsreaktionen werden nach erfolgter PCR im Sequenzierungslabor des Universitätsklinikum Münster abgeben und dort analysiert.

Tabelle 3.1 PCR-Bedingungen

Amplifikat	Primer	Pipettierschema	Bedingungen
h.KIBRA	KIBRA for/rev	50 µl 5 µl Pfu Puffer 10x 5 µl DMSO 100 ng <i>template</i> * 5 µl dNTPs 10mM 3 µl Primer for (5 pM) 3 µl Primer rev (5 pM) 1 µl Pfu DNA-Polymerase (5U/µl)	95°C 2 Min 95°C 45 Sec 55°C 1 Min 68°C 6 Min 68°C 10 Min 4°C ∞ 25 Zyklen
RT-PCR KIBRA GAPDH	KIBRA-RT for/rev	20 µl 4 µl 5x Taq-Puffer 2 µl Primer for (5 pM) 2 µl Primer rev (5 pM) 0.2 µl Taq-DNA-Polymerase(5U/µl) 4 µl RT-Reaktion	95°C 2 Min 95°C 1 Min 60°C 1 Min 72°C 1 Min 72°C 1 Min 4°C ∞ 35 Zyklen
h.KIBRA	KIBRA.C- term for/rev KIBRA.C- term-4 rev	50 µl 5 µl Pfu Puffer 10x 200 ng <i>template</i> * 1.5 µl dNTPs 10mM 3 µl Primer for (5 pM) 3 µl Primer rev (5 pM) 1 µl Pfu DNA-Polymerase (5U/µl)	94°C 5 Min 94°C 30 Sec 56°C 30 Sec 72°C 30 Sec 72°C 7 Min 4°C ∞ 25 Zyklen
Sequenzierung	Sequenzierung sprimer	10 µl 2 µl Big Dye 2 µl Big Dye Puffer 2 µl Primer for (5 pM) 2 µl Primer rev (5 pM) 600 ng <i>template</i>	96°C 10 Sec 95°C 1 Min 45°C 5 Sec 60°C 4 Min 4°C ∞ 25 Zyklen

* Myc-h.KIBRA pSV42/KIBRA peGFP.IJ

3.1.5 Restriktionsanalyse

Es werden 250 ng bis 1 µg DNA mit 1 bis 4 U der entsprechenden Restriktionsendonuklease mit dem für diese vorgesehenen Puffer versetzt und nach Angaben des Herstellers behandelt. Üblicherweise wird der Restriktionsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 10 Min bei 70°C hitzeinaktiviert.

3.1.6 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um einer Religation geschnittener Vektor-DNA vorzubeugen, v. a. bei der Verwendung von nur einer Restriktionsendonuklease, wird das 5'-Ende der linearisierten DNA durch den Einsatz von alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wird die DNA nach dem Restriktionsverdau in einem Volumen von 15 - 20 µl mit 0.5 µl (1U/µl) alkalischer Phosphatase (CIAP) und dem entsprechenden Puffer versetzt, für 30 Min bei 37°C und im Anschluss zur Inaktivierung der Phosphatase für 10 Min bei 65°C inkubiert.

3.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

(McDonell et al. 1977)[57]

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt in Agarosegelen (0.5 - 2 % w/v Agarose in 1 x TAE-Puffer) mit 0.005 % Ethidiumbromidlösung bei 100-130 V.

3.1.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten oder PCR-Reaktionslösungen aus Agarosegelen wird das *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up* System von Promega nach Herstellerangaben verwendet. Dazu wird die Probe (verdaute *Insert*- oder Vektor-DNA bzw. PCR-Ansatz) in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einem UV-Tisch aus dem Gel geschnitten. Die erfolgreiche Aufreinigung der DNA wird durch erneutes Auftragen eines Aliquots der Gel eluierten DNA verifiziert, wobei gleichzeitig eine Abschätzung der DNA-Menge erfolgt.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente zu klonieren, werden die aus Agarosegelen aufgereinigte *Insert*-DNA und Vektor-DNA in einem Mol-Verhältnis von 1:3 (bei kohäsiven Enden) in einem Volumen von 20 µl mit 2 U T4-DNA-Ligase und einer entsprechenden Menge T4-Ligase-Puffer versetzt und für 2 h bei RT inkubiert.

Anschließend wird der Bakterien-Stamm DH5α mit der Ligationsreaktion transformiert (Methoden, 3.3.3.2).

3.1.10 Plasmidpräparation

Um eine erfolgreiche Klonierung sicher zu stellen, werden einzelne Klone der transformierten Bakterien in Flüssigkultur (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) angeimpft und O/N bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgt nach Angaben des

Herstellers (Wizard[®] Plus SV Minipreps, Promega). Die aufgereinigten Plasmide werden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Zeigen die DNA-Fragmente die erwarteten Größen, schließt sich eine Sequenzierung (Tab.3.1 PCR-Bedingungen) dieser positiven Klone an.

3.1.11 Plasmidpräparation mit STET-Puffer

Neben den kommerziellen Reaktionspaketen (*Kits*) bieten sich so genannte „*Quick and Dirty*“-Methoden an, um den Erfolg einer Klonierung im größeren Maßstab kostengünstig zu untersuchen. Dabei werden die Bakterienzellen analog zu den Reagenzien eines *Kits* zunächst lysiert. Es folgt eine alkoholische Fällung der Plasmid-DNA, die anschließend in einem basischen Puffer gelöst und durch Restriktionsanalyse untersucht wird.

Von 5 ml O/N Kulturen wird pro Ansatz ca. 1 ml in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 480 µl STET-Puffer mit 20 µl Lysozym (10 mg/ml) resuspendiert und für 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend wird für 5 Min bei 95°C inkubiert und für 15 Min bei RT und 14.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird entfernt und der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt und vermischt. Nach einer Zentrifugation für 15 Min bei RT und 14.000 rpm wird der Überstand entfernt und das entstandene Pellet in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 resuspendiert. Zu dem folgenden Restriktionsverdau wird zusätzlich 100 µg/ml RNase A gegeben.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinexpression und Proteingewinnung im prokaryoten System

Das bakterielle Expressionssystem bietet den Vorteil, in kurzer Zeit große Proteinmengen gewinnen zu können. Bakterien sind jedoch nur in der Lage, Proteine bis zu einem Molekulargewicht von ca. 70 kD zu exprimieren, ohne dass es zu Degradationen dieses Proteins kommt.

3.2.1.1 GST-pulldown

Der GST-pulldown ist eine biochemische *in vitro* Methode, die sich eignet, um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen. Dazu wird ein rekombinantes GST-Fusionsprotein im bakteriellen Expressionssystem hergestellt und an Glutathion-Sepharose (*GS-beads*) immobilisiert. Es folgt die Inkubation dieses Fusionsproteins mit einem Zellysat, das den

potentiellen Interaktionspartner enthält. Der Nachweis dieser potentiellen Interaktion wird durch *Western Blot* Analyse ermittelt.

Die Expression des rekombinanten GST-Fusionsproteins erfolgt durch das pGex-Vektorsystem. Dieser bakterielle Expressionsvektor enthält das Gen *Glutathion-S-Transferase* (GST), hinter welches das gewünschte Gen kloniert wird [28]. Die Proteinexpression resultiert in einem Fusionsprotein, das mit hoher Affinität an Glutathion bindet. Im Versuch wird diese Affinität genutzt, um das Fusionsprotein an einer Glutathion-Sepharose-Matrix zu immobilisieren und dadurch von den endogenen bakteriellen Proteinen zu trennen.

3.2.1.2 Herstellung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Der *E. coli*-Stamm BL21 wird mit 100 ng Plasmid-DNA transformiert (Vgl. 3.3.3.2). Von den gewachsenen Kolonien wird ein Klon in 50 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum vorkultiviert und zum Animpfen einer 1 l Hauptkultur benutzt. Die Hauptkultur wird bei einer OD_{600nm} von 0.6 mit 1 mM IPTG versetzt und für 2 - 3 h bei 30°C weiter kultiviert. Durch Zentrifugation bei 4.500 rpm für 20 Min bei 4 °C werden die Bakterienzellen pelletiert und anschließend in 15 ml *Column*-Puffer resuspendiert. Es folgt ein Einfrierschritt zur weiteren Lyse der Bakterienzellwände und zum Aufbrechen eventueller Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in flüssigem Stickstoff. Die lysierten, schockgefrorenen Bakterien werden auf Eis aufgetaut, einer Ultraschallbehandlung (3 x 30 Sek 50 %) unterzogen und erneut bei 12.000 rpm und 4 °C für 20 Min zentrifugiert. Der entstandene Überstand („*crude lysate*“) wird zum Schutz vor Proteasen mit 0.25 mM PMSF versetzt.

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung der GST-Fusionsproteine

Zur Konzentrationsbestimmung des rekombinanten Fusionsproteins wird 1 ml *crude lysate* mit 20 µl equilibrierter Glutathion Sepharose (*GS beads*) inkubiert. Nach 1 h Inkubation bei 4°C O/H folgen drei Waschschrte mit *Column*-Puffer. Das rekombinante GST-Fusionsprotein ist nun an der GS-Sepharose immobilisiert und wird mit 20 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer für 5 Min bei 95°C gekocht.

Zusammen mit einer BSA-Standardreihe (1, 2.5 und 5 µg Protein) wird die Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um anschließend mit einer *Coomassie*-Färbung die Konzentration zu ermitteln. Das übrige *crude lysate* kann direkt für einen *pulldown* eingesetzt oder bis zu seiner Verwendung bei -80°C gelagert werden.

3.2.1.4 Durchführung des GST-pulldowns

Für den GST-pulldown werden 1 - 10 µg des GST-Fusionsproteins an 20 µl equilibrierter Glutathion-Sepharose immobilisiert und nach fünfmaligem Waschen mit *Column*-Puffer mit Zell- oder Gewebelysat (50 - 100 µg Gesamtprotein) versetzt. Es schließt sich eine Inkubation von 3 - 5 h bei 4°C O/H an. Nach weiteren fünf Waschschritten mit IP-Puffer wird die Probe mit 20 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer für 5 Min bei 95°C gekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss folgt eine *Western Blot* Analyse.

3.2.2 Proteinexpression und Proteingewinnung im eukaryoten System

Für die Gewinnung endogen exprimierter Proteine aus kultivierten, eukaryoten Zellen, kann je nach gewünschter Proteinzusammensetzung eine Fraktionierung erfolgen oder ein Vollysat hergestellt werden. Um die zytosolische Proteinfraction zu gewinnen, werden die Zellen einer konfluenten 10 cm Kulturschale zunächst mit 1 x PBS (4°C) gewaschen. Mit einem Zellschaber werden die Zellen in 10 ml 1 x PBS (4°C) mechanisch von der Kulturschale gelöst und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 4°C für 5 Min und 1.000 rpm wird das entstandene Zellpellet auf Eis in 300 µl IP-Puffer (Gebrauchslösung, frisch angesetzt) lysiert. Während einer 15 Min Inkubation auf Eis erfolgt eine mechanische Homogenisierung des Lysats mit einer 1 ml Spritze mit Kanüle (20G). Es schließt sich eine Zentrifugation für 15 Min bei 4°C und 18.000 rpm an. Der Überstand mit den löslichen, zytosolischen Proteinen kann bei -80°C gelagert oder für ein Experiment eingesetzt werden. Um größere Mengen eines gewünschten Proteins zu gewinnen, das ein zu hohes spezifisches Molekulargewicht für das bakterielle Expressionssystem hat, können eukaryote Zellen mit einem geeigneten Expressionsvektor transfiziert werden (Vgl. 3.3.4). Diese verstärkt exprimierten, posttranslational modifizierten Proteine werden analog zu den endogen exprimierten Proteinen gewonnen. Die Proteine werden 24 - 48 h nach der Transfektion gewonnen.

3.2.3 Proteingewinnung aus isolierten Rattenglomeruli

Die verwendeten Rattennieren stammten aus Transplantationsexperimenten, bei denen jeweils einem Empfänger- und einem Spendertier eine Niere entnommen wurde. Frisch gewonnene, ausgeblutete Rattennieren werden zunächst dekapiliert, indem mit Hilfe einer spitzen Pinzette vorsichtig eine die einzelne Niere umgebende Membran entfernt wird. Die Nieren werden in eine 14 cm Petrischale überführt. Alle weiteren Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Die einzelnen Nieren werden längs halbiert und das Nierenmark entfernt. Der

den Grossteil der Glomeruli beinhaltende Kortex wird in kleine Stücke geschnitten und durch ein steriles Sieb mit $\text{\O} 150 \mu\text{m}$ Porengrösse gedrückt, unter das ein steriles Auffangbehältnis platziert wurde. Mit vorgekühltem RPMI 1640 Medium werden auf dem Sieb zurück gebliebene Gewebereste durch das Sieb gespült. Dieser Schritt wird mit Sieben der Porengrössen $\text{\O} 100 \mu\text{m}$ und $\text{\O} 51 \mu\text{m}$ wiederholt, welche aus feinmaschigem Gewebe bestehen, die in Metallrahmen eingespannt werden. Die Flüssigkeit aus dem Auffangbehältnis, welche die Glomeruli beinhaltet, wird für 5 Min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird 2 x mit vorgekühltem RPMI 1640 Medium und 2 x mit vorgekühltem 1 x PBS gewaschen. Die erfolgreiche Isolation der Glomeruli wird mikroskopisch kontrolliert. Nach dem letzten Waschschrift wird das entstandene Pellet zur Proteingewinnung in IP-Puffer lysiert (ca. $350 \mu\text{l}$ /Niere). Das Glomerulilysat kann bei -80°C gelagert oder direkt für einen Versuch eingesetzt werden.

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)[47]

Um Proteine nach ihrer molekularen Grösse aufzutrennen, werden SDS-Polyacrylamidgele (SDS-PAA-Gele) mit diskontinuierlichem Puffersystem verwendet. Trenn- und Sammelgele werden nach den in Tabelle 3.2 angegebenen Rezepturen hergestellt. Die Lösung für das Trenngel wird in eine Gelkassette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel vollständig polymerisiert ist, wird das Isopropanol entfernt. Das Sammelgel wird auf das Trenngel gegossen. Ein Plastikamm mit Aussparungen für die spätere Proteinbeladung wird in das Sammelgel platziert. Bevor das Gel mit den Proteinproben beladen wird, werden diese in Laemmli-Probenpuffer für 5 Min bei 95°C denaturiert. Ein Proteingrösßenstandard (Marker, Precision Plus Protein Dual Colour Standard, Biorad) wird neben den Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 175 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel unter Verwendung von 1 x Protein-Laufpuffer.

Tabelle 3.2 Rezepturen für SDS-PAA-Gele

Komponenten	Trenngel (10 %)	Sammelgel (5 %)
30 % Acrylamide/Bis Solution	3.3 ml	900 μl
H ₂ O	4.0 ml	2.7 ml
1 M Tris/HCl pH 6.8	-	1.3 ml
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	2.5 ml	-
10 % SDS	100 μl	50 μl
10 % APS	100 μl	50 μl
TEMED	4 μl	5 μl
Gesamtvolumen	10 ml	5 ml

3.2.5 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Nach der Gelelektrophorese wird das Gel für 5 - 10 Min in Fixierlösung und für 30 Min (bis O/N) in der *Coomassie*-Gebrauchslösung inkubiert. Im Anschluss wird das Gel mit *Destaining Solution* entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden. Mit Hilfe eines *Durchlicht Scanners* erfolgt eine Aufnahme des Gels.

3.2.6 Western Blot

Zur Durchführung eines „*semi-dry*“ Western Blots wird ein 3 mm starkes Whatmanpapier in Größe des Gels in Transferpuffer getränkt. Darauf wird eine in Methanol equilibrierte PVDF-Membran gelegt. Als nächstes wird das SDS-PAA-Gel auf der Membran platziert, worauf sich wieder ein Whatmanpapier anschließt. Diese Mehrschichtung wird gut in Transferpuffer getränkt und frei von Luftblasen auf die Graphit-Anode der Blotkammer gelegt, welche mit der Kathode verschlossen wird. Da die negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert werden sollen, ist darauf zu achten, dass die Membran zwischen Gel und Anode zu liegen kommt. Der Proteintransfer erfolgt bei 12 V für 2 h. Zur Überprüfung des erfolgten Transfers wird die Membran in Ponceau-S-Lösung inkubiert und mit TBS-T gewaschen, bis eindeutige Proteinbanden zu erkennen sind. Nach einer vollständigen Entfärbung der Membran wird mit der Antikörper-Detektion fortgefahren.

3.2.6.1 Immunologische Nachweise

Bevor es zum Einsatz von Antikörpern kommt, wird die PVDF-Membran zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen für 1 h bei 37°C oder O/N bei 4°C in 5 % BSA-Lösung in TBS-T geblockt. Die nachfolgenden Waschschrte und die Verdünnung der Antikörper erfolgt in TBS-T.

Es folgt der immunologische Nachweis durch Inkubation mit dem spezifisch bindenden Primäantikörper für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen für 5 Min folgt eine Inkubation mit dem peroxidasekonjugierten Sekundäantikörper. Nach erneutem, intensivem Waschen der Membran, erfolgt die Detektion der Proteinbanden durch die ECL-Reaktion (Vgl. Material 2.3.1). Das durch die Peroxidasereaktion entstehende Licht wird mit einem Röntgenfilm detektiert.

3.2.7 Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts

Das Pilzgift Phalloidin bindet spezifisch an das Aktin-Zytoskelett. Indem Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Phalloidin behandelt werden, kann das Aktin-Zytoskelett

mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden. Dazu wird das hergestellte Präparat mit grünem Licht der Wellenlänge 594 nm angeregt und emittiert in Folge dessen rotes Licht.

Für die Durchführung des Experiments werden konfluente Zellen, die auf Deckgläschen kultiviert wurden, mit 1 x PBS (RT) gewaschen und für 20 Min mit 2 % PFA fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x PBS, folgt für 10 Min das so genannte *Quenschen* mit 50 mM NH₄Cl in 1 x PBS, das der Absättigung reaktiver Formaldehydgruppen dient. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1 x PBS, werden die Zellen mit 0.2 % Triton X-100 in 1 x PBS für 5 Min permeabilisiert. Es wird dreimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT in 2 % BSA in 1 x PBS geblockt. Eine mit dem Farbstoff Alexa Fluor[®] 594 gekoppelte Phalloidin-Lösung (Molecular Probes, Oregon, USA) wird 1:200 in 2 % BSA in 1 x PBS verdünnt. Pro Deckgläschen (Ø 1 cm) sind 50 µl der verdünnten Phalloidin-Lösung ausreichend. Die Inkubation erfolgt für 1 h in einer abgedunkelten Kammer, da der Fluoreszenzfarbstoff lichtsensitiv ist. Nach drei Waschschritten mit 1 x PBS wird einmal mit H₂O gewaschen. Die Deckgläschen werden auf Objektträgern mit einem Tropfen *Crystal Clear Mounting* Medium eingebettet und O/N zur Aushärtung dunkel bei RT gelagert. Die Auswertung erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop unter Einsatz eines entsprechenden Filters. Mit einer an das Mikroskop gekoppelten Kamera (Zeiss) werden die Ergebnisse dokumentiert und ausgewertet.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Im Gegensatz zu der Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts beruht die Methode der Immunfluoreszenz, analog zum Western Blot, auf der Anfärbung von Proteinen durch spezifische Antikörper. Die Arbeitsschritte werden wie unter 3.2.7 durchgeführt, wobei anstelle der Phalloidin-Lösung ein Primär-Antikörper in einer sinnvollen Verdünnung eingesetzt wird (Vgl. 2.7 Antikörper). Nach einer einstündigen Inkubation bei RT folgt dreimaliges Waschen mit 1 x PBS, woran sich eine weitere einstündige Inkubation mit dem lichtsensitiven, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper, der gleichermaßen in der Blocklösung verdünnt wird, anschließt. Das weitere Procedere, einschließlich der Dokumentation und der Auswertung, erfolgt analog der Phalloidin-Färbung.

3.3 Zellbiologische und Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Hefen, Bakterien und eukaryoten Zellen

3.3.1.1 Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die Kultivierung von Hefen erfolgt in YPAD-Medium bei 250 rpm oder auf YPAD-Agarplatten bei 30°C. Um mit einer Kultivierung zu beginnen, wird eine geringe Menge einer Glycerinkultur des gewünschten Hefestammes mit einer sterilen Impföse auf eine YPAD-Agarplatte überführt. Es folgen ein Vereinzelausstrich und eine Inkubation bei 30°C. Nach 2 - 4 Tagen kann eine einzelne Hefekolonie in Flüssigmedium überführt und in Kultur genommen werden. Die Flüssigkulturen werden täglich mit frischem Medium versorgt, um die Wachstumsphase der Hefezellen zu erhalten. Analog zu der Kultivierung auf diesem so genannten Vollmedium können die Hefezellen zur Selektion auf SD-Medium (Material, 2.4.2) kultiviert werden.

Auf Agarplatten kann eine Lagerung bei 4°C erfolgen, wobei zur langfristigen Lagerung der Hefezellen bei -80°C eine Glycerinkultur hergestellt wird. Dazu wird zu einer über Nacht (O/N) gewachsenen Flüssigkultur 25 % (v/v) Glycerin zugesetzt.

3.3.1.2 Bakterien (*Escherichia coli*)

Bakterien werden gleichermaßen als Flüssigkultur in LB-Medium bei 250 rpm oder auf LB-Agarplatten bei 37°C kultiviert (Material, 2.4.1). Die Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums erfolgt zur Selektion transformierter Bakterien. Eine kurzfristige Lagerung kann ebenfalls bei 4°C erfolgen, für eine dauerhafte Lagerung wird analog zu den Hefen eine Glycerinkultur hergestellt.

3.3.1.3 Kultivierung eukaryoter Zellen

Die verwendeten Zelllinien werden in 10 cm Gewebekulturschalen unter sterilen Bedingungen mit einem entsprechenden Nährmedium kultiviert (Material, 2.4.3). Sobald die Zellen einen konfluenten Zellrasen (*Monolayer*) gebildet haben, werden sie in einem sinnvollen Verhältnis geteilt und weiter kultiviert. Diese Passagierung (= *Splitten*) erfolgt alle 2 - 3 Tage, wobei durch Zugabe von Trypsin das Ablösen der Zellen eingeleitet wird. Dazu wird das Medium abgenommen und die Zellen werden gewaschen, indem pro 10 cm Kulturschale ca. 10 ml vorgewärmtes 1 x PBS vorsichtig in die Kulturschale gegeben wird. Es folgt eine Inkubation mit 1 ml Trypsin/EDTA pro 10 cm Kulturschale für 2 - 3 Min bei 37°C. Nachdem sich die

Zellen abgelöst haben, wird die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 9 ml vorgewärmten Mediums neutralisiert. Die Zellen werden resuspendiert und auf neue Kulturschalen verteilt, in denen ein entsprechendes Volumen vorgewärmten Mediums vorgelegt wurde. Die immortalisierten Podozytenzelllinien wurden mit einem temperatursensitiven *Large T-Antigen* transformiert, wodurch die Proliferation dieser Zellen ausschließlich auf die Kultivierung bei 33°C beschränkt ist. Aus diesem Grund werden nur bei 33°C kultivierte Podozyten geteilt. Zur Differenzierung werden die Podozyten für 10 - 14 Tage bei 37°C (Humane Podozyten) bzw. 38°C (Murine Podozyten) kultiviert. Die Kultivierung und Passagierung der HEK 293T Zellen erfolgt bei 37°C.

3.3.1.4 Einfrieren eukaryoter Zellen

Die dauerhafte Lagerung eukaryoter Zellen erfolgt in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff. Für das Einfrieren werden ca. 10^6 Zellen nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS wie beschrieben trypsinisiert und in dem entsprechenden Kulturmedium resuspendiert. Es folgt eine Zentrifugation für 5 Min bei 1.000 rpm bei RT. Das Zellpellet wird in 1 ml FCS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgt zunächst für 24 h bei -20°C, um das langsame Einfrieren der Zellen zu gewährleisten. Anschließend werden die Zellen für weitere 24 h in -80°C transferiert. Für die dauerhafte Konservierung werden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.1.5 Auftauen eukaryoter Zellen

Die Zellen werden bei RT aufgetaut, in vorgewärmtes Medium überführt und für 5 Min bei 1.000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das entstandene Zellpellet in entsprechendem Medium resuspendiert, in eine Zellkulturschale überführt und bei 33°C (Podozyten) bzw. 37°C (HEK 293T) in Kultur genommen.

3.3.2 Das Yeast Two-Hybrid System

Das von Fields und Song entwickelte *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) System dient der Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen [23]. Es handelt sich dabei um ein *in vivo* Modell, bei dem in einem Hefesystem ein bekanntes Protein als Köder (*bait*) eingesetzt wird, um neue Interaktionspartner zu identifizieren. Als potentielle Beute (*prey*) wird eine Genbank (cDNA *library*) angeboten, die in ihrer Proteinexpression auf spezifische Gewebe oder Zelltypen beschränkt sein kann. Die Methode beruht auf dem modularen Aufbau des endogenen Transkriptionsaktivators *GAL 4* der Hefe. Dieser setzt sich aus einer DNA

bindenden (DB) und einer DNA aktivierenden (DA) Domäne zusammen. Die räumliche Nähe dieser beiden Domänen führt zu einer Bindung und anschließenden Aktivierung der Reportergene lacZ und His3, die unter der Kontrolle von *GAL 4* stehen. Für den *Yeast Two-Hybrid Screen* werden diese beiden Domänen getrennt und auf verschiedenen Vektoren exprimiert, wobei das *bait* zusammen mit der DB exprimiert wird. Die *prey*-Vektoren exprimieren zufällige Fusionsproteine aus der Genbank und der DNA aktivierenden Domäne. Die *bait*-Vektoren kodieren zusätzlich für eine Leucin-Auxotrophie, die *prey*-Vektoren für eine Tryptophan-Auxotrophie. Die Transformation dieser Vektoren in Hefezellen ermöglicht ein Wachstum auf Selektionsmedium, das kein Leucin und Tryptophan enthält (SD-L-T). Einige Hefestämme wachsen trotz Mutation im His3-Gen in geringem Maße auf histidundefizientem Medium. Aus diesem Grund wird Medium ohne Histidin (SD-L-T-H) mit dem kompetitiven Inhibitor dieses Genprodukts, 3-Amino-1, 2, 4-triazol (3-AT), ergänzt, indem 25 - 50 mM 3-AT zugegeben werden. Wachsen die ko-transformierten *GAL 4*-defizienten kompetenten Hefezellen auch auf SD-L-T-H + 3-AT Agarplatten, kann ein so genannter β -Galaktosidase Filter Assay durchgeführt werden. Die Hefekolonien, die in diesem Assay eine Blaufärbung zeigen, exprimieren das Reportergen, was als Hinweis für eine Protein-Protein-Interaktion gedeutet werden kann.

3.3.2.1 Herstellung kompetenter Hefezellen

Ein Volumen von 50 ml YPAD-Medium wird mit einer O/N Flüssigkultur des zu transformierenden Hefestammes angeimpft und auf eine OD_{600nm} von 0.2 eingestellt. Es folgt eine Inkubation bei 250 rpm und 30°C bis eine OD_{600nm} von 0.6 - 0.8 erreicht ist. Die Hefezellen werden bei RT für 3 Min und 2000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet in sterilem H₂O resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei gleichen Bedingungen wird das Pellet in 3 - 5 ml 50 % (w/v) PEG 4000 resuspendiert. Die kompetenten Hefezellen sollten innerhalb der nächsten Stunde transformiert werden, um eine hohe Effizienz zu erzielen.

3.3.2.2 Transformation von Hefen

Für einen 30 μ l Transformationsansatz werden 100 ng pro Plasmid-DNA eingesetzt. Zu diesem Ansatz werden 720 μ l der kompetenten Hefezellsuspension, 108 μ l 1 M Lithiumacetat und 135 μ l H₂O gegeben. Nach guter Durchmischung folgt eine Inkubation von 30 Min bei 30°C und 250 rpm. Im Anschluss daran werden die Hefezellen für 30 Min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, 5 Min auf Eis inkubiert und für 3 Min bei RT und 2.000 rpm

zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird in 100 µl H₂O resuspendiert und auf entsprechenden SD-Selektionsplatten (Vgl. Material 2.4.2.2) ausgestrichen. Die Platten werden für 2 - 4 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

3.3.2.3 β -Galaktosidase Filter Assay (*β -Gal-Assay*)

Der *β -Galaktosidase* Assay beruht auf der Expression des Reportergens lacZ, das für β -Galaktosidase kodiert, welche die Hydrolyse von X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galaktopyranosid) zu einem blauen Indigo-Farbstoff katalysiert. Für die Durchführung des β -Gal-Assays werden je Ansatz zwei Filterpapiere vorbereitet, die einen geringfügig kleineren Durchmesser aufweisen als die SD-Selektionsplatten, auf denen die zu testenden Hefen wachsen. Unter einem Laborabzug wird pro Ansatz je ein Filterpapier in einem geeigneten Gefäß mit X-Gal-Gebrauchslösung inkubiert. Für ein Ø 10 cm Gefäß sind 2.5 ml der X-Gal-Gebrauchslösung ausreichend. Das zweite Filterpapier wird direkt auf die Hefekolonien gelegt und gleichmäßig angedrückt. Sobald sich ein Abdruck der Hefekolonien auf dem Filterpapier zeigt, wird dieses unter Zuhilfenahme einer Pinzette für 10 Sek. in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Das gefrorene Filterpapier wird bei RT aufgetaut und mit der Seite des Hefe-Abdrucks auf das in X-Gal-Lösung getränkte Filterpapier gelegt. Nach 2 - 3 h sollte eine Blaufärbung optisch einwandfrei zu erkennen sein.

3.3.3 Transformation von Bakterien

3.3.3.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Der *E. coli* Stamm wird auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und O/N bei 37°C inkubiert. 10 ml TYM-Medium werden mit einer Kolonie angeimpft und bei 37°C und 250 rpm für ca. 4 - 5 h inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0.5 - 0.6 erreicht ist. Die Vorkultur wird mit TYM-Medium auf 100 ml aufgefüllt und weiter für ca. 1.5 h inkubiert. Die Kultur wird anschließend mit TYM-Medium auf 400 ml aufgefüllt, für eine weitere Stunde inkubiert und anschließend für 10 Min in einem Eiswasserbad unter Schwenken abgekühlt. Die Bakterien werden für 10 Min bei 4°C und 2.500 x g in einer vorgekühlten Zentrifuge pelletiert. Es folgt eine Resuspension der Bakterien in 100 ml vorgekühltem Tfb1 und eine neuerliche Zentrifugation für 10 Min bei 4°C und 2.500 x g. Die Bakterien werden in 10 ml eiskaltem Tfb2 resuspendiert und in 300 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots werden in -80°C überführt, was eine dauerhafte Lagerung ermöglicht. Es wird je ein Aliquot auf einer LB-Platte mit Kanamycin und Ampicillin ausgestrichen und O/N bei 37°C

inkubiert, um eine unerwünschte Ausbildung spontaner Antibiotikaresistenzen auszuschließen. Durch die Transformation von 1 ng einer bekannten Plasmid-DNA wird die Kompetenz der hergestellten Bakterien ermittelt, wobei ein Wert von 10^7 Kolonien/ μg erreicht werden sollte.

3.3.3.2 Transformation

Für die Transformation mit Plasmid-DNA wird ein Aliquot des kompetenten *E. coli* Stammes auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA (Bakterien: Plasmid-DNA 10:1) versetzt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Anschließend wird ein Hitzeschock für 45 Sek bei 42°C durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 Min auf Eis wird die Bakteriensuspension mit 300 μl SOC-Medium für 1 h bei 37°C und 250 rpm ankultiviert. Die Selektion erfolgt nach dem Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agarplatten, die ein entsprechendes Antibiotikum beinhalten.

3.3.4 Transfektion eukaryoter Zellen

Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen

Die transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen erfolgt mittels Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitaten. Die Zellen werden am Abend vor der Transfektion so geteilt, dass sie am nächsten Morgen zu ungefähr 60 % konfluent sind. Für die Transfektion einer 10 cm Zellkulturschale werden in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 500 μl 0.25 M Calciumchlorid (RT) und 10 μg Plamid-DNA vorgelegt. Unter Vortexen wird 500 μl 2 x HEBS (4°C) tropfenweise dazugegeben. Anschließend wird die Transfektionslösung gleichmäßig tropfenweise auf den Zellen verteilt und die Zellkulturschale vorsichtig geschwenkt. Die Zellen werden im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Nach 8 h erfolgt ein Mediumwechsel, der die Transfektionsreaktion beendet. 24 - 48 h nach der Transfektion können die Zellen für die Protein- oder RNA-Gewinnung lysiert oder für andere Versuche eingesetzt werden.

3.3.5 Adhäsionsassay

Mit einem Adhäsionsassay kann der Einfluss verschiedener Parameter auf die Adhäsion von Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen gewonnen werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst trypsiniert und unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld GmbH, Germany) wird die Zelldichte bestimmt. Mit der Zugabe eines entsprechenden Volumens an Kulturmedium werden die Zellen auf eine Dichte von 30 000 Zellen/ml gebracht. Anschließend wird jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein

Well einer mit Kollagen A (50 µg/ml) beschichteten 12 *Well*-Zellkulturplatte gegeben. Es folgt eine Inkubation für 1 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen mit 1 x PBS werden die Zellen mit 3,5 % PFA fixiert.

Von den fixierten Zellen werden unter Zuhilfenahme eines Mikroskops (Axiovert 20, Zeiss, Germany) digitale Bilder angefertigt und die auf ihnen abgebildeten Zellen pro *Well* gezählt. Zum Anfertigen der Bilder wird die Software HiPic32, zum Zählen der Zellen die Software AMIRA verwendet. Die Anzahl der gezählten adhärennten Zellen pro *Well* wird als Maß für die Stärke der Bindung zwischen Zellen und Kollagen-Matrix gewertet.

3.3.6 Migrationsassay

3.3.6.1 Migrationsexperimente mittels Videomikroskopie

Für die Durchführung von Migrationsexperimenten werden die Zellen in Kollagen A (50 µg/ml) beschichteten 12.5 cm² Zellkulturflaschen (Falcon) kultiviert, die sich bei Bedarf fest verschließen lassen. Bei dem Aussäen der Zellen wird ein Verdünnungsfaktor gewählt, der gewährleistet, dass die Zellen am Versuchstag vereinzelt vorliegen.

Die Zellkulturflaschen werden für den Versuch fest verschlossen, um einem Gasaustausch vorzubeugen und den pH-Wert des Mediums konstant zu halten. Dann werden die Flaschen in beheizbare Experimentierkammern (Eigenbau, Elektrowerkstatt des Physiologischen Instituts) bei 37°C eingesetzt, die auf den Tischen von invertierten Phasenkontrastmikroskopen (Axiovert 40c und Axiovert 20, Zeiss, Deutschland) platziert sind. Die Bildausschnitte werden so gewählt, dass die Migration einzelner Zellen möglichst störungsfrei beobachtet werden kann. Die Dauer eines Experimentes erstreckt sich über einen Zeitraum von 300 Min, wobei in Zeitintervallen von 1 - 5 Min durch eine an das Mikroskop gekoppelte Videokamera (Modell XC-ST70CE Hamamatsu/Sony, Japan) jeweils ein Bild aufgenommen wird. Für die gesamte Dauer des Versuches ist eine konstante Temperatur von 37°C gewährleistet.

Die digitale Aufzeichnung der Bilder wird durch den Einsatz der Computer-Software HiPic32 (Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching, Germany) kontrolliert und durchgeführt. Die digitalen Bilder der Zellen werden unter Verwendung der Software AMIRA (TGS Inc., San Diego, CA, USA) bearbeitet, wobei der Zellumfang markiert wird und als Basis für die weitere Analyse dient. Zur Auswertung werden alle Zellen herangezogen, die im Zuge ihrer Migration weder den beobachteten Bildausschnitt verlassen, noch sich teilen oder mit anderen Zellen kollidieren. Die Parameter

Migrationsgeschwindigkeit, Translokation, Strukturindex (SI) und Zellfläche werden unter Verwendung der Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) sowie selbst geschriebener Computerprogramme ermittelt. Image J stützt seine Berechnungen auf die Auswertung der zuvor mit der AMIRA-Software bearbeiteten digitalen Videobilder.

Die Geschwindigkeit der Zellmigration wird als Bewegung des durch das Programm errechneten Zellmittelpunktes pro Zeiteinheit bestimmt. Die Zellfläche wird über die Anzahl der von der Zelle eingenommenen digitalen Bildpunkte („Pixel“) errechnet. Hierbei entspricht die Länge eines Pixels, je nach verwendetem Mikroskop 0,56 µm (Axiovert 40c) bzw. 0,675 µm (Axiovert 25).

Der Strukturindex (SI) stellt ein Maß für die Morphologie der Zelle dar und wird anhand folgender Formel errechnet:

$$SI = (4\pi A) / p^2$$

Bei dieser Berechnung steht **A** für die Zellfläche und **p** für den Zellumfang. Ein Wert von 1 entspricht einer kugelförmigen Zelle, während ein Wert, der gegen 0 tendiert, eine gestreckte bzw. dendritische Zelle darstellt (Abbildung 3.1).

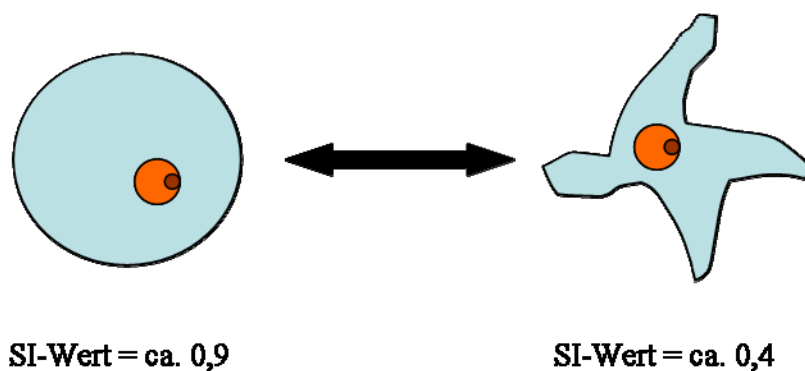


Abbildung 3.1: Der Strukturindex (SI) als Maß für die Morphologie einer Zelle.

Die Schemazeichnung verdeutlicht den durch den SI repräsentierten Wert. Während die linke Zeichnung einer Zelle in etwa einem SI-Wert von 0,9 entspricht, liegt der SI-Wert der rechten Zelle ungefähr bei 0,4.

3.3.6.2 Statistische Absicherung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) des Mittelwertes angegeben. Zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse wurde der Student's t-Test verwendet. Ergebnisse wurden als signifikant unterschiedlich angesehen bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0,05 \pm 0,01$ und sind in den Abbildungen gekennzeichnet (*). Die Gesamtzahl der ausgewerteten Zellen einer Versuchsreihe ist jeweils angegeben.

3.3.7 Wound Healing Assay

Das Einbringen einer Wunde in einen konfluenten Zellrasen (*Monolayer*) führt zu einem gerichteten Einwandern von Zellen, die diese Wunde wieder verschließen. Im Experiment werden Zellen in Kollagen A (50 µg/ml) beschichteten 12.5 cm² Zellkulturflaschen kultiviert bis ein konfluenter *Monolayer* ausgebildet ist, in den mithilfe einer 10 µl Pipettenspitze eine Wunde eingebracht wird. Es folgen 3 Waschschrte mit 1 x PBS, um abgelöste Zellen zu entfernen. Die Zellen werden danach mit Kulturmedium für 1 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Analog zu den Migrationsexperimenten wird das Migrationsverhalten der Zellen per Videomikroskopie dokumentiert und ausgewertet, wobei die Dokumentation über einen Zeitraum von 10 h verläuft und alle 3 - 5 Minuten eine Aufnahme per Videomikroskopie angefertigt wird.

3.4 RNA-Interferenz

(Fire, Mello 1998)[24]

Der intrazelluläre Mechanismus der RNA-Interferenz beruht auf dem *Silencing* Effekt doppelsträngiger RNA (dsRNA). Ursprünglich wurde angenommen, es handele sich hierbei um einen reinen Schutzmechanismus des Genoms vor der Integration von RNA-Viren und Transposons. Mit der Entdeckung der Mikro-RNAs (miRNAs) im Genom von Pflanzen, Tieren und Pilzen wurde das grundlegende Prinzip der Existenz doppelsträngiger RNAs (dsRNA) in eukaryoten Zellen erkannt. Haarnadelförmige dsRNAs, *short hairpin* RNAs (shRNAs), werden in der Zelle nach der Transkription in miRNAs prozessiert und führen durch die Degradation einer komplementären mRNA zu einer reduzierten Expression des Zielproteins. Die Aufklärung der generellen Funktion der RNA-Interferenz bei der Regulation der Genexpression wurde durch die Untersuchung der dsRNAs deutlich. Das Prinzip der RNA-Interferenz beruht auf den zwei Enzymkomplexen Dicer und RISC (*RNA interfering silencing complex*). Dabei werden längere doppelsträngige RNA-Moleküle und shRNAs von dem Dicer-Komplex erkannt und in kürzere Fragmente zerschnitten, wobei kurze RNA-Duplexe mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden mit zwei Nukleotiden Überhang am jeweiligen 3'-Ende entstehen (Abbildung 3.2). Der zweite Enzymkomplex, RISC, trennt diese kürzeren, so genannten *short interfering* RNAs (siRNAs) auf und bindet den Strang der siRNA, der am 5'-Ende weniger starke Basenpaarungen (A-T) aufweist. Mit diesem gebundenen Strang vermittelt der RISC-Komplex die Anlagerung an eine komplementäre mRNA und führt zu deren Degradation.

Der Mechanismus der RNA-Interferenz wird in der Forschung eingesetzt, indem spezifische siRNAs in Zellen eingeführt werden, die den *knock down* einer komplementären mRNA induzieren und so die Untersuchung des erzielten Effekts auf die Zellen erlauben.

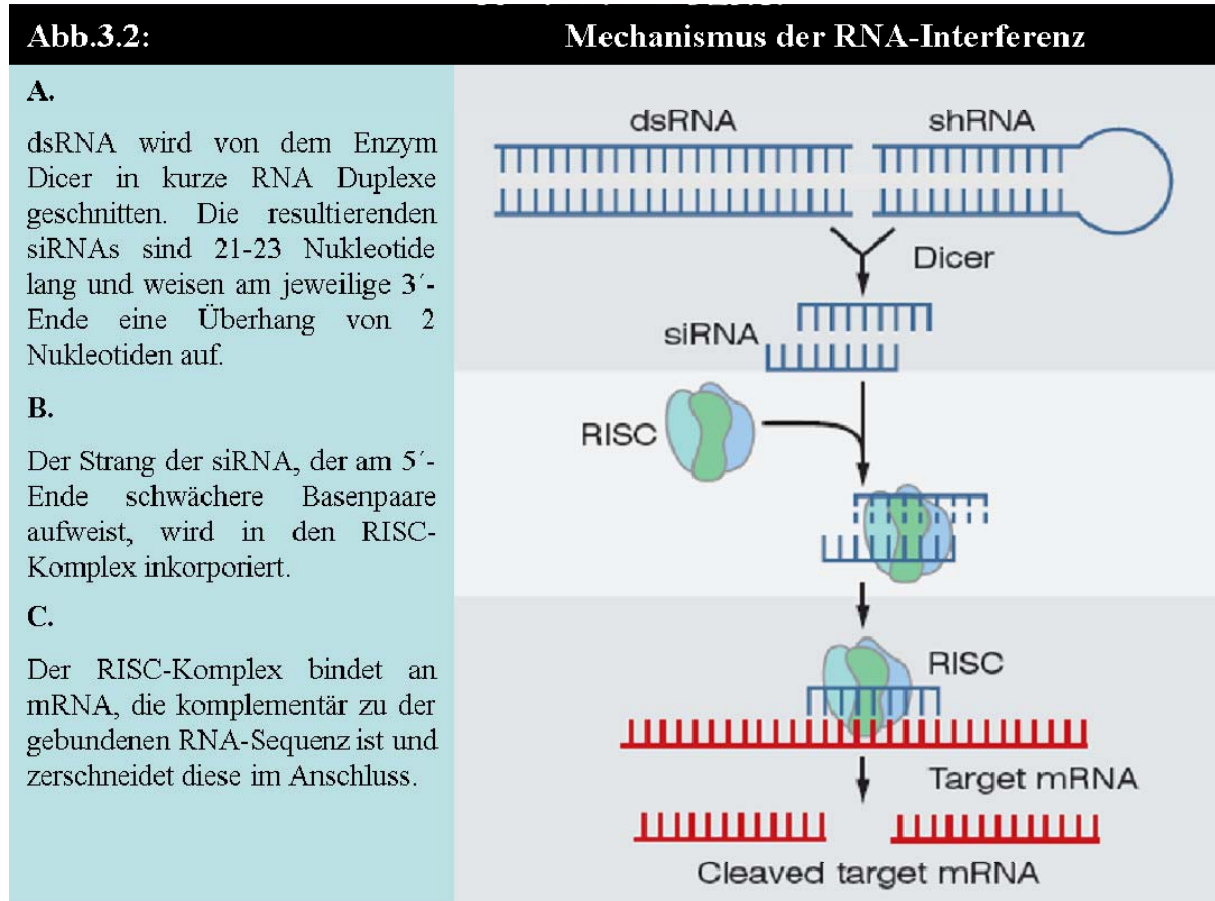


Abb. 3.2: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Abbildung (modifiziert) aus *Environmental Health Perspectives*, Vol. 112, No 4, März 2004

Das Einbringen von siRNAs in eukaryote Zellen führt lediglich zu einem transienten Effekt, der in der Zellkultur nur einige Tage anhält. Die stabile Integration von kurzen, doppelsträngigen DNA-Sequenzen in das Genom der Zielzellen, deren Transkription durch einen vorgeschalteten H1-Polymerase II Promotor in *short hairpin* RNAs resultiert, führt zu einem dauerhaften *knock down* des Zielproteins. Dazu werden zu der Zielsequenz komplementäre, kurze DNA-Sequenzen zunächst in den eukaryoten Expressionsvektor pSuper (OligoEngine, Seattle, WA, USA) kloniert (Vgl. Abb.3.3). Um so genannte *off-target*-Effekte zu verhindern, sollten zwei verschiedene funktionelle *short hairpins* ausgesucht werden. Als *off-target*-Effekt wird ein unbeabsichtigter Gen *knock down* bezeichnet, der zu der unerwünschten Degradation einer anderen mRNA als der des Zielproteins führt. Nach Ermittlung der *knock down* Effizienz der *short hairpins* durch transiente Transfektionen, werden die pSuper-Konstrukte in den lentiviralen Vektor pLVTHM umklontiert.

Durch Transduktion der Zielzellen wird eine stabile Integration der *knock down* induzierenden Sequenzen in das Genom der Zelllinie erreicht. Mithilfe spezieller Programme, die im Internet durch verschiedene Firmen und Institute angeboten werden (Vgl. Material, 2.13), erfolgt das Design der *short hairpins*.

3.4.1 Klonierung von *short hairpin* Konstrukten

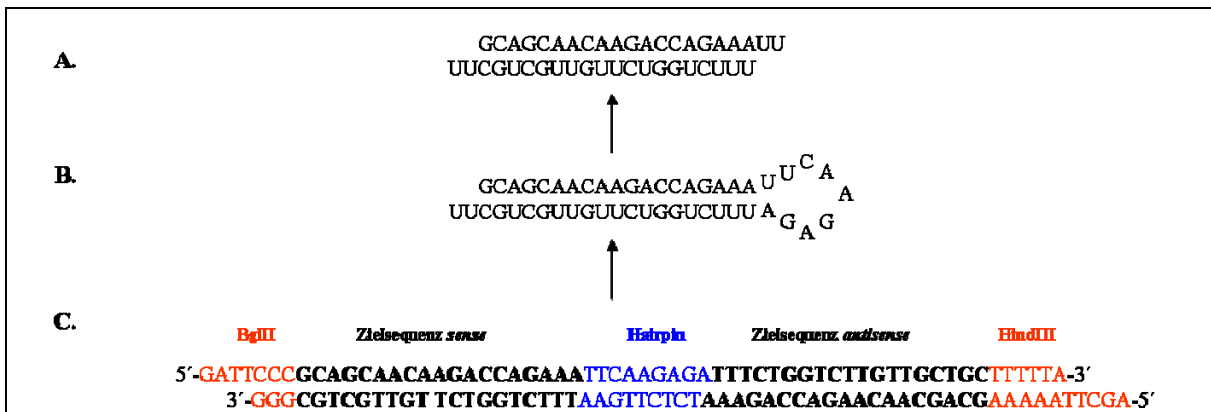


Abb. 3.3: Klonierung von *short hairpin*-Konstrukten in das pSuper Vektorsystem.

(Schematische Darstellung.) **C.** Die hybridisierten Oligonukleotide von *short hairpin* 1 human.KIBRA (sh1 h.KIBRA) werden über die Restriktionserkennungssequenz der Enzyme *BglII/HindIII* in den Vektor pSuper kloniert, der mit den gleichen Enzymen verdaut wurde. **B.** Durch den RNA-Polymerase II abhängigen H1-Promoter wird die Zielsequenz in der Zelle in RNA transkribiert und es kommt durch Rückfaltung zur Ausbildung eines *short hairpin*, einer haarnadelgleichen Struktur. **A.** Ein spezifischer Enzymkomplex (Dicer) führt zur Bildung von siRNAs, kurzen doppelsträngigen RNA-Sequenzen mit zwei überhängenden Nucleotiden am jeweiligen 3'-Ende.

3.4.2 Hybridisierung synthetischer Oligonukleotide

Je 20 µM eines Oligonukleotidpaares (for/rev) werden in einer 100 mM NaCl-Lösung und einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 Min bei 95°C erhitzt, langsam bis 60°C abgekühlt und anschließend auf Eis inkubiert.

3.4.3 Phosphorylierung der hybridisierten Oligonukleotide

Für die Phosphorylierung der 3'-Enden werden 5 µl der hybridisierten synthetischen DNA-Fragmente mit 2 µl 10x T4-Ligase-Puffer und 1 µl PNK mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und für 30 Min bei 37°C inkubiert. Zum inaktivieren der PNK folgt eine Inkubation für 10 Min bei 70°C. Es folgen Ligation (Vgl. Methoden, 3.3.9) und Transformation (Vgl. Methoden, 3.1.3.2) in den *E. coli* Stamm Top10.

3.4.4 Ermittlung der *knock down* Effizienz

Nach der Klonierung verschiedener *short hairpins* in das pSuper Vektorsystem werden HEK 293T Zellen transient mit diesen Konstrukten transfiziert. Ein eukaryoter Expressionsvektor, der für das Zielprotein kodiert, wird ko-transfiziert, um einen signifikanten *knock down* ermitteln zu können. Die Auswertung erfolgt durch *Western Blot* Analyse. Als Transfektionskontrolle werden 0.5 µg einer Plasmid-DNA, die für GFP kodiert/10 cm Gewebekulturschale ko-transfiziert. Für alle zu transfizierenden Ansätze wird ein so genannter *Mastermix* hergestellt, in dem die Plasmid-DNA, die für das Zielprotein kodiert und eine Plasmid-DNA, die für GFP kodiert, gemischt werden. Die Verwendung eines *Mastermix* stellt sicher, dass in jedem Ansatz die gleiche Menge an Plasmid-DNA vorliegt.

Der *knock down* wird zusätzlich durch einen Luciferase-Assay validiert. Dazu werden HEK 293T Zellen transient ko-transfiziert mit den pSuper *short hairpin* Konstrukten und einem Konstrukt des Vektors psiCHECK™-2. Der verwendete Vektor psiCHECK™-2 kodiert für zwei Luciferasen aus verschiedenen Organismen (*Renilla* und *Firefly*), deren Extinktion sich in einem Luciferase-Assay unterscheiden lässt. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein aus *Renilla*-Luciferase und Zielprotein, das gehemmt werden soll. Die andere Luciferase (*Firefly*) dient als Reporter gen und stellt eine erfolgreiche Transfektion sicher. Ein *knock down* wird ermittelt durch eine reduzierte Detektierbarkeit der *Renilla*-Luciferase im Verhältnis zu der *Firefly*-Luciferase. Die Transfektionen werden in 96 *Well* Platten in Dreifachbestimmungen pro Ansatz durchgeführt. Als Kontrolle dient ein *short hairpin* Konstrukt, das gegen eine andere RNA gerichtet und der Ziel-RNA nicht komplementär ist.

3.4.5 Umklonierung der *short hairpin* Sequenzen in das lentivirale Vektorsystem

Die Umklonierung der *short hairpin* Sequenzen aus dem pSuper-Vektorsystem erfolgt durch Restriktionsverdau der pSuper-Konstrukte und des lentiviralen Vektors pLVTHM mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI/ClaI*. Es folgen Ligation, Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung. Die mit pLVTHM-Konstrukten transformierten Bakterien müssen bei 30°C kultiviert werden.

3.4.5.1 Lentiviren

Lentiviren gehören zu der Familie der Retroviren, einer Virusklasse, die zu den RNA-Viren gehört, aber über ein DNA-Zwischenprodukt mit dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) (Vgl. 3.1.3) repliziert. Über dieses DNA-Zwischenprodukt können Retroviren spezifisch in das Wirtsgenom integrieren. Lentiviren sind in der Lage, sowohl in das Genom

proliferierender als auch statischer Zellen zu integrieren. Bei allen Retroviren liegen drei Gene in der gleichen Reihenfolge vor: *gag*, das für interne Strukturproteine kodiert, *pol*, das für RT und Integrase kodiert und *env*, das für Hüllproteine kodiert. Diese Gene werden beiderseitig von langen, endständigen Sequenzwiederholungen (LTRs, *long terminal repeats*) flankiert, welche starke Transkriptionspromotoren enthalten und am Integrationsprozess beteiligt sind (Brock Mikrobiologie, Spektrum Verlag, 2001).

3.4.5.2 Das lentivirale Vektorsystem

Bei dem verwendeten lentiviralen Vektorsystem wurden die Gene *gag*, *pol* und *env* auf verschiedene Expressionsvektoren verteilt (Vgl. Tabelle 3.3). Ausschließlich das Zusammenbringen der Vektoren durch Ko-Transfektionen in Wirtszellen führt zu der Produktion von Viruspartikeln. Dabei enthält nur der Leervektor pLVTHM die für die Transkription und Integration erforderlichen LTRs, welche die Ziel-DNA, die für GFP oder die jeweiligen shRNAs kodieren, flankieren. Die Aufteilung der viralen Gene dieses Vektorsystems stellt sicher, dass die gewünschte Menge an Viruspartikeln produziert wird, ohne dass es zu einer weiteren Selbstreplikation der Viren kommt.

3.4.5.3 Produktion lentiviraler Transfervektoren

Für die Herstellung von Viruspartikeln als lentivirale Transfervektoren werden HEK 293T Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode (Vgl. 3.3.4) mit dem Leervektor pLVTHM bzw. den *short hairpin* Konstrukten zusammen mit zwei Hilfsplasmiden ko-transfiziert.

Tabelle 3.3: Produktion von Lentiviren

Konstrukt	Menge/10 cm Zellkulturschale
pLVTHM (Leervektor/ <i>short hairpin</i>)	15.00 µg
pCMV-dR 8.74 (<i>gag/pol</i>)	11.25 µg
pMD-2-VSV-G (<i>env</i>)	3.75 µg

Nach 8 h wird das Medium entfernt und durch das Kulturmedium der zu transduzierenden Zellen ersetzt. Zusätzlich wird 200 mM HEPES Puffer zu den Zellen gegeben. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Virusproduktion. Die Ernte der Viruspartikel erfolgt 3 Tage nach der Transfektion, indem das Medium unter Einhaltung besonderer Vorsichtsmaßnahmen abgenommen und in ein Zentrifugenröhrchen geeigneter Größe überführt wird. Nachdem das Medium 5 Min bei RT und 2.500 rpm zentrifugiert wurde, wird es sterilfiltriert (Porengröße

45 µm). Die Viruspartikel können direkt für eine Transduktion eingesetzt oder für 2 Wochen bei 4°C gelagert werden.

3.4.6 Transduktion eukaryoter Zellen

Die Zellen werden einen Tag vor der Transduktion passagiert, sodass sie am Tag der Transduktion eine Konfluenz von 80 % erreicht haben. Podozyten, die zur Ausdifferenzierung bei 37°C bzw. 38°C kultiviert wurden, werden nicht passagiert. Das Kulturmedium der Zellen wird nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS durch das die Viruspartikel beinhaltende Medium ersetzt. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wird 8 µg/ml Polybrene zugesetzt. Es folgt nun drei Tage in Folge ein Mediumwechsel. Bis zu diesem Zeitpunkt ist besondere Vorsicht geboten und alle kontaminierten Gerätschaften müssen gesondert und fachgerecht entsorgt werden.

Eine erfolgreiche Transduktion kann nach 2 - 3 Tagen mit einem Fluoreszenzmikroskop ermittelt werden, da das pLVTHM Vektorsystem für GFP kodiert. Der *knock down* Effekt auf mRNA-Ebene wird durch RT-PCR, der auf Protein-Ebene durch eine Western Blot Analyse verifiziert.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des Proteins KIBRA in Podozyten näher zu charakterisieren. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Bestätigung der potentiellen Interaktion zwischen KIBRA und PATJ bzw. zwischen KIBRA und Sra-1. Des Weiteren wurde durch Immunfluoreszenzstudien eine etwaige Auswirkung eines KIBRA *knock down* auf das Aktin- bzw. Tubulin-Zytoskelett analysiert. Abschließend wurden kultivierte Podozyten mit fehlregulierter KIBRA-Expression auf funktionelle Veränderungen bezüglich ihres Migrations- und Adhäsionsverhaltens untersucht.

4.1 Die Interaktion KIBRA/PATJ

Bei der Durchführung eines *Yeast Two-Hybrid* (Y2H) *Screens* mit dem murinen Protein CIPP als *bait* und einer humanen Podozyten*library* als *prey* wurde in dieser Arbeitsgruppe ein Klon identifiziert, der für KIBRA kodiert (Klon 29, AS 359-1113). Das Gerüstprotein CIPP beinhaltet zehn PDZ-Domänen. Diese Protein-Protein-Interaktionsmodule binden in der Regel an die letzten 4 Aminosäuren des C-terminus ihres Interaktionspartners. (Vgl. Einleitung, 1.5). In dem Y2H *Screen* wurde eine Verkürzungsmutante von CIPP inklusive der letzten vier PDZ-Domänen des C-Terminus (PDZ.7-10) eingesetzt.

Die Vordaten zu der potentiellen Interaktion zwischen CIPP und KIBRA sollten mit den nachfolgenden Experimenten bestätigt und auf distinkte Bereiche eingegrenzt werden. Um die Interaktionsstudien innerhalb einer Spezies zeigen zu können, wurde mit dem humanem Homologon von CIPP, PATJ, und humanem KIBRA gearbeitet. Zunächst wurden Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem durchgeführt, in denen verschiedene Verkürzungsmutanten von PATJ (PDZ-Domänen 7-10, 8-10, 9-10, 10, 9, 8, 7 sowie 7-8) (Abb. 4.1 A) und KIBRA *full length* eingesetzt wurden. Tabelle 4.1 fasst die verschiedenen Ansätze der Ko-Transformationen zusammen. Als Positivkontrolle diente der initial identifizierte KIBRA Klon 29, der in dem Y2H *Screen* mit CIPP isoliert wurde. Die erfolgreiche Ko-Transformation wurde durch Kultivierung der Hefezellen auf synthetischem *drop-out* Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan (SD-L-T) sichergestellt (Vgl. Methoden, 3.3.2).

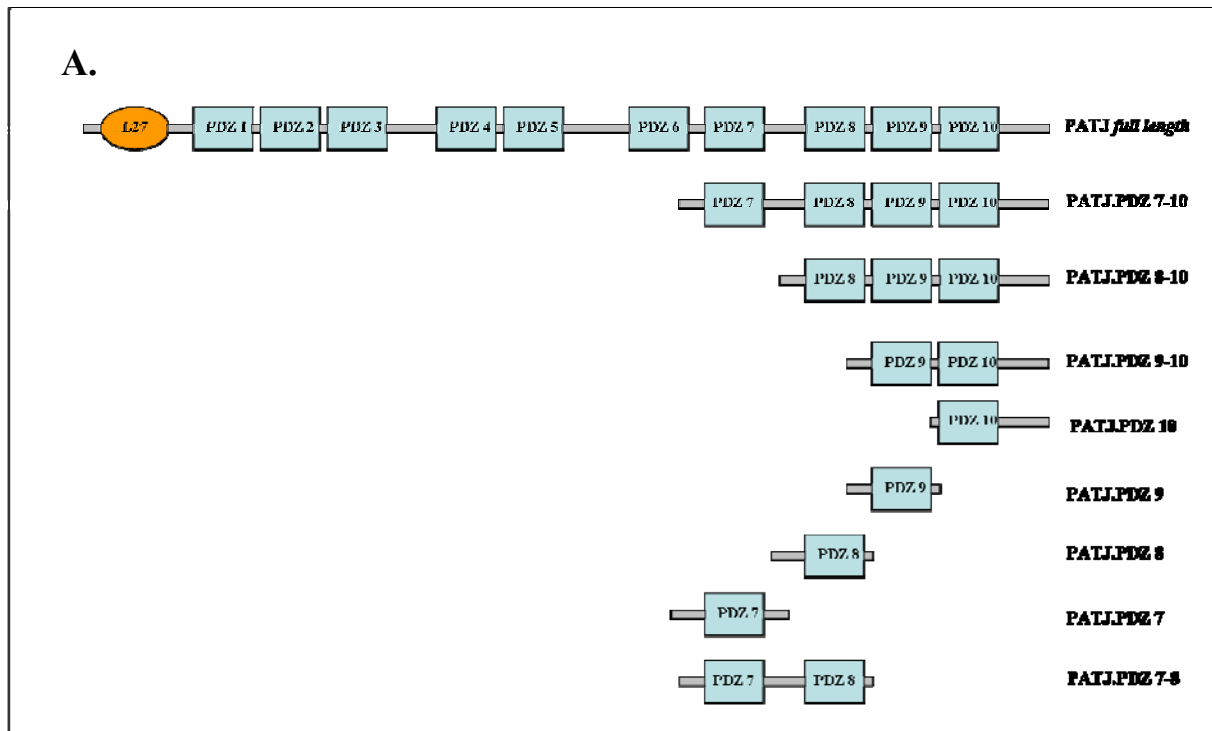


Abb. 4.1 A: Schematische Darstellung des humanen Gerüstproteins PATJ *full length* und den in Hefe Ko-Transformationen als *prey* eingesetzten Verkürzungsmutanten.

Die Abbildung zeigt schematisch die Domänenstruktur von PATJ *full length* mit einer N-terminalen L27-Domäne und zehn PDZ-Domänen (oben). Des Weiteren sind PATJ-Verkürzungsmutanten mit den PDZ-Domänen (von oben) 7-10, 8-10, 9-10, 10, 9, 8, 7 und 7-8 dargestellt. Die schematisch abgebildeten Verkürzungsmutanten von PATJ wurden in Ko-Transformationsexperimenten im Hefesystem als *bait*s eingesetzt.

Tabelle 4.1 Ko-Transformationen des Hefestammes MAV 203

Ko-Trafo	<i>bait</i> („Köder“) pDEST32/pDBLeu	<i>prey</i> („Beute“) pDest 22	SD –T –L	SD –T –L –H 3-AT (50 mM)	β-Gal- Assay
1.	pDest 32-h.PATJ.PDZ.9	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
2.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.7-10	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
3.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.8-10	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	++
4.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.9-10	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
5.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.10	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
6.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.7	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
7.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.8	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	++
8.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.7-8	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
9.	pDBLeu	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+	-
10.	pDest 32	pDest 22-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+/-	-
11.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.7-10	pDest 22	++	+/-	-
12.	pDBLeu-h.PATJ.PDZ.7-10	pXAD 502 Klon 29 (h.KIBRA)	++	+/-	++

Legende:

Ko-Trafo=Ko-Transformation; **SD-L-T**: Das Wachstum (++) von Hefekolonien auf SD-L-T stellt die erfolgreiche Transformation von *bait*- und *prey*-Plasmid sicher; **SD-L-T-H + 50 mM 3-AT**: Normales (+) bzw. schwaches (+/-) Wachstum von Hefekolonien auf SD-L-T-H; **β-Gal-Assay**: Blaufärbung (++) bzw. keine Farbreaktion (-) der Hefekolonien nach einem β-Galaktosidase Filter Assay.

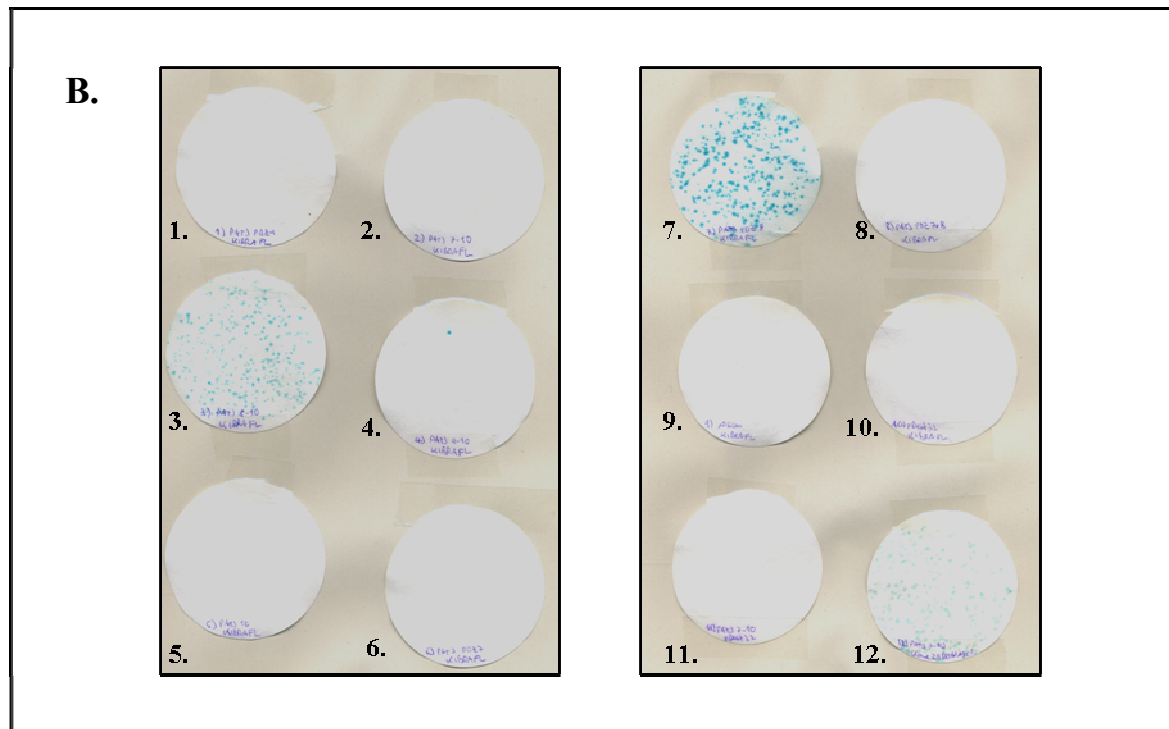


Abb. 4.1 B: β -Galaktosidase Filter Assay. (Die Nummerierungen beziehen sich auf Tab. 4.1).

Der Hefestamm MAV 203 wurde ko-transformiert mit verschiedenen Verkürzungsmutanten von PATJ (Vgl. Abb. 4.1 A) und KIBRA *full length* (Nr. 1-8). Entsprechende Negativkontrollen mit Leervektoren von *bait* (pDBLeu, Nr. 9/pDest32, Nr. 10) und *prey* (pDest 22, Nr. 11) wurden durchgeführt. Der im initialen Y2H Screen isolierte KIBRA Klon 29 (AS 359-1113) diente zusammen mit PATJ.PDZ 7-10 als Positivkontrolle (Nr. 12). Eine Blaufärbung der Hefekolonien nach einem β -Galaktosidase Filter Assay ist bei der Positivkontrolle (Nr. 12), PATJ.PDZ 8-10 /KIBRA *full length* (Nr. 3) und PATJ.PDZ 8 /KIBRA *full length* (Nr. 7) zu beobachten.

Ein β -Galaktosidase Filter Assay wurde mit ko-transformierten Hefekolonien durchgeführt, die auf SD-L-T-H + 50 mM 3-AT Medium gewachsen waren. Eine Blaufärbung der Hefekolonien konnte ausschließlich bei der Positivkontrolle, PATJ.PDZ 8-10/KIBRA und PATJ.PDZ 8/KIBRA beobachtet werden, was deutlich für eine Interaktion zwischen den im Hefesystem exprimierten Proteinen PATJ.PDZ 8 und KIBRA spricht (Abb. 4.1 B).

Um die im Hefesystem gezeigte Interaktion zwischen PATJ.PDZ 8 und KIBRA mit einer weiteren Methode zu bestätigen, wurden GST-*pulldown* Experimente durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Verkürzungsmutanten von PATJ als GST-Fusionsprotein (Vgl. Methoden, 3.2.1) und GFP.KIBRA *full length* bzw. GFP jeweils durch transiente Transfektion in HEK 293T exprimiert. Die transfizierten HEK 293T Zellen wurden nach 24 h lysiert. Das Zellysate wurde anschließend mit den GST-Fusionsproteinen inkubiert. Die Proben wurden auf einem SDS-PAA Gel aufgetrennt und einer Western Blot Analyse unterzogen.

In Abbildung 4.2 A ist eine schematische Darstellung des Proteins PATJ und der im *GST-pulldown* eingesetzten Verkürzungsmutanten dargestellt.

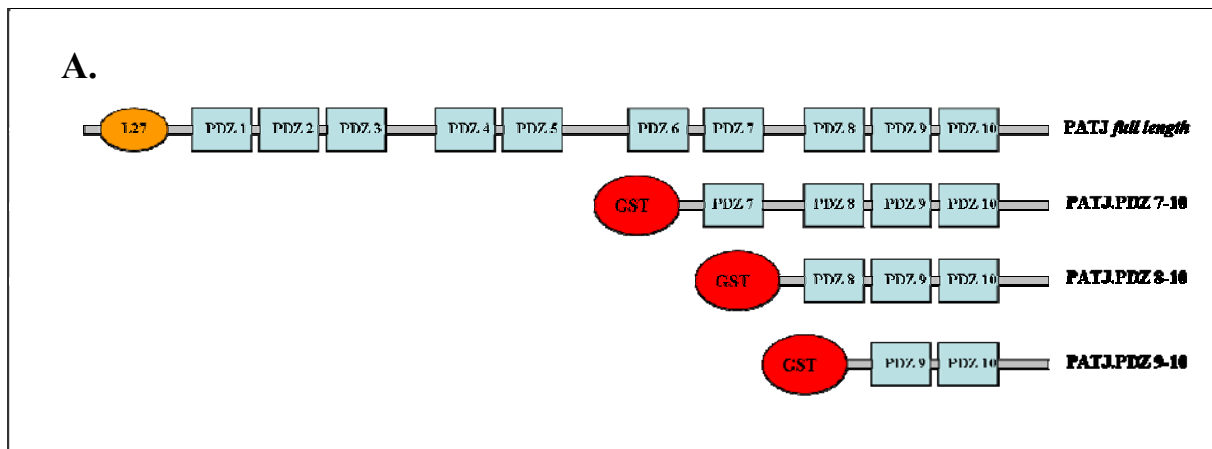


Abb. 4.2 A: Schematische Darstellung von *PATJ full length* und den im *GST-pulldown* eingesetzten Verkürzungsmutanten. Humanes *PATJ* beinhaltet in seiner Struktur eine N-terminale L27-Domäne, sowie 10 PDZ-Domänen. Dargestellt sind die als GST-Fusionsproteine exprimierte Verkürzungsmutanten *PATJ.PDZ 7-10*, *8-10* und *9-10*.

Abbildung 4.2 B zeigt die Aufnahme eines *Coomassie* gefärbten SDS-PAA Gels. Dargestellt sind die für den *GST-pulldown* exprimierte GST-Fusionsproteine *PATJ.PDZ 7-10*, *8-10* und *9-10*.

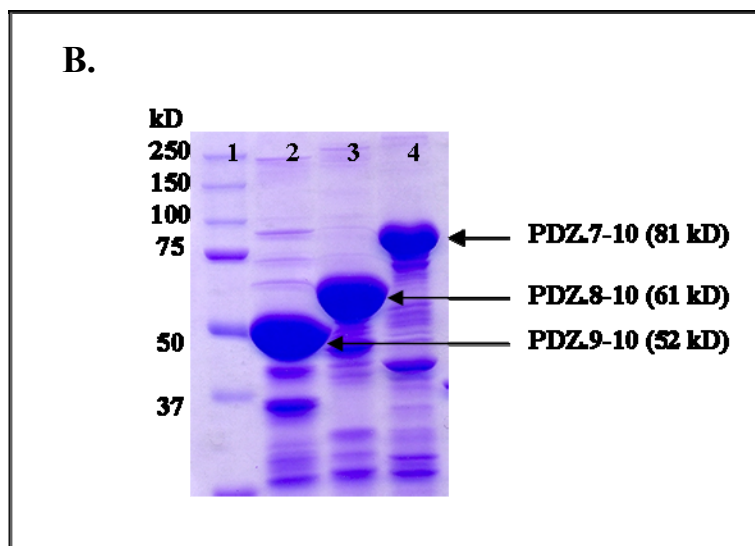


Abb. 4.2 B: Aufnahme eines *Coomassie* gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt Verkürzungsmutanten von *PATJ*, die rekombinant als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Zu sehen sind GST.*PATJ*.PDZ-Domäne 9-10 (Spur 2), 8-10 (Spur 3) und 7-10 (Spur 4). Ein Proteinmarker mit angegebenen Größen in kD wurde in Spur 1 aufgetragen.

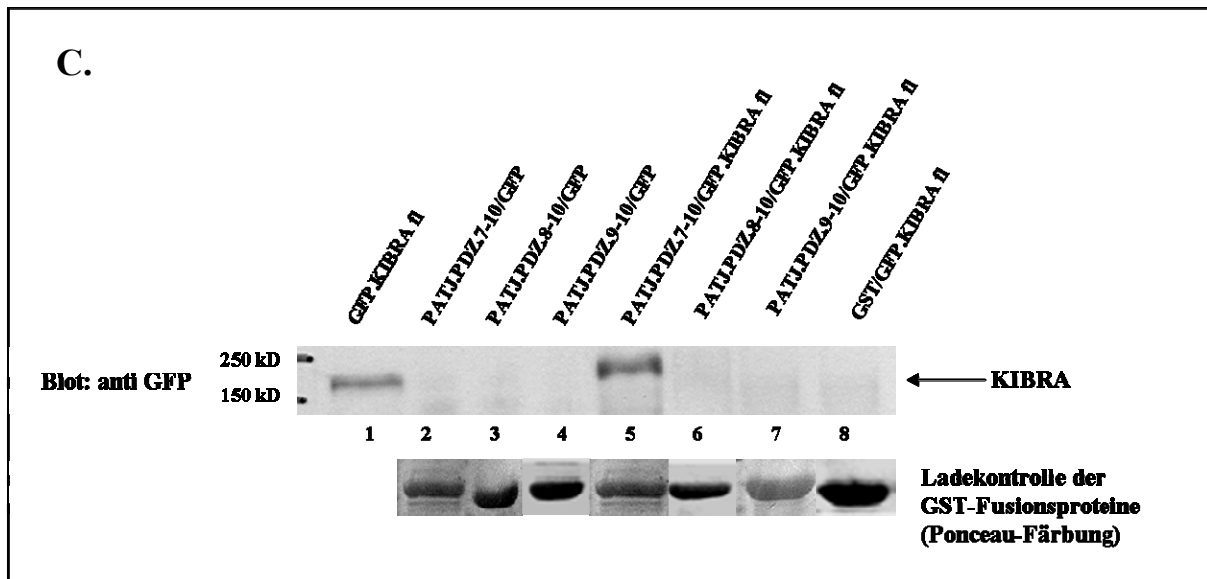


Abb. 4.2 C: Die Western Blot Analyse eines GST-pulldowns zeigt die Interaktion GST.PATJ.PDZ 7-10/GFP.KIBRA

GFP.KIBRA *full length* und GFP wurden jeweils durch transiente Transfektion in HEK 293T Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert. Die Lysate werden im Folgenden als GFP bzw. GFP.KIBRA *full length* bezeichnet. Rekombinant exprimiertes GST und GST-Fusionsproteine der PATJ.PDZ-Domänen 7-10, 8-10 und 9-10 wurden an einer Glutathion-Sepharose Matrix immobilisiert und mit GFP.KIBRA *full length* inkubiert. In einem weiteren Ansatz wurden die GST-Fusionsproteine mit GFP inkubiert. Die Proben wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit einem GFP-spezifischen Antikörper durch die ECL-Reaktion.

obere Abbildung: Transfizierte HEK 293T Zellen exprimieren GFP.KIBRA *full length* (Spur 1) Im Vergleich zu den Spuren 5-7 wurden 10 % des Lysats eingesetzt. GST-Fusionsproteine mit den PATJ.PDZ-Domänen 7-10 (Spur 2), 8-10 (Spur 3) und 9-10 (Spur 4) wurden als Kontrolle mit GFP inkubiert. Es ist keine Proteinbande detektierbar. GST-PATJ.PDZ-Domäne 7-10 (Spur 5), 8-10 (Spur 6) und 9-10 (Spur 7) bzw. GST (Spur 8) wurden mit GFP.KIBRA *full length* inkubiert. Eine Proteinbande ist ausschließlich in Spur 5 detektierbar.

untere Abbildung: Expressionskontrolle der GST-Fusionsproteine (Spuren 2-7) bzw. GST (Spur 8). (Ponceau-Färbung).

Abbildung 4.2 C zeigt das Ergebnis einer Western Blot Analyse nach einem GST-pulldown Assay. Ausschließlich in Spur 1 (GFP.KIBRA *full length*, Expressionskontrolle) und in Spur 5 (GST.PATJ.PDZ 7-10/GFP.KIBRA *full length*) wurden durch den GFP-spezifischen Antikörper Proteinbanden detektiert. In diesem GST-pulldown Assay wurde GFP.KIBRA *full length* mit GST.PATJ.PDZ 7-10 gefällt, wodurch die Interaktion zwischen KIBRA und PATJ bestätigt werden konnte. Die Ergebnisse der Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem (Abb. 4.1 A-C) zeigten, dass die Interaktion zwischen KIBRA und PATJ durch PATJ.PDZ 8 vermittelt wird. Im Gegensatz dazu spricht das Resultat des GST-pulldowns dafür, dass KIBRA an PATJ.PDZ 7 bindet, da KIBRA ausschließlich mit PATJ.PDZ 7-10 gefällt wurde, nicht aber mit PATJ.PDZ 8-10 und 9-10.

Um das PDZ-Bindungsmotiv von KIBRA zu identifizieren, wurden weitere *GST-pulldown* Experimente durchgeführt. Dazu wurden C-terminale Verkürzungsmutanten von KIBRA mit und ohne die letzten vier Aminosäuren als GST-Fusionsproteine exprimiert (Abb. 4.3 B). Abbildung 4.3 A zeigt ein Schema der eingesetzten GST-Fusionsproteine.

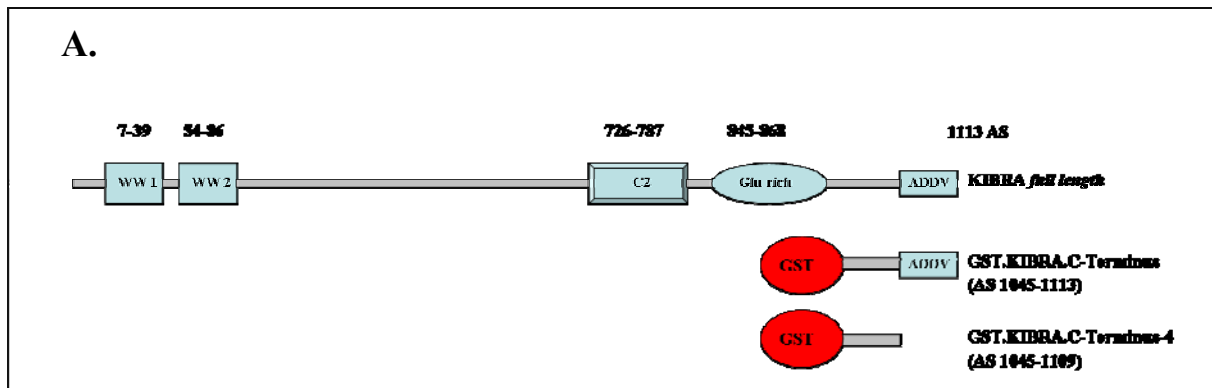


Abb. 4.3 A: Schematische Darstellung von KIBRA *full length* und den im *GST-pulldown* eingesetzten Verkürzungsmutanten. Die Abbildung zeigt schematisch die Domänenstruktur von KIBRA *full length* mit zwei N-terminalen WW-Domänen, einer zentralen C2-Domäne gefolgt von einem glutaminsäurereichen Abschnitt und die letzten vier Aminosäuren des C-Terminus (ADDV).

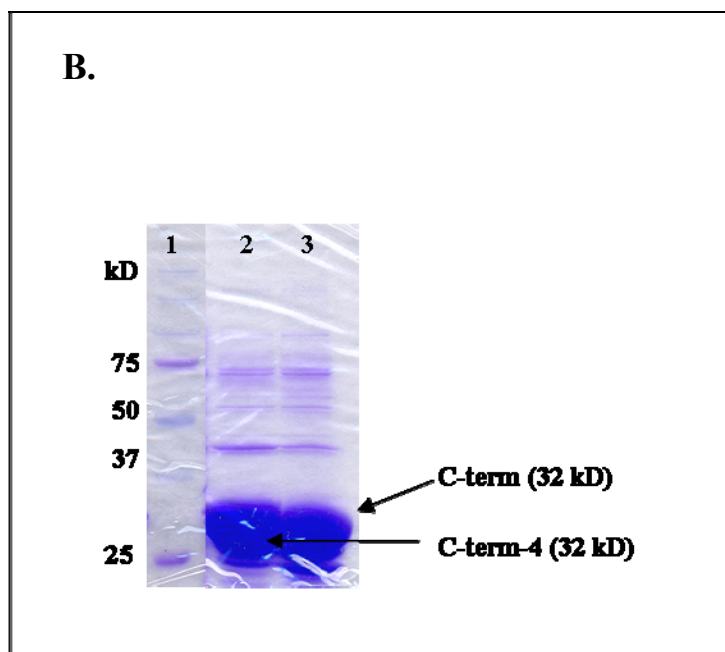


Abb. 4.3 B: Aufnahme eines *Coomassie* gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt Verkürzungsmutanten von KIBRA, die rekombinant als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Zu sehen sind GST.KIBRA.C-Terminus (Spur 2) und GST.KIBRA.C-Terminus-4 (Spur 3). Ein Proteinmarker mit angegebenen Größen in kD wurde in Spur 1 aufgetragen.

Für den Versuch wurden HEK 293T Zellen mit einem für FLAG.PATJ *full length* kodierenden Konstrukt transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 h lysiert und das Lysat wurde mit den rekombinant exprimierten GST-Fusionsproteinen inkubiert.

Die Western Blot Analyse in Abbildung 4.3 C zeigt, dass FLAG.PATJ *full length* nur mit GST-KIBRA.C-Terminus gefällt wird und nicht mit GST.KIBRA.C-Terminus-4.

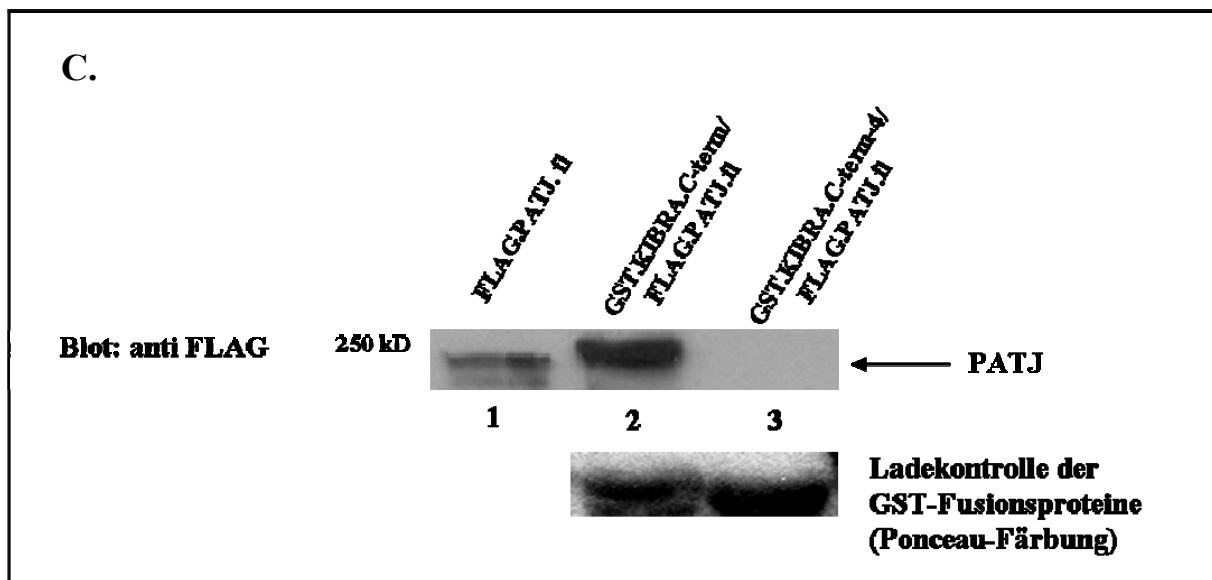


Abb. 4.3 C: Die Western Blot Analyse eines GST-pull-downs zeigt die Interaktion GST.KIBRA.C-Terminus/FLAG.PATJ.

FLAG.PATJ wurde durch transiente Transfektion in HEK 293T Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wird im Folgenden als FLAG.PATJ *full length* bezeichnet. Rekombinant exprimierte GST-Fusionsproteine des KIBRA.C-Terminus (GST.KIBRA.C-term) und des KIBRA.C-Terminus ohne die letzten 4 Aminosäuren (GST.KIBRA.C-term-4) wurden an einer Glutathion-Sepharose Matrix immobilisiert und mit FLAG.PATJ *full length* inkubiert. Die Proben wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit einem FLAG-spezifischen Antikörper durch die ECL-Reaktion.

obere Abbildung: Transfizierte HEK 293T Zellen exprimieren FLAG.PATJ *full length* (Spur 1) Im Vergleich zu den Spuren 2 - 3 wurden 10 % des Lysats eingesetzt. Die Fusionsproteine GST.KIBRA.C-term (Spur 2) und GST.KIBRA.C-term-4 (Spur 3) wurden mit FLAG.PATJ *full length* inkubiert. Eine Proteinbande ist ausschließlich in Spur 2 detektierbar.

untere Abbildung: Expressionskontrolle der GST-Fusionsproteine GST.KIBRA.C-Terminus (Spur 2) bzw. GST.KIBRA.C-Terminus-4 (Spur 3). (Ponceau-Färbung).

Dieser Versuch wurde mit endogen exprimiertem PATJ wiederholt. Dazu wurden die Proteine GST.KIBRA.C-Terminus bzw. GST.KIBRA.C-Terminus-4 an Glutathion-Sepharose immobilisiert und mit HEK 293T Zellysat inkubiert. In Abbildung 4.3 D ist eine Aufnahme der Western Blot Analyse nach erfolgtem GST-pulldown dargestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die Bindung von KIBRA an PATJ über die vier letzten C-terminalen Aminosäuren von KIBRA vermittelt wird (Abb. 4.3 C/D). Diese letzten vier Aminosäuren, ADDV, stellen ein bisher unbekanntes PDZ-Bindungsmotiv für PDZ-Domänen der Klasse III dar [32].

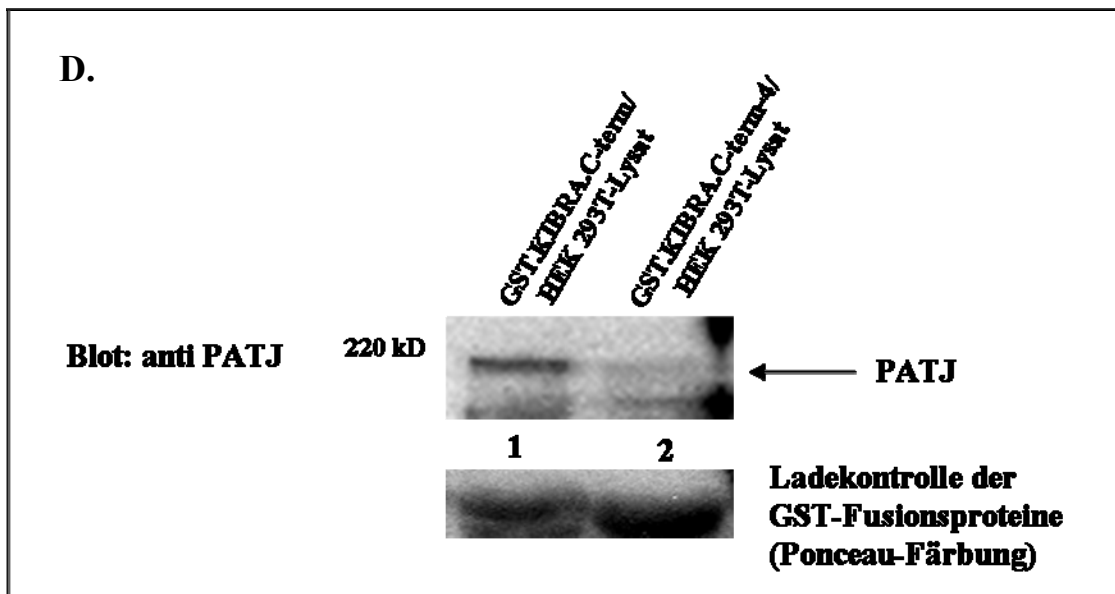


Abb. 4.3 D: Die Western Blot Analyse eines GST-pulldowns zeigt die Interaktion KIBRA.C-Terminus/PATJ

HEK 293T Zellen wurden lysiert. Rekombinant exprimierte GST-Fusionsproteine des KIBRA.C-Terminus (GST.KIBRA.C-term) und des KIBRA.C-Terminus ohne die letzten 4 Aminosäuren (GST.KIBRA.C-term-4) wurden an einer Glutathion-Sepharose Matrix immobilisiert und mit dem Zellysat inkubiert. Die Proben wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit einem PATJ-spezifischen Antikörper durch die ECL-Reaktion.

obere Abbildung: GST-Fusionsproteine des KIBRA.C-Terminus (Spur 1) und des KIBRA.C-Terminus-4 (Spur 2) wurden mit HEK 293T Zellysat inkubiert. Eine Proteinbande ist ausschließlich in Spur 1 detektierbar.

untere Abbildung: Expressionskontrolle der GST-Fusionsproteine GST.KIBRA.C-Terminus (Spur 1) bzw. GST.KIBRA.C-Terminus-4 (Spur 2). (Ponceau-Färbung).

4.2 Die Interaktion KIBRA/Sra-1

Bei der Durchführung von *GST-pulldown* Experimenten (Joachim Kremerskothen, AG Barnekow, Münster) mit nativen und mutierten WW-Domänen von KIBRA (Abb. 4.4 A) und humanem Gehirnlisat wurde eine differenzielle Proteinbande in einem SDS-PAA-Gel detektiert. Diese Proteinbande, die sich nur in der Spur der nativen KIBRA.WW-Domänen fand, wurde durch Massenspektrometrie (MS/MS) analysiert und als das Protein Sra-1 (PIR 121) identifiziert (Vgl. Einleitung 1.6.2). Um die Vordaten einer potentiellen Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 zu bestätigen, wurden zunächst Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem durchgeführt. Dazu wurde eine Verkürzungsmutante von murinem Sra-1 (AS 632-959), die das WW-Bindungsmotiv LPxY beinhaltet (Abb. 4.4 A) als *bait* eingesetzt und humanes KIBRA *full length* als *prey*.

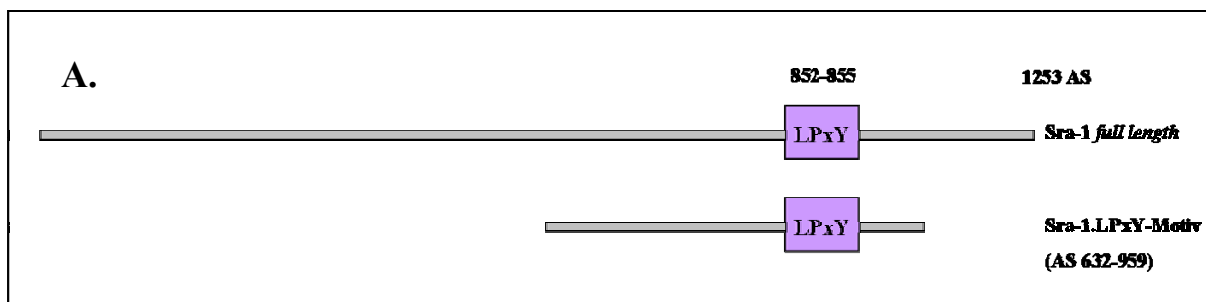


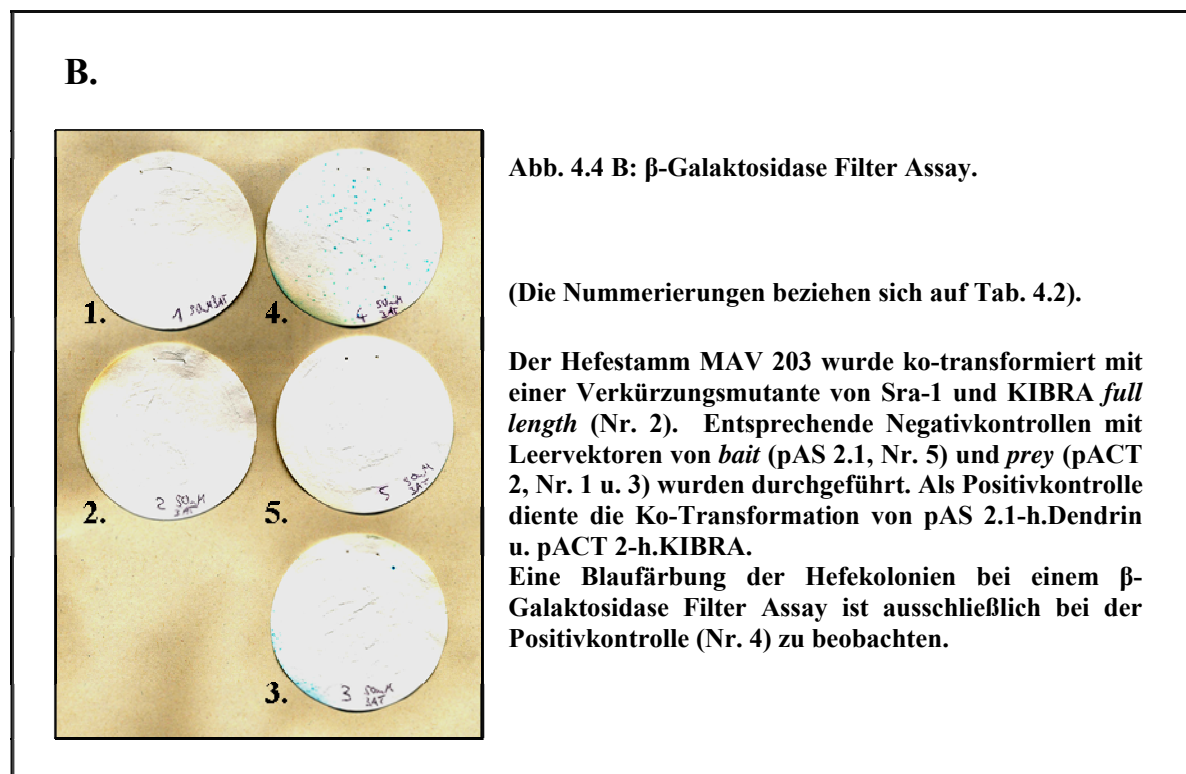
Abb. 4.4 A: Schematische Darstellung des murinen Proteins Sra-1 *full length* und der in Hefe Ko-Transformationen als *bait* eingesetzten Verkürzungsmutante. Die Abbildung zeigt schematisch das Protein Sra-1 *full length* mit dem WW-Domänen-Bindungsmotiv LPxY (L-Leucin, P-Prolin, Y-Tyrosin, x-variable Aminosäure). Des Weiteren ist eine Verkürzungsmutante von Sra-1 dargestellt, welche das WW-Domänen-Bindungsmotiv beinhaltet (Sra-1.LPxY-Motiv). Die schematisch abgebildete Verkürzungsmutante von Sra-1 wurde in Ko-Transformationsexperimenten im Hefesystem als *bait* eingesetzt.

Nach der Ko-Transformation wurden die Hefezellen auf SD-L-T - und SD-L-T-H + 25 mM 3-AT-Agarplatten ausgestrichen. Tabelle 4.2 kann man anhand des Wachstums (++) der Hefezellen auf SD-L-T-Agarplatten entnehmen, dass beide Plasmide erfolgreich ko-transformiert und exprimiert wurden. Als Positivkontrolle (Nr. 4) diente eine Ko-Transformation von KIBRA und Dendrin, deren Interaktion im Hefesystem bereits gezeigt wurde [45].

Tabelle 4.2 Ko-Transformationen des Hefestammes MAV 203

Ko-Trafo	<i>bait</i> („Köder“) pAS	<i>prey</i> („Beute“) pACT 2	SD –T –L	SD –T –L –H 3-AT (25 mM)	β-Gal- Assay
1.	pAS 2.1-m.Sra-1	pACT 2	++	+/-	-
2.	pAS 2.1-m.Sra-1	pACT 2-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+/-	-
3.	pAS 2.1-h.Dendrin	pACT 2	++	+/-	-
4.	pAS 2.1-h.Dendrin	pACT 2-h.KIBRA <i>full length</i>	++	++	++
5.	pAS 2.1	pACT 2-h.KIBRA <i>full length</i>	++	+/-	-

Legende: Ko-Trafo=Ko-Transformation; SD-L-T: Das Wachstum (++) von Hefekolonien auf SD-L-T stellt die erfolgreiche Transformation von *bait*- und *prey*-Plasmid sicher; SD-L-T-H + 25 mM 3-AT: Starkes (++) bzw. schwächeres (+/-) Wachstum von Hefekolonien auf SD-L-T-H; β-Gal-Assay: Blaufärbung (++) bzw. keine Farbreaktion (-) der Hefekolonien nach β-Galaktosidase Filter Assay.



Die Durchführung eines β-Galaktosidase Filter Assays (Abb. 4.4 B) zeigte keine Interaktion zwischen KIBRA *full length* und der Verkürzungsmutante von Sra-1 (AS 632-959). Die bekannte Interaktion zwischen KIBRA und Dendrin konnte reproduziert werden. Ein Nachweis für eine direkte Bindung von KIBRA an das eingesetzte Fragment von Sra-1

konnte im Hefesystem nicht erbracht werden. Zur weiteren Klärung einer potentiellen Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 wurden *GST-pulldown* Experimente durchgeführt. Analog zu den Vordaten wurden GST-Fusionsproteine mit und ohne mutierte WW-Domänen von KIBRA rekombinant exprimiert (Abb. 4.4 D) und mit humanem Gehirnlisat inkubiert. In Abbildung 4.4 C sind die im *GST-pulldown* eingesetzten Fusionsproteine der KIBRA-WW-Domänen schematisch dargestellt. Durch eine anschließende Western Blot Analyse konnte im *GST-pulldown* der Wildtyp KIBRA-WW-Domänen mithilfe eines spezifischen Antikörpers Sra-1 detektiert werden (Abb. 4.4 E).

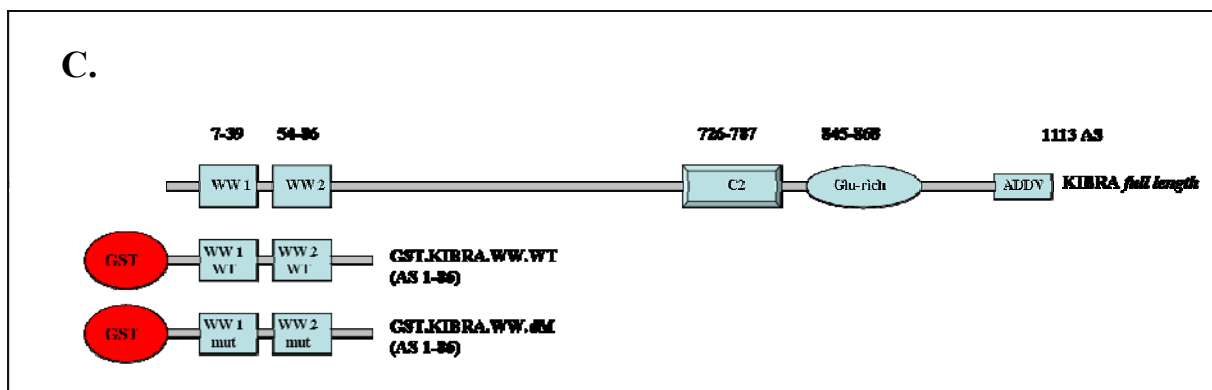


Abb. 4.4 C: Schematische Darstellung von KIBRA *full length* und den im *GST-pulldown* eingesetzten N-terminalen Verkürzungsmutanten mit und ohne Pro►Ala Mutationen der WW-Domänen.

Die Abbildung zeigt schematisch die Domänenstruktur von KIBRA *full length* mit zwei N-terminalen WW-Domänen, einer zentralen C2-Domäne gefolgt von einem glutaminsäurereichen Abschnitt und die letzten vier Aminosäuren des C-Terminus (ADDV) in der oberen Bildhälfte. Des Weiteren sind die im *GST-pulldown* eingesetzten, rekombinant, exprimierten Fusionsproteine der KIBRA WW-Domänen mit der Wildtyp-Aminosäuresequenz (WT) dargestellt sowie Pro►Ala mutierte KIBRA WW-Domänen (dM, Doppel-Mutante).

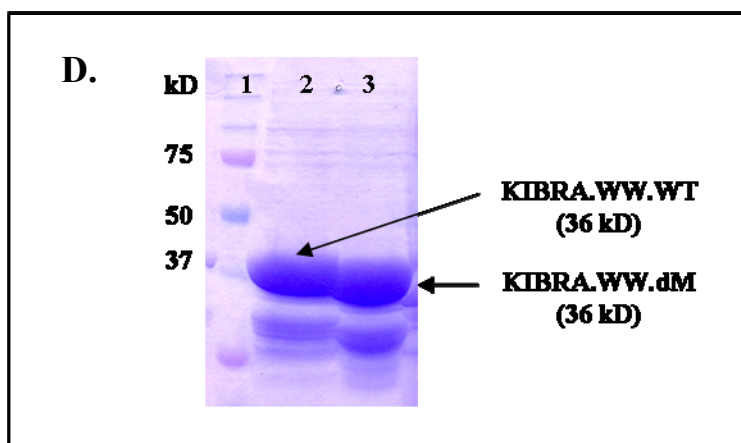


Abb. 4.4 D: Aufnahme eines *Coomassie* gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen. Die Abbildung zeigt Verkürzungsmutanten von KIBRA, die rekombinant als GST-Fusionsproteine exprimiert wurden. Zu sehen sind GST.KIBRA.WW.WT (Spur 2) mit der Aminosäuresequenz des Wildtyps und GST.KIBRA.WW.dM (Spur 3) mit Pro►Ala Mutationen in beiden WW-Domänen. Ein Proteinmarker mit angegebenen Größen in kD wurde in Spur 1 aufgetragen.

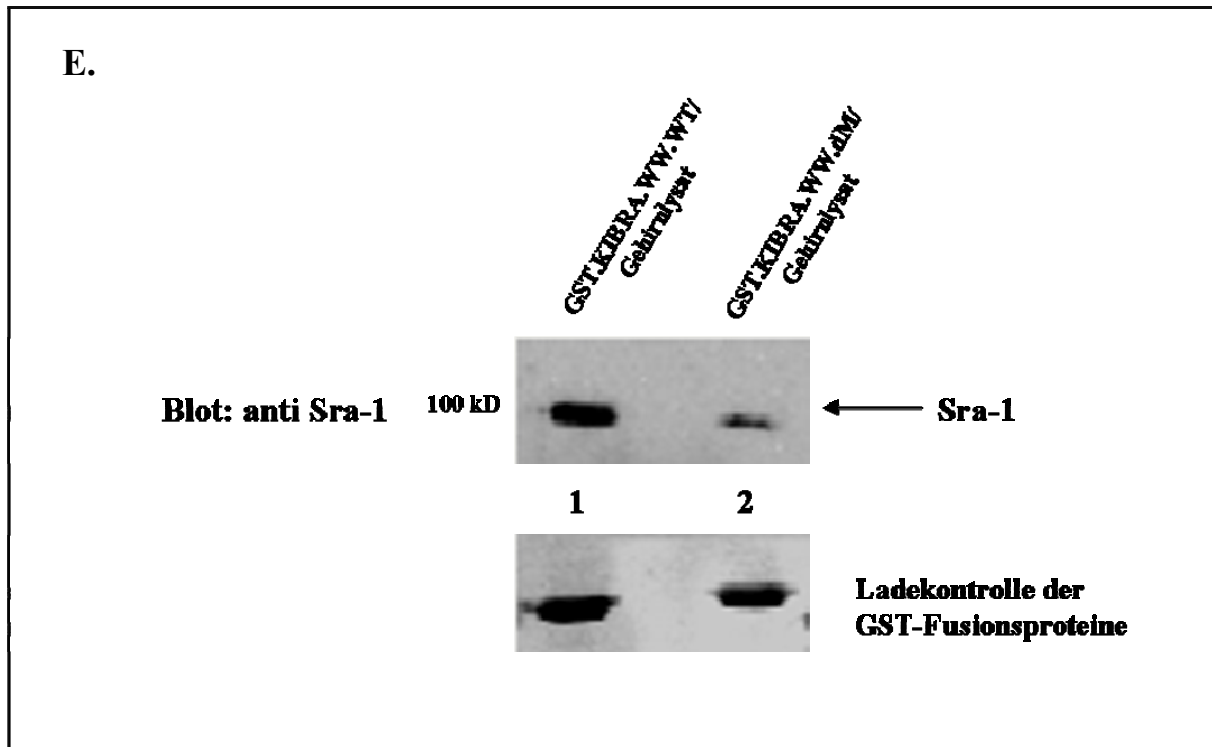


Abb. 4.4 E: Die Western Blot Analyse eines GST-pull-downs zeigt die Interaktion GST.KIBRA.WW/Sra-1

Die KIBRA.WW-Domänen wurden rekombinant mit der Wildtyp Aminosäuresequenz (GST.KIBRA.WW.WT) als GST-Fusionsprotein exprimiert, bzw. mit einer Pro►Ala Mutation innerhalb beider WW-Domänen (GST.KIBRA.WW.dM). Die GST-Fusionsproteine wurden an einer Glutathion-Sepharose Matrix immobilisiert und mit humanem Gehirnlysat inkubiert. Die Proben wurden in einem SDS-PAA-Gel aufgetrennt und mittels Western Blot auf eine PVDF Membran transferiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation mit einem Sra-1-spezifischen Antikörper durch die ECL-Reaktion.

obere Abbildung: GST.KIBRA.WW.WT (Spur 1) bzw. GST.KIBRA.WW.dM (Spur 2) wurden mit humanem Gehirnlysat inkubiert. Im Vergleich zu Spur 2 ist die detektierte Proteinbande in Spur 1 deutlich stärker.

untere Abbildung: Expressionskontrolle der GST-Fusionsproteine. Durch Kreuzreaktionen des Sra-1 Antikörpers wurden die GST-Fusionsproteine angefärbt.

Im Gegensatz zu den im Hefesystem generierten Daten konnte durch GST-pull-down Experimente die Interaktion zwischen endogen exprimiertem Sra-1 und nativen KIBRA-WW-Domänen gezeigt werden. Ein Fragment von Sra-1, das inklusive eines potentiellen WW-Bindungsmotivs (LPxY) in Hefezellen exprimiert wurde, zeigte keine Interaktion mit KIBRA *full length*.

4.3 KIBRA-Überexpression und *-knock down* kultivierter Podozyten

Um die Funktion von KIBRA im Podozyten zu untersuchen, wurde rekombinantes KIBRA durch retrovirale Methoden in einer Podozytenzelllinie verstärkt exprimiert bzw. durch RNA-Interferenz in der Expression gehemmt (KIBRA *knock down*). Die KIBRA *knock down* Zellen wurden in Immunfluoreszenz Studien eingesetzt, um mit einem spezifischen β -Tubulin Antikörper gegebenenfalls Veränderungen des Tubulin-Zytoskeletts zu detektieren. Des Weiteren wurden die KIBRA *knock down* Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Phalloidin angefärbt, um etwaige Auswirkungen des KIBRA Defizits auf das Aktin-Zytoskelett zu untersuchen. Abschließend wurden Versuche durchgeführt, die Aufschluss über das Adhäsions- und Migrationsverhalten der Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression bringen sollten.

4.3.1 KIBRA-Überexpression kultivierter muriner Podozyten

Mit dem retroviralen Vektorsystem pLXSN wurde eine stabile FLAG-KIBRA überexprimierende Podozytenzelllinie generiert. Die Selektion der transduzierten Podozyten erfolgt durch die Zugabe von Geneticin. In Abbildung 4.5 ist die Überexpression von FLAG-KIBRA in einer Western Blot Analyse dargestellt.

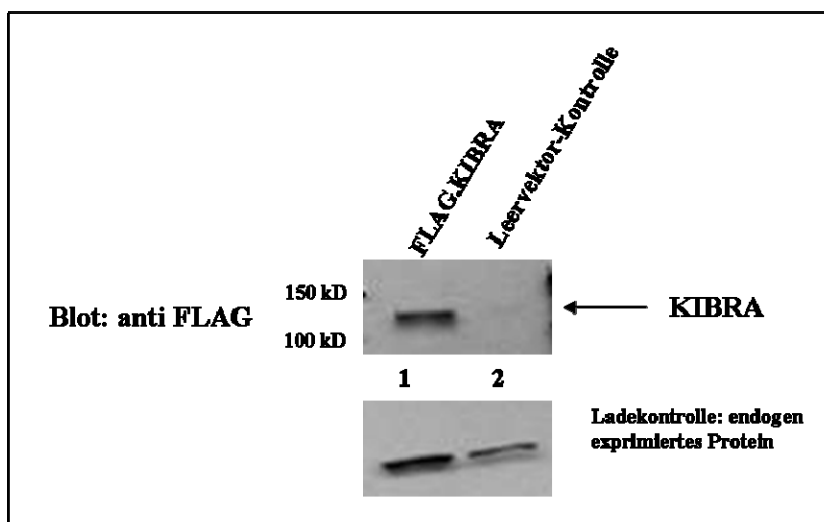


Abb. 4.5: Die Western Blot Analyse weist FLAG-KIBRA in Podozytenlysat nach. Kultivierte murine Podozyten wurden retroviral mit einem FLAG-KIBRA-Konstrukt bzw. dem entsprechenden Leervektor pLXSN transduziert. Aus den Podozyten wurden Zellysate gewonnen, die einer Western Blot Analyse unter Verwendung eines spezifischen FLAG-Antikörpers unterzogen wurden. Bei den mit FLAG-KIBRA transduzierten Zellen lässt sich eine spezifische Proteinbande detektieren (Spur 1, obere Abbildung), nicht aber bei Leervektor transduzierten Zellen (Spur 2, obere Abbildung). Ein endogenes Protein, mit dem der FLAG-Antikörper kreuzreagiert, wurde als Ladekontrolle benutzt.

4.3.2 Reduzierte KIBRA Expression kultivierter humaner Podozyten

4.3.2.1 Ermittlung der Reduktions- (*knock down*) Effizienz verschiedener *short hairpins*

Um die KIBRA *knock down* Effizienz der klonierten *short hairpins* (*sh*) innerhalb des pSuper Vektorsystems zu ermitteln, wurden HEK 293T Zellen transient ko-transfiziert und anschließend durch Western Blot und Luciferase Assays analysiert. (Vgl. Methoden, 3.4.4). In Abbildung 4.6 A ist eine Western Blot Analyse dargestellt, für die HEK 293T Zellen mit verschiedenen *short hairpin* Konstrukten und einem V5-KIBRA-Konstrukt transient ko-transfiziert wurden. Als Transfektions- und Ladekontrolle wurde zusätzlich ein V5-GFP-Konstrukt ko-transfiziert.

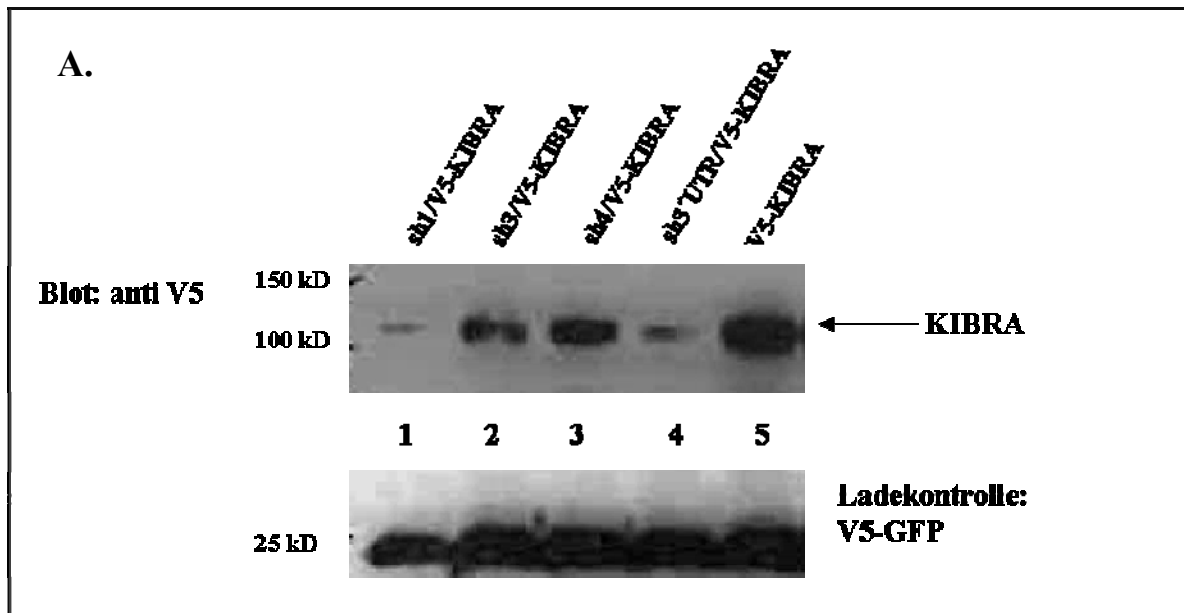


Abb. 4.6 A: Western Blot Analyse zur Ermittlung der KIBRA *knock down* Effizienz verschiedener *short hairpin* Konstrukte im pSuper Vektorsystem. Die *knock down* Effizienz verschiedener KIBRA spezifischer *short hairpin* Konstrukte (*short hairpin* 1, 3, 4 und 3'UTR), die durch RNAi zur Reduktion von KIBRA mRNA führen, wurde in einer Western Blot Analyse ermittelt. Dazu wurden HEK 293T transient ko-transfiziert. Pro Ansatz wurde jeweils ein *short hairpin* Konstrukt und deren Zielsequenz in Form eines V5-KIBRA Konstruktes ko-transfiziert, sowie ein V5-GFP Konstrukt als Transfektions- und Ladekontrolle. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, in dem ausschließlich das Zielprotein und die Ladekontrolle durch Transfektion eines V5-KIBRA-Konstruktes und eines V5-GFP-Konstruktes exprimiert wurden. Die HEK 293T Zellen wurden 24 h nach der Transfektion lysiert. Das Proteinlysate wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt. In der Abbildung ist das Ergebnis der anschließenden Western Blot Analyse dargestellt, für die ein spezifischer V5-Antikörper eingesetzt wurde. In der oberen Bildhälfte ist im Vergleich zu der Negativkontrolle (Spur 5) deutlich eine verminderte Intensität der Proteinbanden bei sh1 (Spur 1) und sh3'UTR (Spur4) zu sehen, was auf eine hohe *knock down* Effizienz dieser *short hairpin* Konstrukte schließen lässt. Der erzielte KIBRA-*knock down* von sh3 (Spur 2) und sh4 (Spur 4) ist wesentlich schwächer, da die detektierte Proteinbande von V5-KIBRA in ihrer Intensität zwar abgeschwächt, jedoch nicht in relevantem Maße reduziert ist. Das ko-transfizierte V5-GFP-Konstrukt diente als Transfektionskontrolle, in dem die Transfektionseffizienz durch die Expression von GFP mit einem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert wurde. Des Weiteren diente V5-GFP als Ladekontrolle, in dem durch Verwendung eines Mastermix (Vgl. Methoden, 3.4.4) die gleiche Menge an eingesetzten Konstrukten sichergestellt wurde.

Die höchste *knock down* Effizienz erreichten sh1 (Spur 1) und sh3'UTR (Spur 2). Im Vergleich dazu fällt der erzielte *knock down* von sh3 (Spur 2) bzw. sh4 (Spur 4) deutlich schwächer aus, was sich anhand der Intensität der Proteinbande von V5-KIBRA erkennen lässt.

Das Säulendiagramm in Abbildung 4.6 B zeigt die Auswertung eines Luciferase Assays, durch den mit einer weiteren Methode die *knock down* Effizienz der *short hairpins* im pSuper Vektorsystem validiert wurde. HEK 293T Zellen wurden analog zu dem Western Blot (Abb. 4.6 A) mit *short hairpin* Konstrukten transfiziert. Als Kontrolle diente ein KIBRA unspezifischer *short hairpin*. Zusätzlich wurde ein psiCHECK Konstrukt ko-transfiziert, das KIBRA als Fusionsprotein mit *Renilla*-Luciferase und parallel als Transfektionskontrolle *Firefly*-Luciferase exprimiert (Vgl. Methoden, 3.4.4).

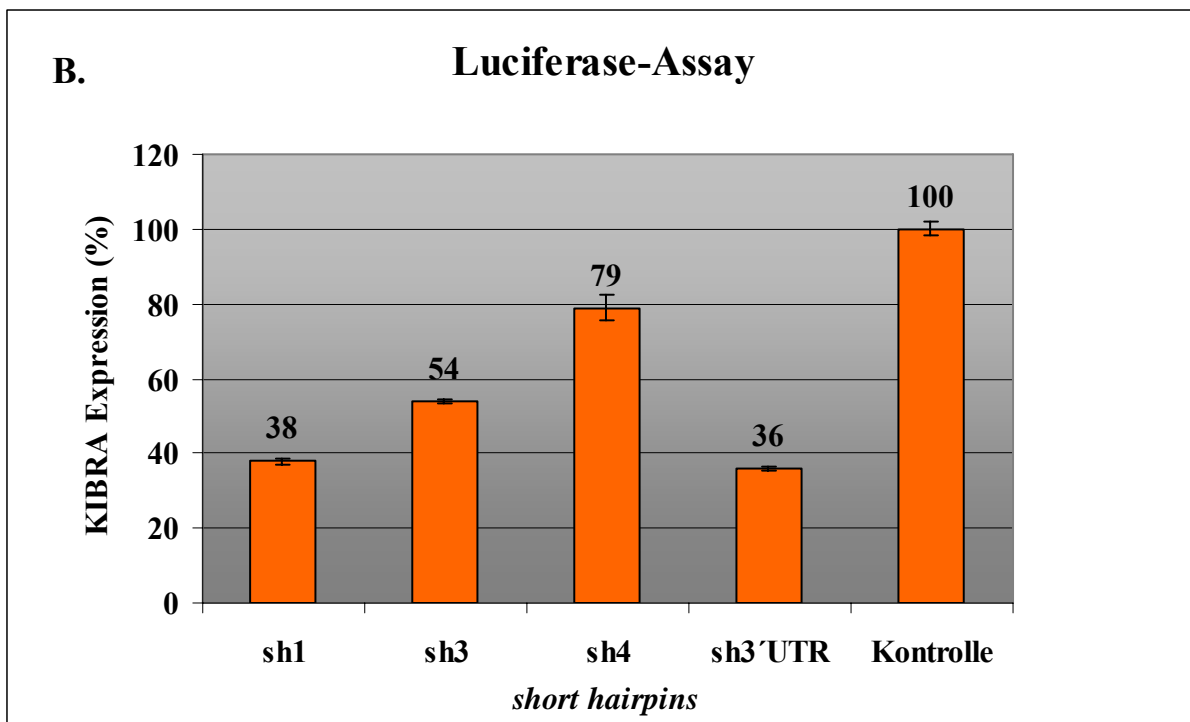


Abb. 4.6 B: Auswertung eines Luciferase Assays zur Ermittlung der KIBRA *knock down* Effizienz verschiedener *short hairpin* Konstrukte. Um die KIBRA *knock down* Effizienz verschiedener *short hairpin* Konstrukte neben der gezeigten Western Blot Analyse mit einer weiteren Methode zu testen, wurden pro Ansatz jeweils ein *short hairpin* Konstrukt und deren Zielsequenz in Form eines psiCHECK-KIBRA Konstruktes in HEK 293T Zellen ko-transfiziert. Das psiCHECK-Konstrukt exprimiert KIBRA als Fusionsprotein mit *Renilla*-Luciferase und zusätzlich eine Luciferase aus einem anderen Organismus, *Firefly*-Luciferase. Die Detektion der Expression der zwei verschiedenen Luciferasen erfolgt bei unterschiedlichen Wellenlängen. Für den Versuch wurden HEK 293T Zellen in einer 96 Well Zellkulturplatte kultiviert. Die Transfektionen wurden pro Ansatz dreimal durchgeführt. Für die Auswertung des Luciferase Assays wurde der jeweilige Mittelwert der detektierten *Renilla*-Luciferase in Verhältnis zu der detektierten *Firefly*-Luciferase gesetzt. Die *Firefly*-Luciferase diente dabei als Transfektionskontrolle. Der ermittelte Wert der *Renilla*-Luciferase, die als Fusionsprotein mit KIBRA exprimiert wurde (%-Angaben), stellt den direkten Nachweis eines KIBRA *knock down* (KD) dar. Das Säulendiagramm zeigt deutlich die reduzierte Expression von KIBRA bei sh1 (62 % KD) und sh3'UTR (64 % KD) im Verhältnis zu der Kontrolle (100%) mit einem KIBRA unspezifischen *short hairpin*. Im Gegensatz dazu induzieren sh3 (46 % KD) und sh4 (21 % KD) einen wesentlich geringeren KD.

Sowohl der Western Blot (Abb. 4.6 A) als auch der Luciferase Assay (Abb. 4.6 B) zeigen, dass *sh1* und *sh3'UTR* den stärksten KIBRA *knock down* induzieren. Diese beiden *short hairpins* wurden im Folgenden benutzt, um kultivierte humane Podozyten zu transduzieren.

4.3.2.2 Nachweis des KIBRA *knock down* in Podozyten

Die *short hairpin* Konstrukte *sh1* und *sh3'UTR* wurden aus dem Vektorsystem pSuper in das lentivirale Vektorsystem pLVTHM umkloniert (Vgl. Methoden, 3.4.5). Für die Produktion von Viruspartikeln wurden diese Konstrukte zusammen mit Hilfsplasmiden in HEK 293T Zellen transfiziert (Vgl. Methoden, 3.4.5.3). Nach erfolgter Transduktion kultivierter, humaner Podozyten mit den produzierten Viruspartikeln (Leervektor, *sh1* bzw. *sh3'UTR*) wurde der KIBRA *knock down* durch RT-PCR auf RNA-Ebene und durch Western Blot Analyse auf Protein-Ebene nachgewiesen. Dazu wurde aus den transduzierten Podozyten zunächst RNA isoliert, die zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen wurde (Vgl. Methoden, 3.1.1). In Abbildung 4.6 C sind die typischen 18 S und 28 S Banden der rRNA zu sehen. Anschließend wurde die RNA in einer RT-PCR eingesetzt (Vgl. Methoden, 3.1.4).

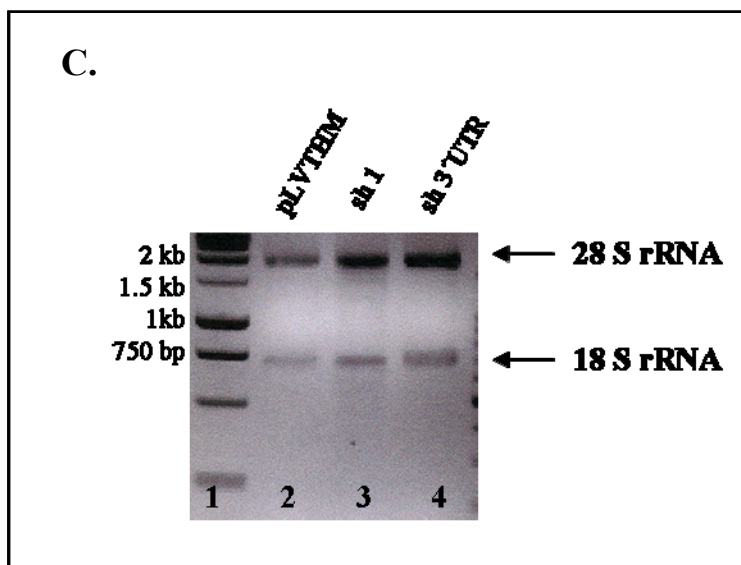


Abb. 4.6 C: Nachweis einer RNA-Isolierung aus transduzierten humanen Podozyten. Kultivierte humane Podozyten wurden mit Viruspartikeln des Leervektors des lentiviralen Systems (pLVTHM, Spur 2), bzw. mit KIBRA-KD induzierenden Viruspartikeln (pLVTHM *sh1*, Spur 3 und pLVTHM *sh3'UTR*, Spur 4) transduziert. Aus den transduzierten Podozyten wurde RNA isoliert, von der jeweils 150 ng in einem Agarosegel aufgetrennt wurden. Die Abbildung zeigt die typischen 18 S und 28 S rRNA Banden der isolierten RNA. Durch die Auftrennung isolierter RNA in einem Agarosegel wird deren Reinheit überprüft, insbesondere um eine Verunreinigung durch genomische DNA auszuschließen. Ein Marker mit angegebenen Größen wurde in Spur 1 aufgetragen.

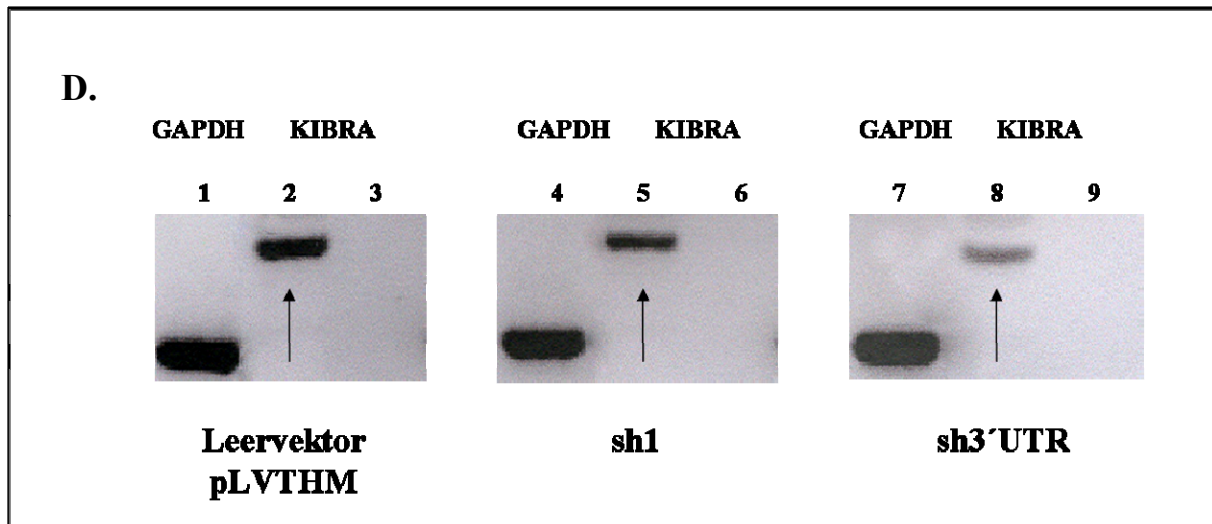


Abb. 4.6 D: Auswertung einer RT-PCR zur Validierung des KIBRA KD in kultivierten humanen Podozyten. Kultivierte humane Podozyten wurden mit Viruspartikeln des Leervektors des lentiviralen Systems (pLVTHM, Spuren 1-3), bzw. mit KIBRA-KD induzierenden Viruspartikeln (pLVTHM sh1, Spuren 4-6 und pLVTHM sh3'UTR, Spuren 6-9) transduziert. Aus den transduzierten Podozyten wurde RNA isoliert, die in einer RT-Reaktion eingesetzt wurde. Dabei wurde die RT-Reaktion für jede RNA einmal mit und einmal ohne Reverse Transkriptase angesetzt. Für die anschließende RT-PCR wurden KIBRA spezifische *Primer* (Spuren 2-3, 5-6, 8-9) und für die Kontrolle der erfolgreichen RT-Reaktion GAPDH spezifische *Primer* (Spuren 1, 4 und 7) eingesetzt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der RT-PCR. Die Pfeile weisen auf eine KIBRA spezifische Bande, deren Intensität bei den KD-Zellen (Spur 5 und 8) im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Zellen (Spur 2) deutlich reduziert ist.

In Abbildung 4.6 D ist das Ergebnis einer RT-PCR dargestellt, in der isolierte RNA aus transduzierten Podozyten eingesetzt wurde. Die mit Pfeilen gekennzeichneten cDNA-Banden spiegeln die KIBRA Expression auf mRNA-Ebene wieder. Im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Zellen (Spur 2) ist die Intensität des Signals bei den KD-Zellen (Spuren 5 und 8) deutlich reduziert. Die GAPDH-Kontrolle (Spuren 1, 4 und 7) stellt die gleiche Menge eingesetzter cDNA sicher. Der KIBRA *knock down* der transduzierten Podozyten konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Um dieses Ergebnis auf Proteinebene zu reproduzieren, wurden Lysate transduzierter Podozyten einer Western Blot Analyse unterzogen (4.6 E).

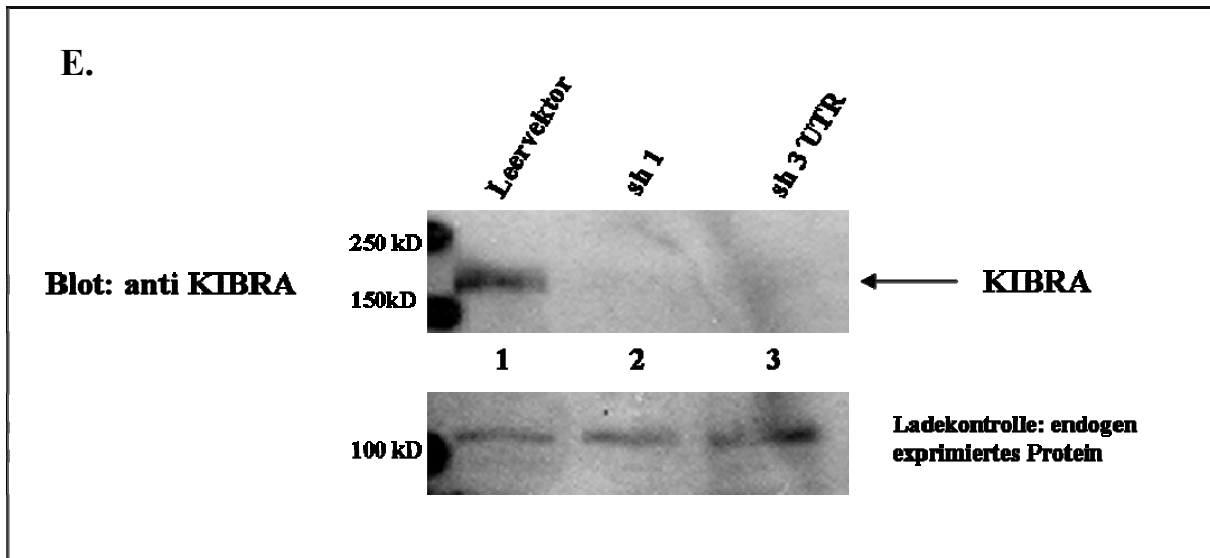


Abb. 4.6 E: Western Blot Analyse zur Validierung des KIBRA knock down (KD) in kultivierten humanen Podozyten. Kultivierte humane Podozyten wurden lentiviral transduziert mit dem Leervektor des lentiviralen Systems (pLVTHM, Spur 1), bzw. mit KIBRA-KD induzierenden Viruspartikeln (pLVTHM sh1, Spur 2 und pLVTHM sh3'UTR, Spur 3). Die transduzierten Podozyten wurden lysiert und das Zellysat durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abbildung zeigt das Ergebnis der anschließenden Wester Blot Analyse, für die ein spezifischer KIBRA-Antikörper eingesetzt wurde. In der oberen Bildhälfte ist die endogene KIBRA-Expression der Leervektor transduzierten Kontrollzellen (Spur 1) anhand der abgebildeten Proteinbande zu erkennen. Im Vergleich dazu ist bei den KIBRA-KD Zellen (Spur 2 und 3) keine KIBRA spezifische Proteinbande zu sehen. Ein endogenes Protein, mit dem der KIBRA-Antikörper kreuzreagiert, wurde als Ladekontrolle benutzt.

Die Abbildungen 4.6 D/E zeigen den KIBRA *knock down* (KD) auf mRNA- und Protein-Ebene in kultivierten, humanen Podozyten. Mit diesen KIBRA KD Podozyten wurden Fluoreszenzfarbstoff-markierte Färbungen des Zytoskeletts durchgeführt.

4.4 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Färbungen von KIBRA *knock down* (KD) Podozyten

Um den KIBRA KD durch Immunfluoreszenzstudien zu analysieren, wurden KIBRA KD Podozyten und Leervektor transduzierte Podozyten auf Deckgläschen kultiviert und anschließend fixiert (Vgl. Methoden, 3.2.8). Mit einem KIBRA spezifischen Antikörper konnte der KIBRA KD der Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.7 A/B). Das Tubulin-Zytoskelett wurde angefärbt, da eine partielle Ko-Lokalisation von KIBRA und Mikrotubuli gefunden wurde (Kremerskothen, unveröffentlichte Daten) und Rayala et al. eine Interaktion zwischen KIBRA und DLC1 (Vgl. Einleitung, 1.6.2), einem Bestandteil der Motorproteine des mikrotubulären Transportnetzwerkes, nachgewiesen hat [72]. Aufgrund der indirekten Assoziation von KIBRA an Sra-1 wurden anschließend Färbungen des Aktin-Zytoskeletts durchgeführt, um eine Beeinflussung des KIBRA KD auf die Aktinfilamente zu untersuchen.

4.4.1 Nachweis des KIBRA KD mit einem KIBRA spezifischen Antikörper

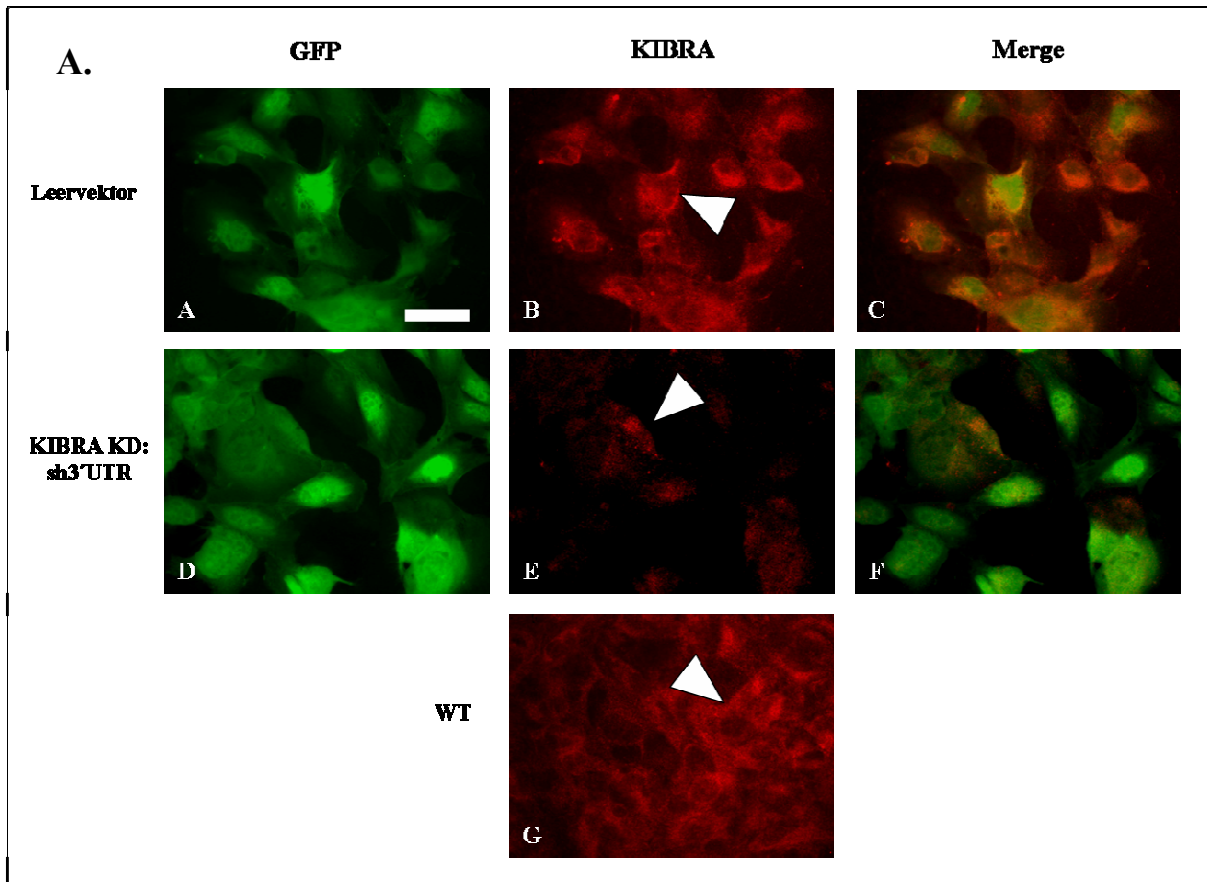


Abb. 4. 7 A: Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner KIBRA knock down Podozyten mit einem KIBRA spezifischen Antikörper.

Transduzierte humane KIBRA knock down (KD) Podozyten und Leervektor transduzierte Podozyten wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit einem KIBRA spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend folgte eine Behandlung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper. Mit einer an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera wurde das Ergebnis dokumentiert. Die transduzierten Podozyten exprimieren GFP (A: Leervektor; D: KIBRA KD). Die mit dem Leervektor transduzierten Podozyten (B) zeigen die gleiche zytoplasmatische Verteilung von KIBRA wie die untransduzierten Wildtypzellen (WT, G) mit einer perinukleären Anreicherung des Proteins (B, Pfeilspitze). Im Vergleich dazu ist eine deutliche Reduktion der KIBRA spezifischen Anfärbung bei den KIBRA KD Podozyten zu beobachten (E). Die übereinander gelagerten Merge-Bilder der Leervektor transduzierten Zellen (C) und der KIBRA KD Zellen (F) zeigen einen deutlichen Unterschied. Der Balken in A entspricht 50 µm.

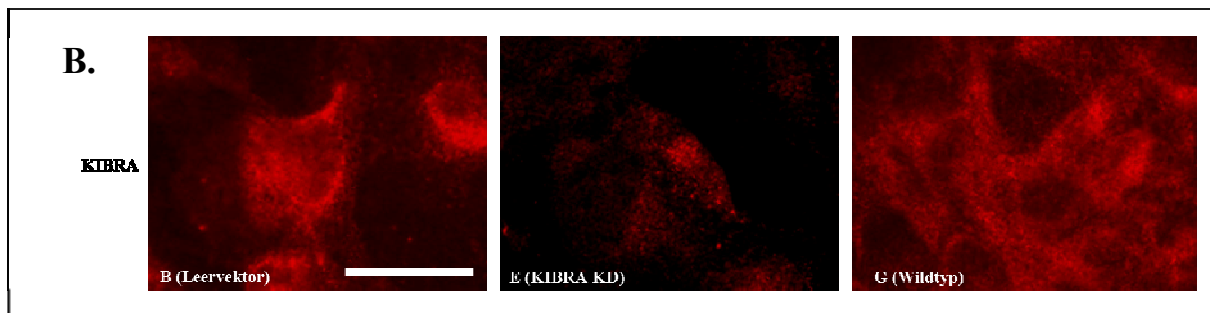


Abb. 4. 7 B: Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner KIBRA knock down Podozyten mit einem KIBRA spezifischen Antikörper (Vergrößerung). Die Abbildung zeigt einzeln heraus vergrößerte Zellen (Pfeilspitzen) aus Abbildung 4.7 A. Dargestellt sind Leervektor transduzierte (B), KIBRA KD (E) und Wildtyp (G) Podozyten. Der Balken in B entspricht 50 µm.

4.4.2 Auswirkungen des KIBRA KD auf das Tubulin-Zytoskelett

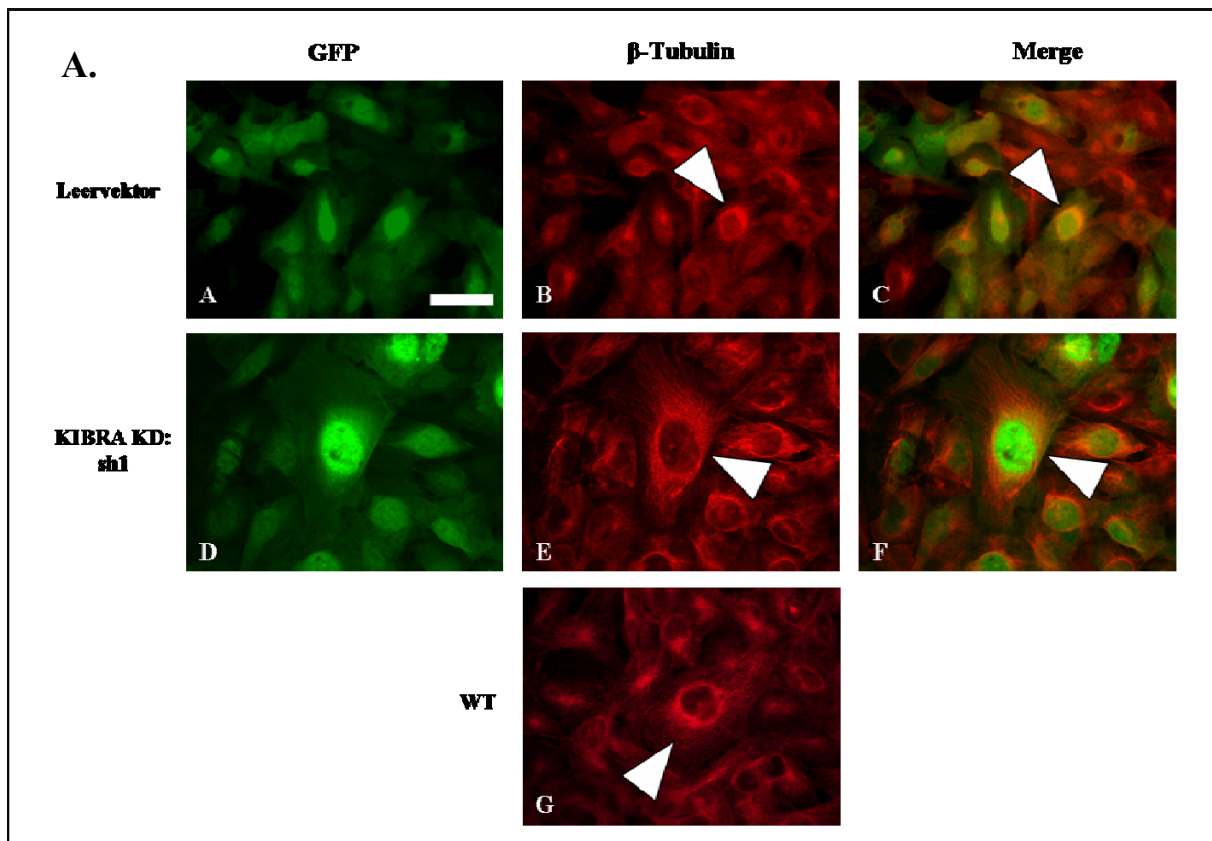


Abb. 4. 8 A: Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner KIBRA *knock down* Podozyten mit einem Tubulin spezifischen Antikörper.

Transduzierte humane KIBRA *knock down* (KD) Podozyten und Leervektor transduzierte Podozyten wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit einem β -Tubulin Antikörper inkubiert. Anschließend folgte eine Behandlung der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörper. Mit einer an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera wurde das Ergebnis dokumentiert. Die transduzierten Podozyten exprimieren GFP (A: Leervektor; D: KIBRA KD). Im Vergleich zu den Wildtypzellen (WT, G) ist bei den Leervektor transduzierten (B) und den KIBRA KD Podozyten (E) kein Unterschied bezüglich der Tubulinfärbung zu erkennen. Die Pfeilspitzen in den übereinander gelagerten *Merge*-Bildern weisen auf einzelne transduzierte Zellen. Der Balken in A entspricht 50 μ m.

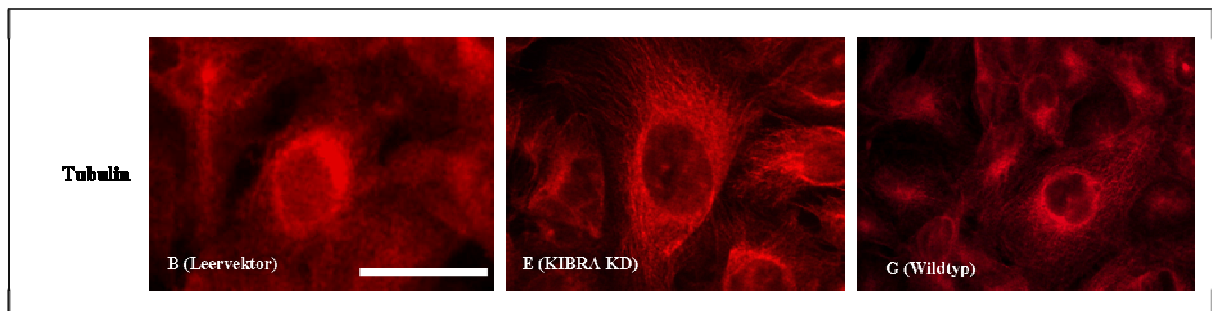


Abb. 4. 8 B: Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner KIBRA *knock down* Podozyten mit einem Tubulin spezifischen Antikörper (Vergrößerung). Die Abbildung zeigt einzeln heraus vergrößerte Zellen (Pfeilspitzen) aus Abbildung 4.8 A. Eine Veränderung des Tubulin-Zytoskeletts ist nicht zu erkennen. Dargestellt sind Leervektor transduzierte (B), KIBRA KD (E) und Wildtyp (G) Podozyten. Der Balken in B entspricht 50 μ m.

4.4.3 Auswirkungen des KIBRA KD auf das Aktin-Zytoskelett

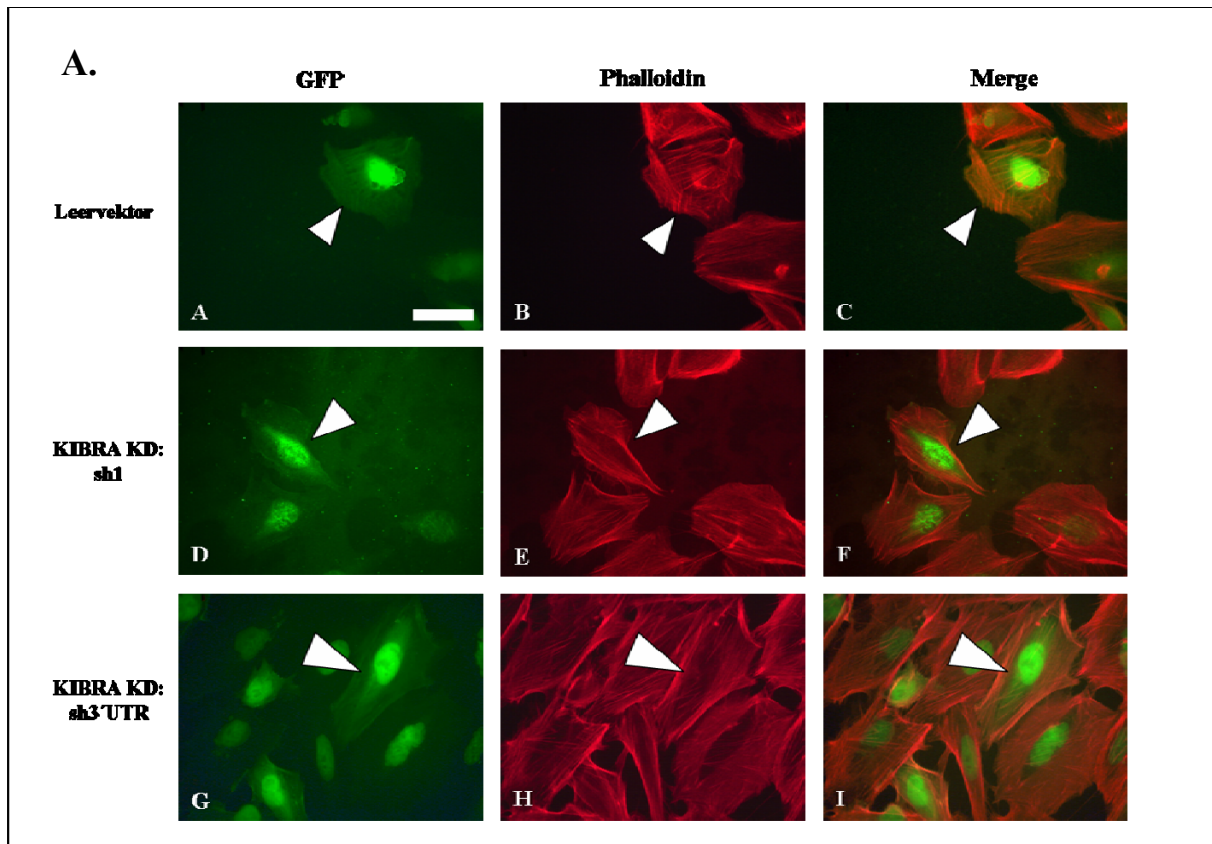


Abb. 4. 9 A: Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts kultivierter humaner KIBRA *knock down* Podozyten.

Transduzierte humane KIBRA *knock down* (KD) Podozyten und Leervektor transduzierte Podozyten wurden auf Deckgläschen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und mit einer Fluoreszenzfarbstoff-markierten Phalloidin-Lösung behandelt. Mit einer an ein Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Kamera wurde das Ergebnis dokumentiert. Die transduzierten Podozyten exprimieren GFP (A: Leervektor; D/G: KIBRA KD). Das angefärbte Aktin-Zytoskelett zeigt die typischen *stress fibres* (B, E, H). Eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts der KIBRA KD Podozyten im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Zellen ist nicht zu erkennen. In den *Merge*-Bildern (C, F, I) sind die GFP-exprimierenden, transduzierten Podozyten mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Balken in A entspricht 50 μ m.

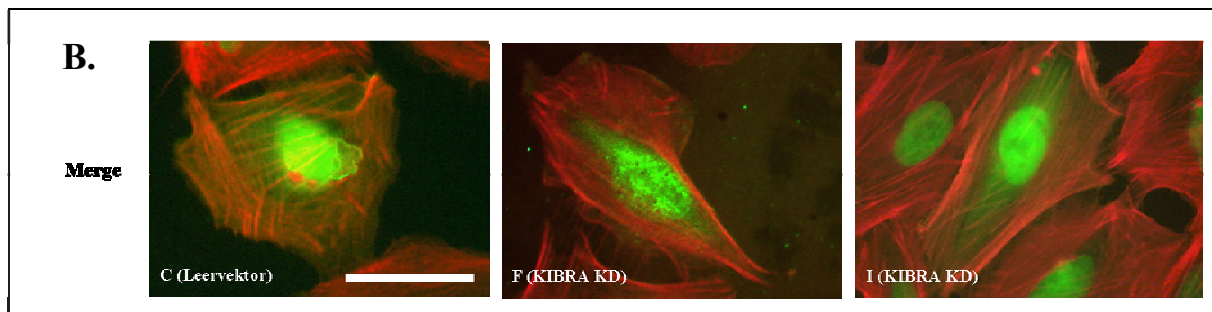


Abb. 4. 9 B: Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts kultivierter humaner KIBRA *knock down* (KD) Podozyten (Vergrößerung). Die Abbildung zeigt einzeln heraus vergrößerte Zellen aus Abbildung 4.9 A (Pfeilspitzen). Dargestellt sind elektronisch übereinander gelegte *Merge*-Bilder, mit denen die GFP-Expression und das angefärbte Aktin-Zytoskelett der transduzierten Podozyten dokumentiert werden. Ein Unterschied der *stress fibres* des Aktin-Zytoskeletts zwischen Leervektor transduzierten Zellen (C) und KIBRA KD Podozyten (sh1, F bzw. sh3'UTR, I) ist nicht zu erkennen. Der Balken in C entspricht 50 μ m.

Der KIBRA KD der transduzierten Podozyten konnte mit einem KIBRA-spezifischen Antikörper gezeigt werden (Abb. 4.7 A/B). Mit dem Leervektor transduzierte Zellen zeigen analog zu den Wildtyp Zellen die typische zytoplasmatische Verteilung von KIBRA mit einer perinukleären Anreicherung des Proteins. Eine deutliche Reduktion von KIBRA ist bei den KIBRA KD Zellen durch eine erheblich schwächere Fluoreszenz zu erkennen. Sowohl die Leervektor transduzierten Podozyten als auch die KIBRA KD Zellen lassen sich durch die Expression von GFP von nicht transduzierten Zellen unterscheiden. Auswirkungen des KIBRA KD auf das Zytoskelett konnten weder mit der Anfärbung der Mikrotubuli durch einen β -Tubulin Antikörper (Abb. 4.8 A/B) noch durch die Anfärbung der Aktinfilamente mit Phalloidin (Abb. 4.9 A/B) festgestellt werden. Transduzierte und nicht-transduzierte Zellen der Zytoskelett-Färbungen zeigten die typisch faserige Struktur der Mikrotubuli bzw. die *stress fibres* der Aktinfilamente. Unterschiede in der Morphologie des Zytoskeletts konnten weder zwischen Leervektor transduzierten Podozyten und KIBRA KD Podozyten noch zwischen Kontrollzellen und Wildtyp Zellen beobachtet werden.

4.5 Adhäsionsassay

Um die Auswirkungen einer fehlregulierten KIBRA Expression auf Podozyten zu untersuchen, wurden *Adhäsionsassays* durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression und KIBRA *knock down* (KD) Podozyten eingesetzt. Als Kontrolle dienten jeweils mit dem entsprechenden Leervektor transduzierte Zellen. Die transduzierten Podozyten wurden zunächst trypsiniert und ausgezählt. Mit einer definierten Zellzahl/*Well* wurden die Zellen in einer 12 *Well* Zellkulturplatte ausgesät (Vgl. Methoden, 3.3.5). Nach einer Inkubation von 1 h im Zellkulturbrutschrank bei 37°C wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und fixiert. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der adhärenen Zellen anhand von Fotos, die digital angefertigt wurden.

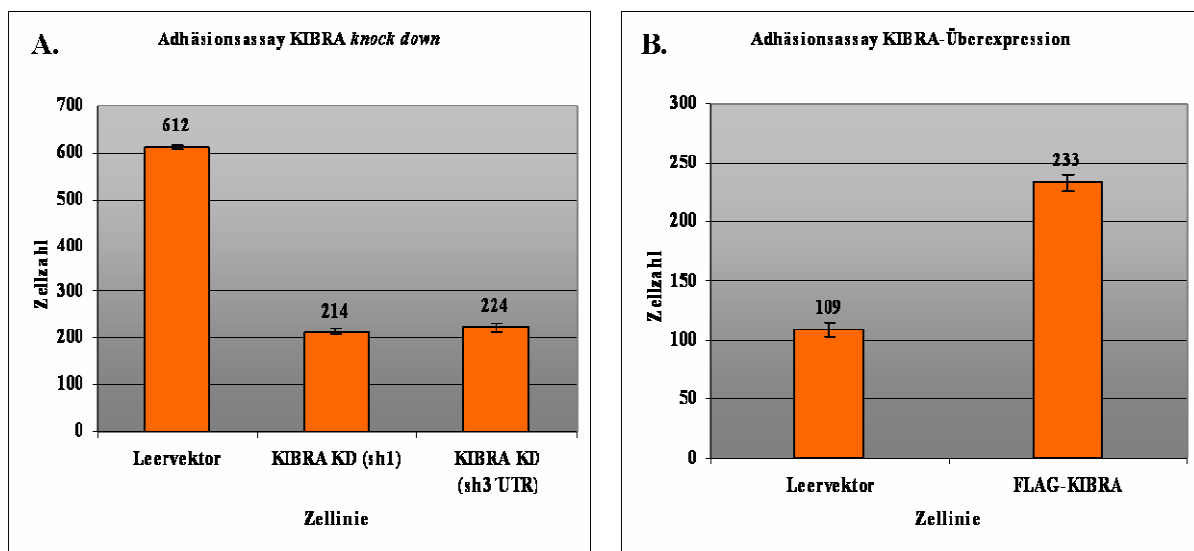


Abb. 4.10

A: Adhäsionsassay kultivierter humaner KIBRA knock down (KD) Podozyten und Leervektor transduzierter Podozyten. Um Auswirkungen des KIBRA KD auf das Adhäsionsverhalten von Podozyten zu untersuchen, wurden transduzierte KIBRA KD Podozyten und Leervektor transduzierte Podozyten in einer definierten Zellzahl/*Well* in einer 12 *Well* Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank wurden die Zellen vorsichtig gewaschen und fixiert. Von den adhärenen Zellen wurden digitale Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der Zellen anhand der angefertigten Bilder. Das Säulendiagramm zeigt die Zellzahl/Fläche (0.2 mm²). Der angegebene Fehlerbalken stellt die jeweilige Standardabweichung dar. Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Die ausgezählte Gesamtzellzahl, die jeweils über den Balken des Diagramms angegeben ist, zeigt deutlich die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit der Zellen. Die KIBRA KD Podozyten zeigen eine um 66 % (KIBRA KD *short hairpin 1*, sh1) bzw. um 64 % (KIBRA KD *short hairpin 3'UTR*, sh3'UTR) reduzierte Adhäsion gegenüber den Leervektor transduzierten Kontrollzellen.

B: Adhäsionsassay kultivierter muriner KIBRA überexprimierender Podozyten und Leervektor transduzierten Podozyten. Analog zu den KIBRA KD Podozyten wurde der Adhäsionsassay mit FLAG-KIBRA und Leervektor transduzierten murinen Podozyten in drei Versuchsreihen durchgeführt. Die Adhäsion der KIBRA überexprimierenden Podozyten war verglichen mit den Leervektor transduzierten Kontrollzellen um 53 % erhöht.

Das Ergebnis der Adhäsionsassays zeigt mit 64 % bzw. 66 % eine signifikante Reduktion des Adhäsionspotentials von KIBRA KD Podozyten im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 4.10 A). Verglichen mit den Kontrollzellen konnte bei den Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression dagegen eine deutlich höhere (53 %) Adhäsion ermittelt werden. Die Beeinflussung der Adhäsionsfähigkeit von Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression spricht daher für eine maßgebliche Funktion, die KIBRA bei der Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten zukommt.

4.6 Migrationsassay

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Bedeutung von KIBRA bezüglich der Zellmigration zu untersuchen (Vgl. Methoden, 3.3.6). Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression und entsprechende Kontrollzellen wurden dazu in Zellkulturflaschen vereinzelt ausgesät und im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Für den Versuch wurden die Zellkulturflaschen parallel in beheizbare Kammern unter Mikroskopen platziert. Zusammen mit der Möglichkeit, die Kulturflaschen fest zu verschließen, konnten die Experimente unter konstanten Bedingungen, gleich einem Zellkulturinkubator, bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt durchgeführt werden. Nachdem ein passender Bildausschnitt gewählt wurde, in dem die Zellen möglichst einzeln vorlagen, wurde über einen Zeitraum von 5 h jede Minute (KIBRA KD Podozyten) bzw. alle 10 Min (KIBRA Überexpression) durch an die Mikroskope angeschlossene Kameras ein Bild aufgenommen. Für die Auswertung wurde unter zu Hilfenahme von entsprechenden Bildbearbeitungsprogrammen der Zellumriss nachgezeichnet. Mit weiterer *Software* wurde durch die Berechnung des jeweiligen Zellmittelpunktes die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen sowie die zurückgelegte Strecke (Translokation) berechnet (Vgl. Einleitung 3.3.6). Die Zellfläche und der Strukturindex der einzelnen Zellen wurden gleichfalls ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in Säulendiagrammen (Abb. 4.11 A-D und Abb. 4.12 A-D) zusammengefasst.

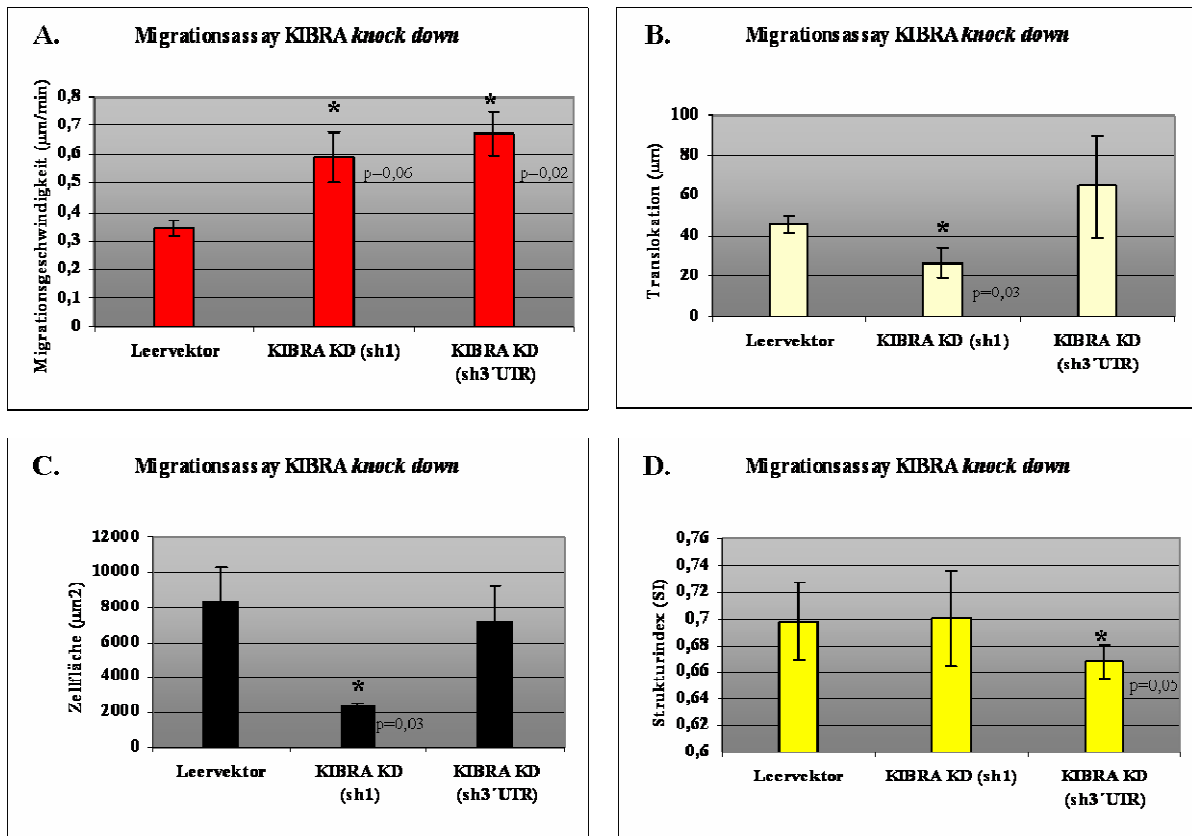


Abb. 4.11 Migrationsassay kultivierter humaner KIBRA KD- und Leervektor transduzierter Podozyten. Mit diesem Experiment wurde das Migrationsverhalten von KIBRA KD Podozyten untersucht. Als Kontrollen dienten Leervektor transduzierte Podozyten. Die KIBRA KD Podozyten und die Kontrollzellen wurden in Zellkulturflaschen ausgesät, sodass die Zellen vereinzelt vorlagen. Zum Ausdifferenzieren wurden die Zellen 10 Tage bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Für den Versuch wurden die Flaschen in beheizbare Kammern platziert, die passgenau an Mikroskopen installiert sind. Diese Installation gewährleistet die Beobachtung der Zellen unter Zellkulturbedingungen, da konstant 37°C aufrechterhalten werden. Die verwendeten Zellkulturflaschen lassen sich fest verschließen, wodurch der interne CO₂-Gehalt von 5 % gleich einem Zellkulturinkubator bestehen bleibt. Mit an den Mikroskopen angeschlossenen Kameras konnten Aufnahmen der Zellen angefertigt werden. Nachdem ein geeigneter Bildausschnitt gewählt wurde, in dem die Zellen vereinzelt vorlagen, wurde über einen Zeitraum von 5 h jede Minute ein Bild aufgenommen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung geeigneter Programme, wobei die Migrationsgeschwindigkeit, die zurückgelegte Strecke (Translokation), die Zellfläche und der Strukturindex der Zellen berücksichtigt wurden. Von den Leervektor transduzierten Podozyten wurden die Aufnahmen (301) von 4 Zellen ausgewertet, von den KIBRA KD Podozyten 4 (*short hairpin 1*, sh1) bzw. 3 (*short hairpin 3'UTR*, sh3'UTR) Zellen. Die Fehlerbalken wurden durch eine Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte erhoben (STABWN/Wurzel(Zellzahl)). Die mit * gekennzeichneten Balken zeigen eine signifikante Abweichung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Student's t-test), wobei ein Wert von $p < 0,05 \pm 0,01$ als signifikant angenommen wurde.

A: Migrationsgeschwindigkeit (µm / Min)

Das Säulendiagramm (A) gibt die mittlere Migrationsgeschwindigkeit von Leervektor transduzierten und KIBRA KD Podozyten wieder. Mit diesem Wert wird die Geschwindigkeit ausgedrückt, mit der eine Zelle Lamellipodien ausbildet, indem sich der Zellmittelpunkt verschiebt. Es besteht dabei die Möglichkeit, dass Zellen mit relativ hoher Geschwindigkeit Lamellipodien aus- und rückbilden, ohne dabei eine nennenswerte Strecke zurückzulegen. Dies erklärt den Umstand, dass einige Zellen eine hohe Migrationsgeschwindigkeit erreichen, obwohl eine ungleich geringere Translokation festgestellt wird. Die KIBRA KD Podozyten bilden mit 0,58 µm/Min (sh1) bzw. 0,67 µm/Min (sh3'UTR) im Vergleich zu den Kontrollzellen mit 0,34 µm/Min nahezu doppelt so schnell Zellfortsätze aus.

B: Translokation (µm)

Abbildung B zeigt mit der Translokation der Zellen die tatsächlich zurückgelegte Strecke. Die KIBRA KD Podozyten, die mit sh1 transduziert wurden, haben sich 26,6 µm fortbewegt, was signifikant ($p=0,02$) weniger ist

als die Kontrollzellen (45,5 μm). Verglichen damit haben sich die KIBRA KD Podozyten, die mit sh3'UTR transduziert wurden, relativ weit fortbewegt (64,8 μm). Der hohe Fehlerbalken zeigt jedoch, dass in diesem Fall kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollzellen vorliegt ($p=0,6$).

C: Zellfläche (μm^2)

Die Zellfläche (C) der KIBRA KD Podozyten war im Falle der mit sh1 transduzierten Zellen mit 2350 μm^2 signifikant ($p=0,03$) kleiner als die Fläche der Kontrollzellen mit 8315 μm^2 . Verglichen mit den sh3'UTR transduzierten KIBRA KD Zellen (7243 μm^2) gab es keinen Unterschied.

D: Strukturindex (SI)

Der Strukturindex ist ein Maß für die Morphologie einer Zelle, wobei ein Wert von 1 einer globulären Morphologie entspricht und ein Wert, der gegen 0 tendiert für eine gestreckte bzw. dendritische Zelle steht. Zwischen den Leervektor transduzierten Zellen (0,69) und den KIBRA KD Podozyten gab es bei einer Zelllinie keinen Unterschied zu verzeichnen (sh1: 0,7) und bei der anderen KD Zelllinie einen signifikanten ($p=0,05$) Unterschied (sh3'UTR: 0,67).

Im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Kontrollzellen bilden die KIBRA KD Podozyten signifikant schneller Zellfortsätze aus (Abb. 4.11 A), bewegen sich aber deutlich weniger (KIBRA KD sh1) bzw. nicht signifikant (KIBRA KD sh3'UTR) weiter fort als diese (Abb. 4.11 B). Die Zellfläche der KIBRA KD Podozyten ist dabei kleiner (KIBRA KD sh1) bzw. vergleichbar (KIBRA KD sh3'UTR) mit den Kontrollzellen (Abb. 4.11 C). Im Unterschied zu den Kontrollzellen zeigt eine KIBRA KD Zelllinie (KIBRA KD sh3'UTR) eine signifikant gestreckte Morphologie (Abb. 4.11 D).

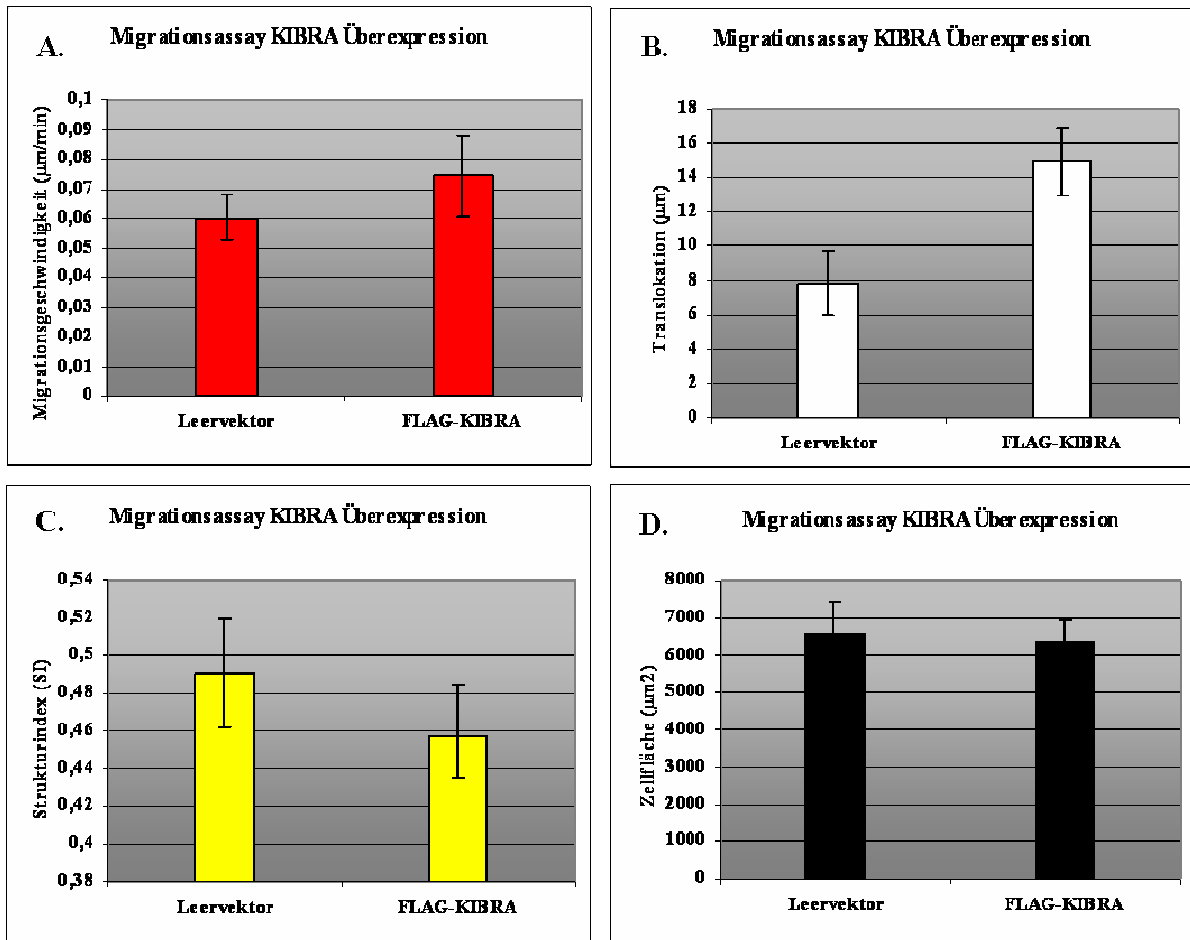


Abb. 4.12 Migrationsassay kultivierter muriner KIBRA überexprimierender und Leervektor transduzierter Podozyten. Dieses Experiment sollte Aufschluss über das Migrationsverhalten von FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten bringen. Als Kontrollen dienten Leervektor transduzierte Podozyten. Die Durchführung erfolgte analog zu dem KIBRA KD Migrationsassay (Abb. 4.11). Die Aufnahmen (31) von 29 Kontrollzellen und 31 FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten wurden ausgewertet.

A: Migrationsgeschwindigkeit (µm / Min)

Das Säulendiagramm (A) gibt die mittlere Migrationsgeschwindigkeit von Leervektor und FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten wieder. Ein nennenswerter Unterschied zwischen den Kontrollzellen (0,06 µm/Min) und FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten (0,07 µm/Min) konnte mit $p=0,5$ nicht festgestellt werden.

B: Translokation (µm)

Abbildung B zeigt mit der Translokation der Zellen die tatsächlich zurückgelegte Strecke. Obwohl die FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten eine mittlere Strecke von 14,9 µm zurückgelegt hatten und die Kontrollzellen mit 7,8 µm nur etwa die Hälfte dieser Strecke, zeigte sich mit $p=0,1$ kein signifikanter Unterschied, was auf eine sehr hohe Standardabweichung zurückzuführen ist.

C: Zellfläche (µm²)

Unterschiede bezüglich der Zellfläche konnten zwischen den Kontrollzellen (6539 µm²) und den FLAG-KIBRA transduzierten Zellen (6376 µm²) nicht ermittelt werden.

D: Strukturindex (SI)

Der Strukturindex, der ein Maß für die Morphologie einer Zelle darstellt, geht bei einem Wert von 1 von einer globulären Struktur und einem Wert, der gegen 0 tendiert, von einer gestreckten bzw. dendritischen Struktur der Zelle aus. Zwischen den Leervektor transduzierten Zellen (0,49) und den FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten (0,45) war kein Unterschied zu verzeichnen.

Insgesamt zeigten sich bei dem Migrationsassay der FLAG-KIBRA- im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Podozyten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der ermittelten Parameter.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein *knock down* des Proteins KIBRA das Migrationsverhalten kultivierter, humaner Podozyten im Vergleich zu Kontrollzellen maßgeblich und signifikant beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte kein Unterschied zu entsprechenden Kontrollen im Migrationsverhalten von kultivierten, murinen FLAG-KIBRA überexprimierenden Podozyten ermittelt werden.

4.7 Wound Healing Assay

Im Unterschied zu Migrationsassays, bei denen das Migrationsverhalten einzelner Zellen untersucht wird, kann durch *Wound Healing Assays* das gerichtete Einwandern von Zellen innerhalb eines Zellverbandes analysiert werden. Kultivierte Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression wurden in *Wound Healing Assays* eingesetzt. Ziel dieser Experimente war es, Aufschluss über die Fähigkeit von Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression zu gewinnen, gerichtet in eine gesetzte Wunde einzuwandern.

Für die Versuche wurden transduzierte Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression (*knock down* und Überexpression) und entsprechende Kontrollzellen in Zellkulturflaschen kultiviert, bis sich konfluente Zellmonolayer ausgebildet hatten (Vgl. Methoden, 3.3.7). Unter Zuhilfenahme einer Pipettenspitze wurde eine Wunde in den Monolayer gesetzt. Der Wundverschluss durch gerichtetes Einwandern der Zellen wurde analog den Migrationsassays via Videomikroskopie dokumentiert. In Abbildung 4.13 sind exemplarisch Bilder mit gesetzten Wunden zum Zeitpunkt 0, nach 5 h und nach 10 h dargestellt. Abbildung 4.13 A zeigt deutlich, dass die Kontrollzellen nach 10 h bereits stark in die gesetzte Wunde eingewandert sind, im Gegensatz zu den KIBRA KD Podozyten. FLAG-KIBRA transduzierte Podozyten wandern im Vergleich zu den Kontrollzellen wesentlich langsamer in die gesetzte Wunde ein (Abb. 4.13 B). Bereits nach 5 h haben die Kontrollzellen die Wunde verschlossen, wohingegen die FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten auch nach 10 h keinen vollständigen Wundverschluss zeigen.

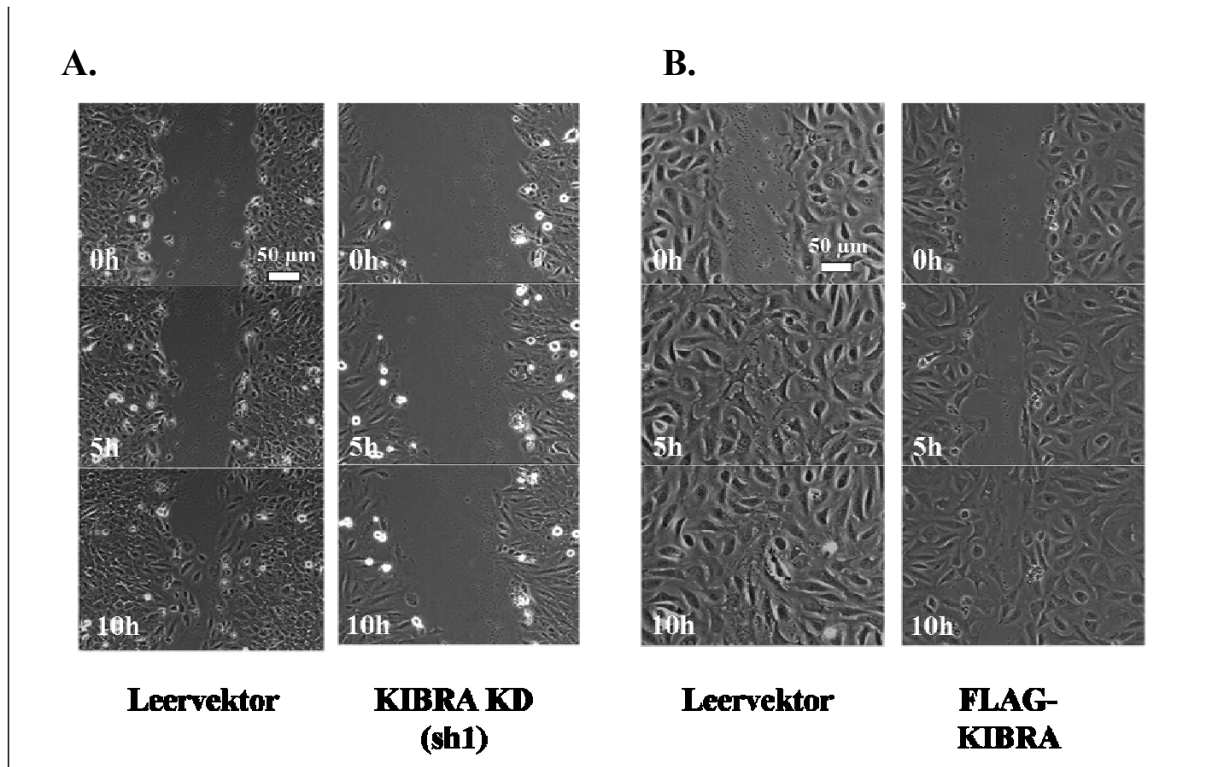


Abb. 4.13: Wound Healing Assays kultivierter humaner KIBRA knock down (KD) Podozyten (A) und muriner FLAG-KIBRA transduzierter Podozyten (B).

Für die Durchführung von *Wound Healing Assays* wurden Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression und entsprechende Leervektor transduzierte Kontrollzellen in Zellkulturflaschen kultiviert, bis konfluente Zellmonolayer ausgebildet waren. Mithilfe einer Pipettenspitze wurde eine Wunde in den Zellrasen eingefügt. Die Zellen wurden gewaschen, mit frischem Medium versetzt und für 1 h bei 37°C im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Im Folgenden wurden die Flaschen in beheizbare Kammern platziert, die passgenau an Mikroskopen installiert sind. Diese Installation gewährleistet die Beobachtung der Zellen unter Zellkulturbedingungen, da konstant 37°C aufrechterhalten werden. Die verwendeten Zellkulturflaschen lassen sich fest verschließen, wodurch der interne CO₂-Gehalt von 5 % gleich einem Zellkulturinkubator bestehen bleibt. Mit an den Mikroskopen angeschlossenen Kameras wurden Aufnahmen der Zellen angefertigt. Nachdem ein geeigneter Bildausschnitt gewählt wurde, in dem das Einwandern der Zellen in die gesetzte Wunde dokumentiert werden konnte, wurde über einen Zeitraum von 10 h alle 5 Minuten (KIBRA KD) bzw. alle 3 Minuten (KIBRA-Überexpression) ein Bild aufgenommen. Die Auswertung (Abb. 4.14 und 4.15) erfolgte unter Verwendung geeigneter Programme, wobei die Migrationsgeschwindigkeit, die zurückgelegte Strecke (Translokation), die Zellfläche und der Strukturindex der Zellen berücksichtigt wurden. In Versuch A. wurden 121, in B. 181 Aufnahmen angefertigt. Die Abbildung zeigt Aufnahmen zum Zeitpunkt 0 (0 h), 5 h und 10 h nach Einbringen der Wunde.

A: Im Vergleich zu den Kontrollzellen ist bei den KIBRA KD Podozyten auch nach 10 h nahezu kein Wundverschluss festzustellen.

B: Die FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten wandern deutlich langsamer in die gesetzte Wunde ein als die Kontrollzellen. Nach 10 h ist die Wunde bei beiden Zelllinien wieder geschlossen.

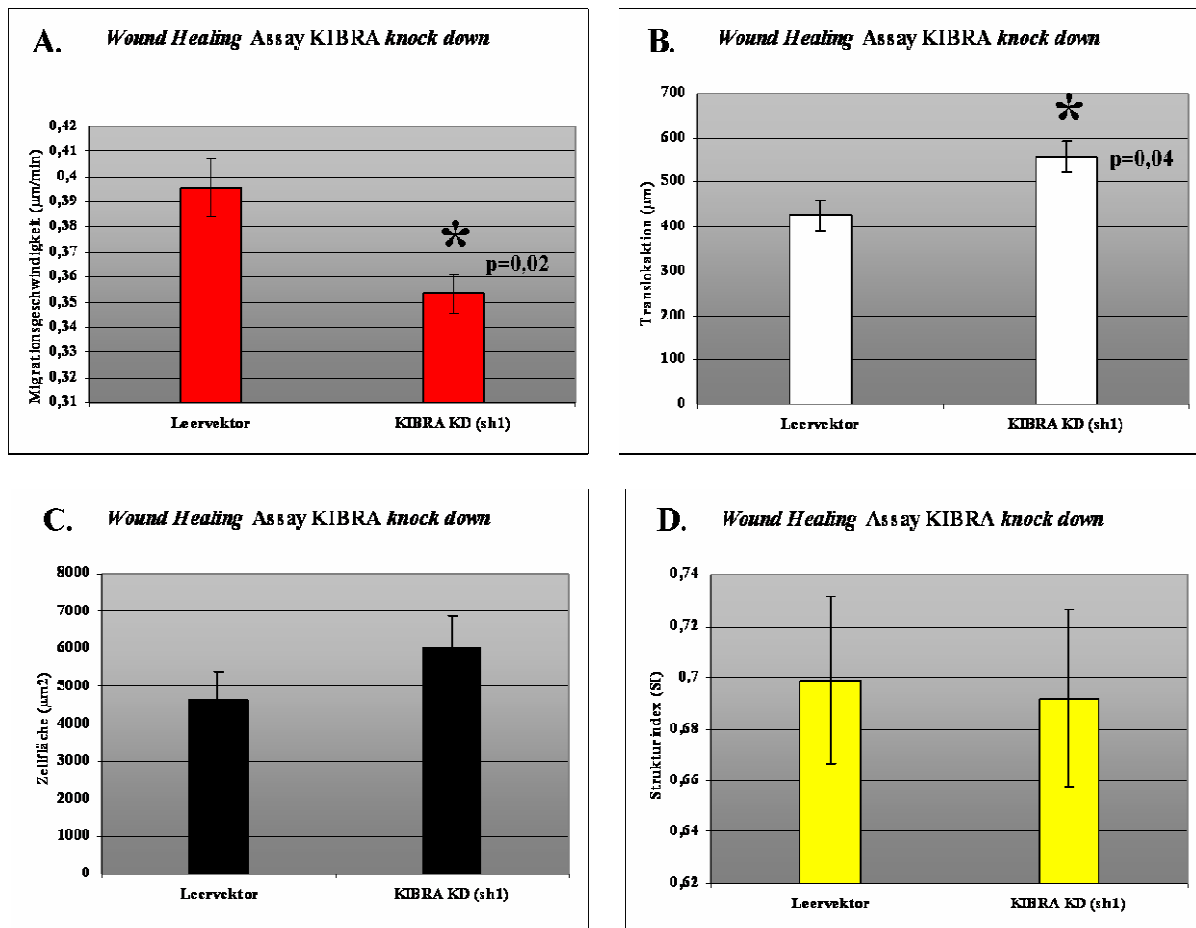


Abb. 4.14: Wound Healing Assay kultivierter humaner KIBRA knock down (KD) Podozyten.

(Durchführung: Vgl. Abbildungsunterschrift 4.13; Methoden, 3.3.7). Die Aufnahmen (121) von jeweils 6 Zellen wurden ausgewertet. Die Fehlerbalken wurden durch eine Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte erhoben (STABWN/Wurzel (Zellzahl)). Die gekennzeichneten Balken (*) zeigen eine signifikante Abweichung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Student's t-test), wobei ein Wert von $p < 0,05 \pm 0,01$ als signifikant angenommen wurde.

A: Migrationsgeschwindigkeit (µm / Min)

Das Säulendiagramm (A) gibt die mittlere Migrationsgeschwindigkeit von Leervektor transduzierten und KIBRA KD Podozyten wieder. Ein signifikanter Unterschied ($p=0,02$) zeigt sich deutlich zwischen Kontrollzellen, die durchschnittlich mit einer Geschwindigkeit von $0,395 \mu\text{m}/\text{Min}$ migrieren und KIBRA KD Zellen ($0,35 \mu\text{m}/\text{Min}$).

B: Translokation (µm)

Abbildung B zeigt mit der Translokation der Zellen die tatsächlich zurückgelegte Strecke. Obwohl die KIBRA KD Podozyten im Mittel eine deutlich ($p=0,04$) größere Strecke zurücklegen ($557,9 \mu\text{m}$) als die Leervektor transduzierten Zellen ($425,7 \mu\text{m}$), ist die Bewegung nicht auf den Wundverschluss gerichtet (Vgl. Abb. 4.13 A).

C: Zellfläche (µm²)

Unterschiede bezüglich der Zellfläche konnten zwischen den Kontrollzellen ($4657 \mu\text{m}^2$) und den KIBRA KD Zellen ($6040 \mu\text{m}^2$) nicht ermittelt werden.

D: Strukturindex (SI)

Der Strukturindex, der ein Maß für die Morphologie einer Zelle darstellt, geht bei einem Wert von 1 von einer globulären Struktur und bei einem Wert, der gegen 0 tendiert, von einer gestreckten bzw. dendritischen Struktur der Zelle aus. Zwischen den Leervektor transduzierten Zellen (0,7) und den KIBRA KD Podozyten (0,7) war kein Unterschied zu verzeichnen.

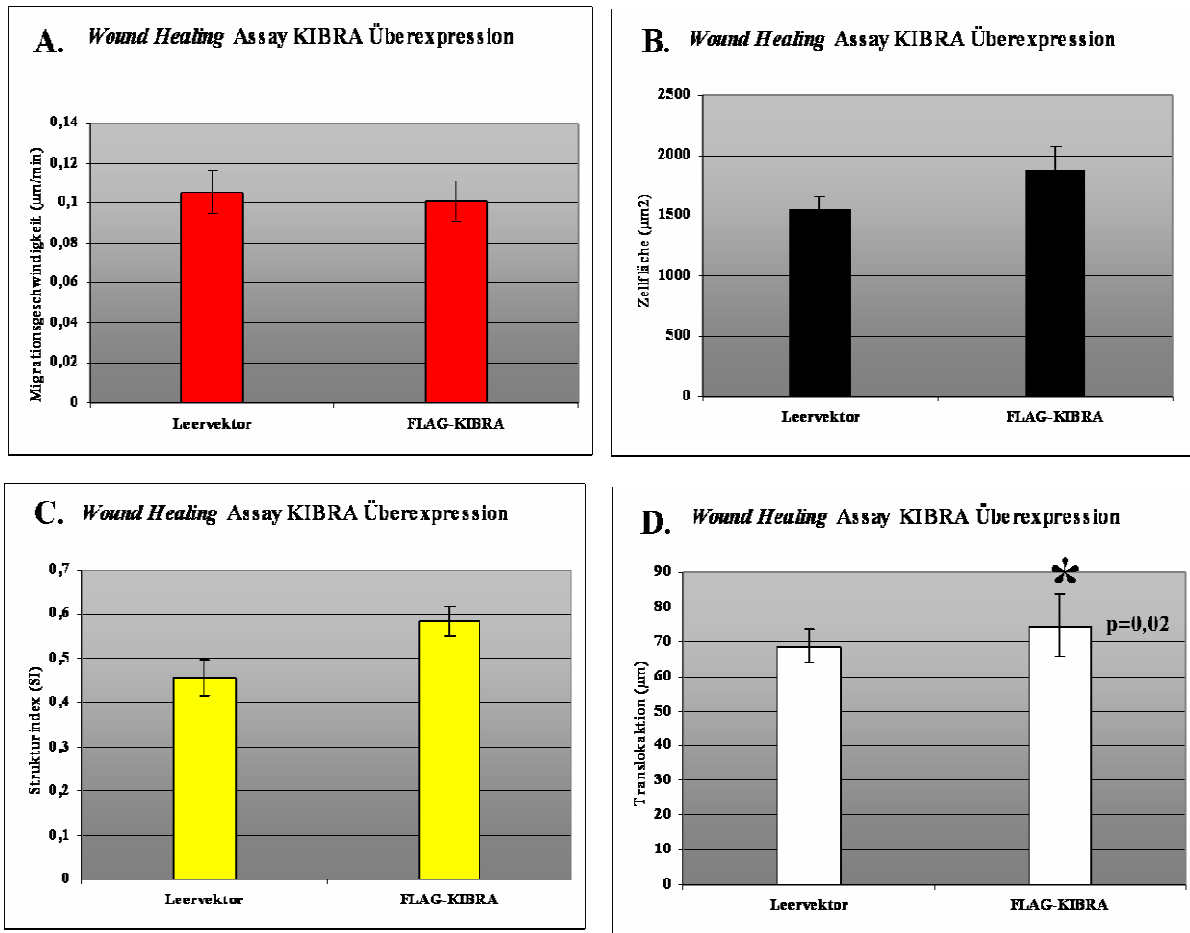


Abb. 4.15: Wound Healing Assay kultivierter muriner FLAG-KIBRA transduzierter Podozyten.

(Durchführung: Vgl. Abbildungsunterschrift 4.13; Methoden 3.3.7). Es wurde jede 10. von insgesamt 181 Aufnahmen von jeweils 8 Zellen ausgewertet. Die Fehlerbalken wurden durch eine Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte erhoben (STABWN/Wurzel (Zellzahl)). Die gekennzeichneten Balken (*) zeigen eine signifikante Abweichung im Vergleich zu den Kontrollen (Student's t-test), wobei ein Wert von $p < 0,05 \pm 0,01$ als signifikant angenommen wurde.

A: Migrationsgeschwindigkeit (µm / Min)

Das Säulendiagramm (A) gibt die mittlere Migrationsgeschwindigkeit wieder. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollzellen (0,105 µm/Min) und FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten (0,1008 µm/Min) konnte bezüglich der Migrationsgeschwindigkeit nicht ermittelt werden.

B: Translokation (µm)

Abbildung B zeigt mit der Translokation der Zellen die tatsächlich zurückgelegte Strecke. Im Mittel haben die Kontrollzellen mit 68,7 µm zwar eine geringere Strecke zurückgelegt als die FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten (74,6 µm), der Unterschied ist jedoch vernachlässigbar.

C: Zellfläche (µm²)

Unterschiede bezüglich der Zellfläche konnten zwischen den Kontrollzellen (1548 µm²) und den FLAG-KIBRA transduzierten Zellen (1873 µm²) nicht ermittelt werden.

D: Strukturindex (SI)

Der Strukturindex, der ein Maß für die Morphologie einer Zelle darstellt, geht bei einem Wert von 1 von einer globulären Struktur und bei einem Wert, der gegen 0 tendiert, von einer gestreckten bzw. dendritischen Struktur der Zelle aus. Zwischen den Leervektor transduzierten Zellen (0,46) und den FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten (0,59) ist ein signifikanter Unterschied ($p=0,02$) zu verzeichnen.

Die Auswertung der *Wound Healing Assays* (Abb. 4.13 - 4.15) macht deutlich, dass KIBRA KD Podozyten (Abb. 4.14 A-D) im Mittel zwar signifikant langsamer migrieren, dabei aber durchschnittlich eine größere Strecke zurücklegen als die Leervektor transduzierten Kontrollzellen. Dieser Unterschied zum Trotz sind KIBRA KD Podozyten nicht in der Lage, eine gesetzte Wunde innerhalb von 10 h zu schließen. Da die KIBRA KD Zellen sogar eine größere Strecke als die Kontrollzellen zurücklegen, erscheint die Fähigkeit, gerichtet zu migrieren, stark beeinträchtigt. Ähnlich den Ergebnissen, die sich bereits bei den Migrationsassays abzeichneten, ist abgesehen von dem abweichenden Strukturindex bei den *Wound Healing Assays*, kein relevanter Unterschied zwischen FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten und den entsprechenden Kontrollzellen festzustellen.

4.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorgestellten Daten zeigen die bisher unbekannt Interaktion zwischen dem wenig charakterisierten Protein KIBRA und dem Polaritäts- und Gerüstprotein PATJ. Die direkte Bindung konnte auf die PATJ.PDZ-Domäne 8 auf der einen Seite und die letzten vier C-terminalen Aminosäuren von KIBRA auf der anderen Seite eingegrenzt werden. Das Bindungsmodul von KIBRA stellt mit den Aminosäuren ADDV ein bis dato unbeschriebenes Motiv für PDZ-Domänen dar.

Des Weiteren konnte die Interaktion zwischen KIBRA und dem Protein Sra-1 gezeigt werden, einem Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der an der Aktivierung der Aktinpolymerisation beteiligt ist. In *Pulldown* Experimenten wurde endogenes Sra-1 mit GST-Fusionsproteinen aus nativen KIBRA-WW-Domänen gefällt. Im Hefesystem generierte Daten erbrachten keinen Nachweis einer direkten Bindung von KIBRA an ein Fragment von Sra-1, das ein potentiell WW-Domänen-Bindungsmotiv (LPxY) beinhaltet.

Das Resultat durchgeführter Adhäsionsassays zeigte bei FLAG-KIBRA überexprimierenden Podozyten ein deutlich verstärktes Adhäsionspotential gegenüber Leervektor transduzierten Kontrollzellen, wohingegen KIBRA *knock down* (KD) Podozyten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollzellen massive Adhäsionsdefizite in diesen Versuchen aufwiesen.

In Migrationsassays, in denen die Parameter Geschwindigkeit, Translokation, Strukturindex und Zellfläche einzelner Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression berücksichtigt wurden, zeigten sich bei KIBRA KD Zellen deutliche Unterschiede zu den Kontrollzellen. Obwohl KIBRA KD Podozyten signifikant schneller Zellfortsätze aus- und rückbildeten, legten sie eine geringere Distanz zurück als die Kontrollzellen. Teilweise war die Zellfläche

der KD Zellen dabei geringer und die Morphologie dendritischer als bei den Kontrollzellen. Unterschiede bezüglich der beschriebenen Parameter konnte in analog durchgeführten Experimenten mit KIBRA überexprimierenden Podozyten nicht festgestellt werden.

Bei der Durchführung von *Wound Healing* Assays wird im Gegensatz zu der Untersuchung einzelner Zellen in Migrationsexperimenten das gerichtete Einwandern von Zellen innerhalb eines Zellverbandes analysiert. Entsprechend den Ergebnissen der Migrationsassays zeigten die KIBRA KD Podozyten signifikante Defizite gegenüber den Kontrollzellen. Dabei migrierten die KIBRA KD Zellen langsamer, legten aber eine größere Strecke zurück als Leervektor transduzierte Zellen. Eine gesetzte Wunde konnte von den KIBRA KD Podozyten durch gerichtetes Einwandern von Zellen nicht geschlossen werden. Ähnlich den Migrationsversuchen zeigten sich bei FLAG-KIBRA transduzierten Podozyten weniger starke Veränderungen in *Wound Healing* Assays im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine Bildabfolge (Abb. 4.13 B) zeigte jedoch, dass KIBRA überexprimierende Podozyten eine manipulativ gesetzte Wunde langsamer verschlossen als entsprechende Kontrollzellen.

5. Diskussion

Um die molekularen Strukturen der Polarität im Podozyten besser verstehen zu können, wurde das Protein KIBRA als neu identifizierter Interaktionspartner des Polaritätsproteins PATJ auf seine Funktion hin untersucht. Im Folgenden werden die im Ergebnisteil vorgestellten Daten zu den Interaktionen KIBRA/PATJ und KIBRA/Sra-1, und deren mögliche Bedeutung diskutiert. Des Weiteren werden Versuche zur Funktion von KIBRA in Bezug auf die Polarität und das Zytoskelett im Podozyten analysiert, bei denen Zellen mit fehlregulierter KIBRA Expression eingesetzt wurden.

5.1 Die Interaktion KIBRA/PATJ

Die ursprünglich in einem *Yeast Two-Hybrid Screen* entdeckte Interaktion zwischen dem murinen Gerüstprotein CIPP und humanem KIBRA konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit dem humanen Homologen von CIPP, PATJ, bestätigt und eingegrenzt werden.

Bei den Experimenten wurde die humane Variante PATJ eingesetzt, um die Bindung der Proteine innerhalb einer Spezies zu zeigen. Erste Versuche, die Interaktion mit *full length* Konstrukten von PATJ und KIBRA durch Ko-Immünpräzipitationen in ko-transfizierten HEK 293T Zellen nachzuweisen, schlugen fehl. Da die Interaktion auf diesem Weg nicht nachgewiesen werden konnte, und um die genauen Interaktionsmodule einzugrenzen, wurden Bindungsstudien im Hefesystem durchgeführt. Dazu wurden zunächst verschiedene Verkürzungsmutanten von PATJ und KIBRA *full length* durch Ko-Transformationen in Hefezellen exprimiert. Die Ergebnisse dieser *in vivo* Methode legen eine Interaktion zwischen PATJ und KIBRA nahe, die vermutlich von PATJ.PDZ-Domäne 8 vermittelt wird (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.1 B).

Indem Gerüstproteine wie PATJ über Protein-Protein-Interaktionsdomänen andere Proteine rekrutieren, können in definierten Arealen innerhalb der Zelle multiple Proteinkomplexe ausgebildet werden. Dabei werden Proteine, die PDZ-Domänen beinhalten, selbst durch Syntheseleistungen, Degradationsereignisse, subzelluläre Verteilung und posttranslationale Modifikationen reguliert [40].

In den durchgeführten Ko-Transformationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass transformierte Hefezellen, die PATJ.PDZ 7-10 bzw. 7-8 exprimierten, keine Interaktion mit KIBRA zeigten, obwohl analog zu PATJ.PDZ 8-10 bzw. 8 und KIBRA ein positives Ergebnis erwartet wurde (Vgl. Einleitung, Abb. 4.1 B). Generell wuchsen Hefezellen, die mit PATJ.PDZ 7-Konstrukten (PATJ.PDZ 7-10, 7-8, 7) transformiert wurden, langsamer auf

histidindefizientem Medium (SD-L-T-H + 50mM 3-AT) als Hefezellen, die mit Konstrukten ohne PATJ.PDZ 7 transformiert wurden.

Da der Effekt auf die Expression der Verkürzungsmutanten von PATJ.PDZ 7 begrenzt zu sein scheint, könnten die N-terminal vor PATJ.PDZ 7 liegenden Aminosäuren oder die PDZ-Domäne selbst das Wachstum durch Degradationsereignisse oder Veränderungen von Signaltransduktionswegen in der Hefezelle negativ beeinflussen. Diese Hypothese erklärt, weshalb eine Interaktion von KIBRA an PATJ.PDZ 8 ausschließlich bei PATJ Verkürzungsmutanten beobachtet werden konnte, die ohne PATJ.PDZ 7 exprimiert wurden.

Das unterschiedliche Bindungsverhalten erscheint zunächst kontrovers, die dreidimensionale Struktur eines Proteins kann durch Verkürzungsmutanten jedoch erheblich verändert sein. Bei Bindungsstudien, in denen beide Interaktionspartner bis auf die Bindungsmotive minimal verkürzt exprimiert werden, kann es zu Verschiebungen der Ladung und so der räumlichen Struktur der Proteinfragmente kommen, was in einem veränderten Interaktionsverhalten resultieren kann. In diesem Zusammenhang zeigten Stiffler et al. 2006, dass Bindungsstudien verschiedene Resultate ergaben, wenn einzelne PDZ-Domänen eines Proteins im Vergleich zu Verkürzungsmutanten, die mehrere PDZ-Domänen beinhalteten, eingesetzt wurden [98].

Um die im Hefesystem gezeigte Interaktion zwischen KIBRA und PATJ mit einer weiteren Methode zu bestätigen, und um das PDZ-Bindungsmotiv von KIBRA zu ermitteln, wurden *GST-pulldown* Experimente durchgeführt. Interessanterweise ergaben diese *in vitro* Untersuchungen im Unterschied zu den im Hefesystem generierten Daten eine reproduzierbare Bindung von KIBRA *full length* an PATJ.PDZ 7-10 (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.2 C). Zwar schließt dieser Ansatz die PATJ.PDZ 8 ein, welche bei den gezeigten Hefedaten die Interaktion zu vermitteln schien, der *pulldown* von KIBRA *full length* und PATJ.PDZ-Domänen 8-10 fiel jedoch negativ aus.

Weitere, in dieser Arbeitsgruppe durchgeführte *GST-pulldown* Experimente und Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem, bei denen die einzelnen PATJ.PDZ-Domänen 7 und 8 und eine C-terminale Verkürzungsmutante von KIBRA eingesetzt wurden, ergaben eine eindeutige Bindung von KIBRA an PATJ.PDZ-Domäne 8.

Die für einen *GST-pulldown* exprimierten, rekombinanten Fusionsproteine werden von *E. coli* nicht posttranslational modifiziert, was eine Erklärung für die abweichenden Resultate der *GST-pulldown*- und der Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem sein könnte. Gleichfalls könnte eine veränderte Faltung die Struktur der verkürzt exprimierten Proteine beeinflussen. Im Allgemeinen können mit *pulldown* Experimenten ausschließlich sehr starke

Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden, da schwache Bindungen durch die diversen Waschschriffe zerstört würden. Obgleich im Hefesystem rekombinant exprimierte Proteine nur unvollständig posttranslational modifiziert werden, handelt es sich um eine *in vivo* Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Trotz der Resultate der *pulldown* Experimente, die auf eine Bindung von KIBRA *full length* an PATJ.PDZ 7 weisen, deuten sowohl die Ergebnisse der Ko-Transformationen im Hefesystem als auch *pulldown* Experimente mit C-terminalen Verkürzungsmutanten von KIBRA verstärkt auf PATJ.PDZ 8 als interaktionsvermittelnde Domäne.

Immunfluoreszenzstudien, die mit rekombinantem PATJ und KIBRA durchgeführt wurden, zeigten eine Ko-Lokalisation der Proteine sowohl in kultivierten Podozyten als auch in renalen Epithelzellen (MDCK-Zellen), einem Modellsystem für polarisierte Zellen (Duning, unveröffentlichte Daten).

Noch vor der Entdeckung von humanem PATJ beschrieben Kurschner et al. in ihrer 1998 veröffentlichten Arbeit das murine Homologon CIPP (*Channel-interacting PDZ domain protein*), ein bis dato unbekanntes Protein [46]. Die Untersuchung verschiedener muriner Gewebe ergab die Expression von CIPP mRNA in der Niere und dem Gehirn. Die im Gehirn exprimierte, kürzere Variante des Proteins beinhaltet vier PDZ-Domänen und wurde in Interaktionsstudien eingesetzt. Interaktionen zwischen CIPP.PDZ 2 (die PATJ.PDZ 8 entspricht) und verschiedenen K⁺-Kanälen (Kir 4.1/4.2, *inward rectifying K⁺ channel*), dem NMDA-Rezeptor 2A (*N-methyl-D-aspartate-glutamate receptor 2A*) und dem neuronalen Zelloberflächenmolekül Neurologin wurden identifiziert. Abgesehen von Neurologin, dessen Aminosäuresequenz mit TTRV abschließt, enden die C-Termini der genannten CIPP.PDZ 2 Interaktionspartner mit einem XSXV-Motiv. Demnach handelt es sich bei CIPP.PDZ 2 (PATJ.PDZ 8) um eine PDZ-Domäne der Klasse I (Vgl. Tab. 1.1).

Obwohl PATJ zehn PDZ-Domänen beinhaltet, konnten bisher nur zwei direkte Interaktionspartner dieser Module identifiziert werden [91]. Das *tight junction*-assoziierte Protein ZO-3 bindet über die C-terminale Sequenz TDL an PATJ.PDZ 6, einer PDZ-Domäne der Klasse I (Vgl. Tab. 1.1) [51;79]. Claudine stellen eine Familie transmembranärer Proteine dar, die an der Calcium-unabhängigen Zell-Zell-Adhäsion beteiligt sind. Claudin-1, ein Mitglied dieser Proteinfamilie, bindet über die letzten C-terminalen Aminosäuren (KD)YV an PATJ.PDZ 8, wodurch diese sich der Klasse III zuordnen lässt (Vgl. Tab. 1.1) [79;91].

Des Weiteren konnten Wells et al. 2006 zeigen, dass Angiomotin, ein Gerüstprotein, über die C-terminale Sequenz EYLI mit PATJ.PDZ 3-10 interagiert [109].

Tab.1.1: Klassifizierung der PDZ-Domänen anhand der Konsensusbindungssequenz.

Klasse	C-terminale AS-Sequenz des Liganden
I	X-S/T-X-Φ
II	X-Φ-X-Φ
III	X-D/E-X-Φ

AS: Aminosäure, X: unspezifische AS, Φ: hydrophobe AS (V, L, I)

Die Durchführung weiterer *GST-pulldown* Experimente zeigte, dass KIBRA über die letzten vier C-terminalen Aminosäuren (ADDV) an PATJ bindet (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.3 C/D). Diese Aminosäuresequenz, ADDV, stellt ein bis dato unbekanntes PDZ-Bindungsmotiv dar, das nach der Einteilung von Hung et al. (2002) zu den Liganden für PDZ-Domänen der Klasse III (X-D/E-X-Φ) gezählt werden kann (Vgl. Tabelle 1.1 und Einleitung 1.5) [32]. Das Ergebnis steht in Einklang mit der beschriebenen Bindung von Claudin-1 (Bindungsmotiv KDYV) an PATJ.PDZ 8. Nach den Ergebnissen von Kurschner et al. obliegt CIPP.PDZ 2 (PATJ.PDZ 8) zwar der Klasse I, jedoch sollten die verschiedenen Versuchsansätze Berücksichtigung finden. So arbeiteten Kurschner und Kollegen mit einer wesentlich kürzeren, murinen Variante, die im Gehirn exprimiert wird und *in vitro* translatierten Proteinen, wohingegen Roh et al. die Interaktion zwischen renal exprimierten PATJ.PDZ 8 und Claudin-1 mit PATJ *full length* nachwies [46;79].

Das Protein PATJ nimmt entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Polarität in Epithelzellen [56;92]. In ihrer jüngst veröffentlichten Arbeit konnten Shin et al zeigen, dass PATJ direkt an der Regulation von gerichteter Zellmigration beteiligt ist [2]. Dabei gehört dieses Gerüstprotein zu dem CRB3/PALS1/PATJ Komplex, der neben einem zweiten Multiproteinkomplex, PAR3/PAR6/aPKCζ, an den *tight junctions* lokalisiert ist (Vgl. Einleitung, Abb. 1.8). Ein Nachweis der mRNA-Expression aller Komponenten beider Proteinkomplexe aus kultivierten humanen Podozyten erfolgte in dieser Gruppe (Weide, unveröffentlichte Daten). Shin et al. konnten zeigen, dass eine reduzierte Expression von PATJ durch RNAi in renalen Epithelzellen zu einer verzögerten Ausbildung von *tight junctions* und Defekten in der Zellpolarisation führte. Diese Effekte ließen sich durch das Einbringen von rekombinantem PATJ in einem *rescue* Experiment wieder aufheben [92].

In ihrer 2004 publizierte Arbeit konnten Büther et al. zeigen, dass KIBRA von der aPKC ζ phosphoryliert wird und mit dieser interagiert [9]. Das Protein KIBRA bindet demnach sowohl an ein Protein des CRB3/PALS1/PATJ-Komplexes als auch an einen Bestandteil des zweiten Polaritätskomplexes, PAR3/PAR6/aPKC ζ .

In dieser Arbeitsgruppe konnte die endogene aPKC ζ Expression in kultivierten Podozyten verifiziert werden (Duning, unveröffentlichte Daten). Die nachgewiesene Interaktion zwischen PATJ und KIBRA stellt somit zusammen mit der bekannten Interaktion KIBRA/aPKC ζ einen zweiten Hinweis auf die funktionelle Bedeutung von KIBRA in Bezug auf die Zellpolarität dar.

5.2 Die Interaktion KIBRA/Sra-1

Um mögliche Interaktionspartner zu finden, die spezifisch an die WW-Domänen von KIBRA binden, wurden GST-Fusionsproteine der WW-Domänen und mutierter (Pro►Ala) WW-Domänen exprimiert und parallel mit Gehirnlysat inkubiert (Joachim Kremerskothen, unveröffentlichte Daten). Dabei konnte ein differenziell gefälltes Protein mittels MS/MS als PIR 121 (=Sra-1) identifiziert werden (Vgl. Einleitung, 1.6.2).

Das Protein Sra-1 ist Bestandteil des WAVE-Proteinkomplexes, der maßgeblich an der Aktivierung der Aktinpolymerisierung des Zytoskeletts beteiligt ist [8;100]. Durch Western Blot Analysen konnte die endogene Expression der Proteine des WAVE-Komplexes (Sra-1, Nap1, Abi1 und WAVE2) in kultivierten Podozyten gezeigt werden (Schurek, unveröffentlichte Daten). Die Aminosäuresequenz von Sra-1 (1253 AS) weist mit einer internen LPxY-Sequenz (AS 852-855) ein potentiell Bindungsmotiv für WW-Domänen auf. Patrie et al. zeigten in ihrer 2005 veröffentlichten Arbeit eine Interaktion zwischen den Proteinen MAGI-1 und MASCOT, wobei die erste der zwei WW-Domänen von MAGI-1 an ein LPxY-Motiv des Proteins MASCOT bindet (Vgl. Einleitung, 1.6.1.1)[65].

Eine gleichermaßen vermittelten Interaktion zwischen KIBRA, dessen WW-Domänen hohe Übereinstimmung mit denen von MAGI-1 aufweisen, und Sra-1, das gleich dem Protein MASCOT ein LPxY-Motiv enthält, lag zusammen mit den GST-*pull-down* Vordaten nahe [45].

Um dies zu untersuchen, erfolgten Bindungsstudien im Hefesystem. In Ko-Transformationsexperimenten wurden KIBRA *full length* und eine Verkürzungsmutante von Sra-1 (AS 632-959), inklusive des LPxY-Moduls, eingesetzt. Durch die eingeschränkten Möglichkeiten des Hefesystems, mit dem sich ausschließlich direkte Bindungen der verstärkt

exprimierten Fusionsproteine nachweisen lassen, war es nicht möglich, eine Interaktion von KIBRA mit der Verkürzungsmutante von Sra-1 zu detektieren (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.4 B). Gegenüber dem Hefesystem bieten *GST-pulldown* Experimente den Vorteil, auch indirekte Protein-Protein-Interaktionen nachweisen zu können, indem ein potentieller Interaktionspartner als rekombinantes GST-Fusionsprotein exprimiert und mit einem Zellysat inkubiert wird. Da ein Zellysat alle endogen exprimierten Proteine beinhaltet, können auch Bindungen identifiziert werden, die durch ein Adapterprotein vermittelt werden.

Analog zu den Vordaten wurde ein *GST-pulldown* durchgeführt, um die möglicherweise indirekte Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 zu detektieren. Unter Verwendung eines Sra-1 Antikörpers konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass Sra-1 mit rekombinant exprimierten KIBRA-WW-Domänen gefällt wird, nicht jedoch mit mutierten KIBRA-WW-Domänen (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.4 E). Dieses Ergebnis spricht für eine indirekt vermittelte Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1.

Nachdem Sra-1 aus humanem Gehirnlisat mit Wildtyp KIBRA-WW-Domänen gefällt werden konnte, sollte mit einem weiteren Experiment geklärt werden, ob diese Bindung sich in Podozyten reproduzieren lässt. Dazu wurde die endogene Sra-1 Expression in kultivierten Podozyten und in isolierten Rattenglomeruli nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass Sra-1 als Zytoskelett-assoziiertes Protein relativ schlecht löslich war und ein Nachweis dieses Proteins optimale Bedingungen erfordert. In den anschließenden *GST-pulldown* Experimenten wurden Lysate aus kultivierten Podozyten und isolierte Rattenglomeruli anstelle des humanen Gehirnlisats eingesetzt. Bei diesen Versuchen wurde Sra-1 entweder nicht oder sowohl mit Wildtyp- als auch mit mutierten KIBRA-WW-Domänen gefällt.

Als Erklärung für das Ergebnis der *pulldown*-Experimente, in denen Sra-1 nicht gefällt werden konnte, könnte die beschriebene relativ schlechte Löslichkeit von Sra-1 dienen.

Bei den Versuchen, in denen Sra-1 sowohl mit Wildtyp als auch mit mutierten KIBRA-WW-Domänen gefällt wurde, besteht die Möglichkeit, dass Sra-1 durch endogen exprimiertes KIBRA oder ein anderes endogen exprimiertes Protein gebunden wurde.

Zusammenfassend konnte eine direkte Interaktion zwischen KIBRA und der Verkürzungsmutante von Sra-1 durch Ko-Transformationsexperimente im Hefesystem nicht gezeigt werden. Möglicherweise resultiert die Verkürzungsmutante von Sra-1 in einem inkorrekt gefalteten Protein, wodurch das Bindungsmotiv maskiert und dadurch eine Bindung verhindert wird. Sra-1 könnte auch durch ein anderes als das postulierte LPxY-Motiv an KIBRA binden, das außerhalb der exprimierten Verkürzungsmutante liegt.

Durch einen *GST-pulldown* können im Gegensatz zum Hefesystem auch indirekte Protein-Protein-Interaktionen gezeigt werden. Ein Adapterprotein, das als Bindeglied innerhalb eines Multiproteinkomplexes dient und die Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 vermittelt, stellt daher eine nahe liegende Erklärung für die Ergebnisse der *pulldown* Experimente dar, in denen Sra-1 mit KIBRA-WW-Domänen gefällt wurde. Der Nachweis der Komponenten des Arp2/3 aktivierenden Komplexes in Podozyten, zu dem neben Sra-1 Abi1, Nap1 und WAVE2 gehören, stützt die These eines Adapterproteins zwischen KIBRA und Sra-1.

Die Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 konnte zumindest teilweise nachgewiesen werden und als Hinweis für eine Assoziation von KIBRA an das Aktin-Zytoskelett dienen. In Anbetracht der Tatsache, dass KIBRA mit dem Aktin-Zytoskelett-assoziierten Protein Dendrin interagiert, passt diese potentiell indirekte Interaktion in das Modell, bei dem KIBRA eine Funktion bezüglich des Zytoskeletts wahrnimmt [45].

5.3 Kultivierte Podozyten mit fehlregulierter *KIBRA* Expression

Um Aussagen über die Funktion eines Proteins treffen zu können, ist es nicht ausreichend Interaktionsstudien dieses Proteins durchzuführen. Durch die Betrachtung der Interaktionspartner können zwar Vermutungen ob der Funktion des Zielproteins geäußert werden, diese basieren jedoch auf den Eigenschaften des jeweiligen Bindungspartners. Eine Möglichkeit, funktionelle Daten zu einem Protein zu gewinnen, besteht darin, die Auswirkungen einer verstärkten Expression oder eines *knock down* des Zielproteins in einem Zellkulturmodell zu untersuchen.

Fan et al. geben in ihrer 2006 publizierten Arbeit zu bedenken, dass es bei vielen humanen Erkrankungen lediglich zu einer reduzierten Expression eines bestimmten Gens kommt, nicht aber zu einem absoluten Verlust und favorisieren deshalb ein *knock down* Zellkulturmodell im Vergleich zu einer *knock out* Maus als geeignetes Modell zur Untersuchung von genetisch bedingten Erkrankungen [21].

Aus diesem Grund wurde mit Zellkulturmodellsystemen der Einfluss einer verstärkten bzw. einer reduzierten KIBRA Expression auf verschiedene Aspekte hin analysiert. Die Modellsysteme wurden durch retrovirale Transduktion kultivierter Podozyten etabliert.

Die Generation der KIBRA *knock down* Podozyten erfolgte unter zu Hilfenahme eines lentiviralen Vektorsystems, da sich kultivierte Podozyten, gleich den morphologisch ähnlichen Neuronen, mit herkömmlichen Methoden nur zu einem geringen Prozentsatz

transfizieren lassen. Lentiviren gehören zu der Familie der Retroviren und zeichnen sich durch die Besonderheit aus, auch in das Genom nicht proliferierender Zellen zu integrieren.

Aufgrund der Expression eines in das Genom integrierten, temperatursensitiven SV40-Antigens, proliferieren die immortalisierten Podozyten bei einer Kultivierungstemperatur von 33°C und differenzieren bei einer Kultivierung bei 37°C (humane Podozyten) bzw. 38°C (murine Podozyten) [84;86]. Mithilfe des lentiviralen Systems war es möglich, sowohl proliferierende als auch ausdifferenzierte Zellen zu transduzieren. Der benutzte lentivirale Vektor gehört zu einem von Didier Trono (www.tronolab.com) etablierten System, bei dem jedes Viruspartikel doppelt in das Wirtsgenom integriert. Die transduzierten Zellen lassen sich durch ein viral exprimiertes GFP mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops identifizieren.

Obwohl nahezu 100 % der transduzierten Podozyten GFP exprimierten, konnte eine stabile Zelllinie mit dauerhaftem KIBRA *knock down* mit diesem Vektorsystem nicht generiert werden. Nach zweimaliger Passagierung der Zellen war eine GFP-Expression lediglich bei ca. 5 % der KIBRA-KD Zellen detektierbar. Die Leervektor transduzierten Zellen zeigten im Gegensatz dazu eine stabile GFP-Expression.

Neben der Integration kurzer DNA-Sequenzen in das Genom einer Wirtszelle, deren Transkription in *short hairpins* resultieren, besteht auch die Möglichkeit, durch transiente Transfektion kurzer synthetischer siRNAs einen *knock down* des Zielproteins zu erreichen (Vgl. Methoden, 3.4). Für Podozyten ist diese Methode ungeeignet, da die Transfektionseffizienz dieser Zellen mit herkömmlichen Methoden bei weniger als 20 % liegt und der mit siRNAs erreichte *knock down* Effekt nur wenige Tage anhält. Daher wurden für die Experimente transduzierte Podozyten verwendet, die nach der Virusbehandlung nicht mehr passagiert wurden und die neben der kontrollierten GFP-Expression einen *knock down* sowohl der mRNA- als auch der Protein-Expression zeigten (Vgl. Ergebnis, Abb. 4.6 D/E).

Die eingesetzten murinen Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression wurden in dieser Arbeitsgruppe mit einem retroviralen Vektorsystem generiert, das für eine Neomycinresistenz als Selektionsmarker kodiert. Ein Nachweis der verstärkten Expression von FLAG-KIBRA erfolgte durch *Western Blot* Analysen (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.5). Interessanterweise verlor diese Podozytenzelllinie die Fähigkeit der verstärkten FLAG-KIBRA Expression unter normalen Kulturbedingungen, da in mehreren zur Kontrolle durchgeführten *Western Blot* Analysen mit Zellen aus höheren Passagen eine Überexpression nicht mehr nachzuweisen war. Aus diesem Grund wurden für die Migrations-, *Wound Healing*- und Adhäsions-Assays Zellen niedrigerer Passagen verwendet, bei denen die verstärkte FLAG-KIBRA Expression via *Western Blot* mehrfach verifiziert wurde.

5.4 Der Einfluss eines KIBRA *knock down* auf das Zytoskelett

Durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Färbungen sollten mögliche Auswirkungen eines KIBRA *knock down* (KD) auf das Zytoskelett kultivierter Podozyten untersucht werden. Hintergrund dieser Experimente war die Entdeckung einer partiellen Ko-Lokalisation von KIBRA an Mikrotubuli (Kremerskothen, unveröffentlichte Daten) und die Interaktion zwischen KIBRA und DLC1 (*Dynein light chain 1*, vgl. Einleitung 1.6.2), einem Bestandteil der mikrotubulären Dyneinmotorproteine [72]. Die Anfärbung des Tubulin-Zytoskeletts sollte klären, ob ein KIBRA KD in Podozyten zu strukturellen Veränderungen der Mikrotubuli führt. Zunächst wurde in Immunfluoreszenzstudien mit einem KIBRA spezifischen Antikörper der KIBRA KD im Vergleich zu Leervektor transduzierten Podozyten gezeigt. Ein Unterschied der endogenen KIBRA Expression zwischen Leervektor transduzierten Kontrollzellen und Wildtypzellen konnte nicht festgestellt werden, wohingegen eine deutliche Reduktion der KIBRA Expression bei den KD Podozyten zu beobachten war (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.7 A/B). In nachfolgenden Färbungen des Tubulin-Zytoskeletts konnte keine Veränderungen zwischen KIBRA KD Podozyten und Kontrollzellen ermittelt werden. Beide Zelllinien wiesen in den Färbungen die gleichen, für Mikrotubuli typischen, Strukturen wie die Wildtypzellen auf (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.8 A/B).

Aufgrund der bekannten Interaktion zwischen KIBRA und dem Aktin-Zytoskelett-assoziierten Protein Dendrin und der neu entdeckten, eventuell indirekten Verbindung von KIBRA an Sra-1, wurde anschließend das Aktin-Zytoskelett untersucht. Dazu wurde das Aktin-Zytoskelett von KIBRA KD Podozyten und Kontrollzellen mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Phalloidin angefärbt. Hinweise auf Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts konnten weder im Vergleich zwischen den KIBRA KD Podozyten und den Kontrollzellen noch zu den Wildtyp-Podozyten festgestellt werden. Alle untersuchten Zellen zeigten die für Aktinfilamente typischen *stress fibres* (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.9 A/B).

Steffen et al. weisen in ihrer Arbeit darauf hin, dass ein *knock down* von Nap1, ein Protein das zusammen mit Sra-1 zu dem WAVE-Multiproteinkomplex gehört, in Melanomzellen zu einer deutlich reduzierten Ausbildung von Lamellipodien führt [97]. Durch die indirekte Assoziation von KIBRA an Sra-1 besteht die Möglichkeit, dass der KIBRA KD sich analog dem Nap1 KD nicht auf die Aktin-Stressfasern, sondern auf das kortikale Aktin in den Spitzen von Lamellipodien auswirkt.

Insgesamt konnte mit der Auswertung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Färbungen, die an kultivierten, humanen KIBRA KD Podozyten, Leervektor transduzierten Kontrollzellen und

unbehandelten Wildtypzellen durchgeführt wurden, keine Veränderungen des Tubulin- und des Aktin-Zytoskeletts verzeichnet werden.

5.5 Einfluss von KIBRA auf die Zelladhäsion

Das Aktin-Zytoskelett einer Zelle wird durch fokale Adhäsionen mechanisch an ein Substrat verankert. Im Allgemeinen wird dieses Substrat durch die extrazelluläre Matrix (ECM) gestellt, die bei Podozyten als glomeruläre Basalmembran (GBM) bezeichnet wird. In der Zellkultur wird als Untergrund, auf dem die Zellen anheften, zumeist Kollagen verwendet. Die Fokalkontakte von Zellen dienen nicht ausschließlich der Verankerung, sondern gleichfalls der Signalübermittlung zwischen ECM und Zelle. Die Beschaffenheit der fokalen Adhäsionspunkte variieren bei verschiedenen Zelltypen erheblich. Zellen, bei denen Beweglichkeit durch Migration maßgebliche Funktionen erfüllt, wie beispielsweise Leukozyten, verfügen über weniger stark ausgeprägte Verankerungen, die kurzzeitig auf- und abgebaut werden können. Podozyten sind als hochspezialisierte Zellen zur Ausführung ihrer Barrierefunktion zwar auf eine Verankerung auf der GBM angewiesen, sind aber in der Lage, auf dieser migratorische Bewegungen auszuführen.

Die Auswertung der im Ergebnisteil dargestellten Adhäsionsassays legt eine Funktion von KIBRA bei der Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten nahe. Die verstärkte KIBRA Expression in kultivierten Podozyten resultierte im Vergleich zu den Leervektor transduzierten Kontrollzellen in einer etwa doppelt so hohen Anzahl adhärenter Zellen (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.10 B).

Im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollzellen ließen sich bei KIBRA *knock down* (KD) Podozyten deutliche Defizite in der Fähigkeit, sich wieder anzuheften, verzeichnen (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.10 A). Verglichen mit der Anzahl adhärenter Kontrollzellen waren lediglich ein Drittel der KIBRA KD Podozyten in der Lage, neue Fokalkontakte auszubilden. Diese Beobachtung stellt eine exzellente Erklärung für die Schwierigkeit, KIBRA KD Podozyten zu kultivieren, dar. Durch die nachhaltig herabgesetzte Fähigkeit dieser Zellen, sich wieder anzuheften, hatten die wenigen, nicht transduzierten Zellen bei der üblichen Passagierung möglicherweise einen Vorteil gegenüber den KIBRA KD Podozyten. Für diese Möglichkeit spricht des Weiteren, dass eine stabile GFP-Expression bei den Leervektor transduzierten Podozyten beobachtet werden konnte.

Ein wichtiger Bestandteil bei der Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten ist Rac, eine kleine Rho GTPase, die u. a. ein Aktivator des WAVE Proteinkomplexes ist [76]. Die Rac-

abhängige Aktivierung des WAVE Proteinkomplexes, zu dem Sra-1 (*specifically Rac1-associated protein-1*) gehört, induziert ihrerseits die über den Arp2/3 Komplex vermittelte Aktinpolymerisierung [97]. Neben Rac dient auch die kleine GTPase Cdc42 durch die Aktivierung von WASP bzw. N-WASP als Initiator der Aktinpolymerisierung, wobei sowohl Rac als auch Cdc42 entscheidend an der Zellpolarisation beteiligt sind [8;76;101].

Die potentiell indirekte Interaktion zwischen KIBRA und Sra-1 weist daher zusammen mit den Adhäsionsdefiziten der KIBRA KD Podozyten auf eine Beteiligung von KIBRA bei der Ausbildung von Fokalkontakten hin.

5.6 Einfluss von KIBRA auf die Migration einzelner Podozyten

Bei der Migration von Zellen sind Polarität und Dynamik des Zytoskeletts von entscheidender Bedeutung [76]. Migrierende Zellen sind hochpolar, da sie sich in eine bestimmte Richtung fortbewegen. Am Vorderende der Zelle bilden sich in Bewegungsrichtung Fortsätze, so genannte Lamellipodien, aus, die sich auf dem jeweiligen Untergrund anheften und den Zellkörper, der das Hinterende darstellt, nachziehen. Das Zytoskelett durchläuft während der Migration stetige Veränderungen und bildet eine extrem dynamische Struktur [12;48;58].

Mit dem Wissen um eine Interaktion von KIBRA mit den maßgeblich in Zellpolarität involvierten Proteinen PATJ und aPKC ζ einerseits und den Aktin-Zytoskelett-assoziierten Proteinen Dendrin und Sra-1 andererseits, wurden Migrationsexperimente mit kultivierten Podozyten durchgeführt. Dabei wurden Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression und entsprechende Kontrollzellen auf die Parameter Migrationsgeschwindigkeit, Translokation, Strukturindex und Zellfläche hin untersucht. Die Migrationsgeschwindigkeit ist dabei ein Maß für eine bestimmte Zeitspanne, innerhalb der eine Zelle Lamellipodien aus- und rückbildet. Durch diese dynamischen Prozesse an der Zellperipherie verschiebt sich der Zellmittelpunkt, ohne dass die Zelle sich dabei von der Stelle bewegen muss. Die tatsächliche Fortbewegung der Zelle wird mit der Translokation gemessen. Indem eine Zelle zwar fortlaufend Lamellipodien auf- und wieder abbaut, dabei aber keine Translokation erfährt, können hohe Migrationsgeschwindigkeiten erreicht werden, ohne dass eine wesentliche Strecke zurückgelegt wird.

Die KIBRA *knock down* (KD) Podozyten zeigten in diesen Versuchen eine signifikant höhere Migrationsgeschwindigkeit als die Kontrollzellen, wobei die Translokation erheblich niedriger war (Vgl. Ergebnis, Abb. 4.11). Das bedeutet, ohne eine wesentliche Strecke zurückzulegen, bildeten KIBRA KD Podozyten schneller Lamellipodien aus als die Kontrollzellen, was für eine eingeschränkte Koordination des Migrationsverhaltens spricht.

Asanuma et al. fanden mit ihrer 2006 publizierten Arbeit heraus, dass die reduzierte Expression von Synaptopodin zu einer eingeschränkten Migrationsfähigkeit in kultivierten Podozyten führt [4]. Das Aktin-assoziierte Protein Synaptopodin weist viele Gemeinsamkeiten mit dem KIBRA interagierenden Protein Dendrin auf [61]. So interagieren sowohl Synaptopodin als auch Dendrin mit α -actinin und MAGI (Vgl. Einleitung, 1.6.1.1) [44;66].

Da Synaptopodin RhoA-abhängige Signaltransduktionswege reguliert, welche an der Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sind, erklären Asanuma et al. die Migrationsdefizite der Synaptopodin KD Podozyten mit dem resultierenden Unvermögen der Zellen, das Aktin-Zytoskelett zu formieren und umzuorganisieren [4]. Die direkte Interaktion von KIBRA und Dendrin sowie die Assoziation von KIBRA an Sra-1 könnten daher eine Erklärung für die unkoordinierte Migration der KIBRA KD Podozyten darstellen.

Der Strukturindex einer der KIBRA KD Zelllinien zeigte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine zunehmend globuläre Struktur, wohingegen kein Unterschied zu der anderen KIBRA KD Zelllinie zu verzeichnen war, welche jedoch eine kleinere Zellfläche als die Kontrollzellen aufwies. Möglicherweise liegen der variable Strukturindex und die Zellfläche der KIBRA KD Zellen in den verschiedenen *short hairpins* begründet, die den jeweiligen KD induzierten.

In analog durchgeführten Migrationsexperimenten wurden Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression eingesetzt. Ein Unterschied der genannten, untersuchten Parameter zu den Kontrollzellen konnte nicht festgestellt werden (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.12). Die Ergebnisse der Migrationsassays zeigen, dass eine reduzierte KIBRA-Expression im Gegensatz einer verstärkten Expression dieses Proteins zu Migrationsdefiziten führt. Diese Daten weisen auf eine funktionelle Bedeutung von KIBRA auf die Zellmigration, da die KIBRA KD Podozyten nicht in der Lage sind, die Defizite auszugleichen, eine KIBRA-Überexpression das Migrationsverhalten jedoch nicht beeinflusst.

Andere Forschergruppen konnten zeigen, dass die Überexpression eines Proteins das Migrationsverhalten kultivierter Zellen nachhaltig beeinflussen kann. So stellten Roy und Jacobson beispielsweise fest, dass die verstärkte Expression von Profilin in kultivierten Brustkrebszellen in ausgeprägten Migrationsdefiziten resultiert [82]. Da KIBRA über die potentiell indirekte Interaktion an Sra-1 mit dem WAVE 2 Komplex in Verbindung gebracht werden kann, ist es interessant, dass Profilin neben Aktin an Prolinreiche Proteine der WASP-Proteinfamilie, zu der auch WAVE gehört, bindet [82].

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine reduzierte KIBRA Expression das Migrationsverhalten kultivierter Podozyten nachhaltig beeinflusste, wohingegen die verstärkte Expression dieses Proteins keine Auswirkungen zeigte.

5.7 Einfluss von KIBRA auf die Migration von Podozyten im Zellverband

Im Unterschied zu Migrationsassays, bei denen das Verhalten einzelner Zellen studiert wird, kann durch *Wound Healing* Assays die Bewegung von Zellen innerhalb eines Zellverbandes untersucht werden, die in direktem Kontakt zu benachbarten Zellen stehen. Die Zellmigration einzelner Zellen und auch ganzer Zellverbände ist von zentraler Bedeutung bei diversen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, wie der Embryogenese, der Wundheilung, der Immunabwehr und der Tumormetastasierung. Das Einbringen einer Wunde in einen konfluenten Zellkulturmonolayer ist eine geeignete Methode, das gerichtete Einwandern von Zellen unter kontrollierten Bedingungen zu analysieren.

Die Auswertung der durchgeführten *Wound Healing* Assays der Podozyten mit fehlregulierter KIBRA Expression erfolgte analog zu den Migrationsassays. Die KIBRA KD Podozyten bildeten signifikant langsamer Lamellipodien aus als die Kontrollzellen, legten dabei jedoch eine deutlich größere Strecke zurück (Vgl. Ergebnis, Abb. 4.14). Obwohl auch die Kontrollzellen nach 10 h die gesetzte Wunde nicht vollständig geschlossen hatten, war ein gerichtetes Einwandern dieser Zellen in Richtung der Wunde zu beobachten (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.13 A). Dieses Ergebnis spricht eindeutig für das Unvermögen der KIBRA KD Zellen, durch gerichtete Migration einen Wundverschluss zu erreichen. Die Tatsache, dass die KIBRA KD Podozyten sogar eine größere Strecke als die Kontrollzellen zurücklegten, kann als weiteres Indiz für die wichtige Funktion von KIBRA in Bezug auf Zellpolarität gewertet werden. Bei den Ergebnissen der Migrationsassays ließ sich bei den KIBRA KD Podozyten ein anderes, gegenteiliges Verhalten als bei den *Wound Healing* Assays beobachten. Dies lässt sich mit den grundsätzlichen Unterschieden der beiden Untersuchungsmethoden erklären, da im Fall der Migrationsassays einzelne Zellen ohne jegliche Kontakte zu benachbarten Zellen analysiert werden und durch *Wound Healing* Assays das Verhalten von Zellen innerhalb eines Zellverbandes ausgewertet wird.

Das Migrationsverhalten von Zellen ist ein komplexes Zusammenspiel vieler Faktoren. Veränderungen der Proteinexpression, wie der *knock down* der involvierten Proteine führen deshalb häufig zu Störungen des Migrationsverhaltens von Zellen. So resultiert beispielsweise die reduzierte Expression von PHI-1, einem spezifischen Inhibitor der Typ-1 Protein

Serin/Threonin Phosphatase, in HeLa Zellen in einer deutlich herabgesetzten Zellmigration in *Wound Healing* Assays [105]. Ebenso zeigten Melanomzellen mit einem *knock down* des NHE-1 (Na^+/H^+ *exchanger* 1) Migrationsdefizite [99].

Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression zeigten bei den durchgeführten *Wound Healing* Assays keine relevanten Unterschiede zu den Kontrollzellen (Vgl. Ergebnisse, Abb. 4.15). Es konnte lediglich ein größerer Strukturindex der FLAG-KIBRA transduzierten Zellen beobachtet werden, was für eine eher globuläre Morphologie steht. Ähnlich den Ergebnissen der Migrationsassays scheint der KIBRA KD in Podozyten für das gerichtete Einwandern in eine Wunde dramatischere Folgen zu haben als die verstärkte Expression dieses Proteins, was den Schluss einer wichtigen Funktion von KIBRA auf die Zellmigration zulässt.

Bei der Durchführung von *Wound Healing* Assays konnten Shin et al. in ihrer jüngst publizierten Arbeit zeigen, dass eine reduzierte Expression von PATJ in polaren renalen Epithelzellen (MDCK-Zellen) die Fähigkeit der Zellen, eine gesetzte Wunde durch Einwandern zu schließen, nachhaltig beeinflusst [93]. Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnte bei den PATJ KD Zellen auch nach 17 h kein Wundverschluss beobachtet werden. Das sekundäre Einbringen von rekombinantem PATJ in die PATJ KD Zellen kehrte den Effekt in einem *rescue* Experiment um und die Zellen konnten die gesetzte Wunde wieder verschließen.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion des Proteins KIBRA in Podozyten untersucht. Dabei konnten die Proteine PATJ und Sra-1 als neue Interaktionspartner des wenig charakterisierten Proteins KIBRA identifiziert werden. Das Gerüstprotein PATJ ist Bestandteil des Polaritätskomplexes CRB3/PALS1/PATJ und von essentieller Bedeutung bei der Etablierung und Aufrechterhaltung von Polarität in Epithelzellen. Der CRB3/PALS1/PATJ Komplex steht in engem Kontakt zu einem weiteren Multiproteinkomplex, PAR3/PAR6/aPKC ζ , der gleichermaßen in Zellpolarität involviert ist. Die bereits beschriebene Interaktion von KIBRA und aPKC ζ stellt zusammen mit der neu entdeckten Bindung KIBRA/PATJ einen zweiten Hinweis auf die Beteiligung von KIBRA an die Zellpolarität dar. Die These einer Assoziation von KIBRA an das Aktin-Zytoskelett wird einerseits durch die bekannte Interaktion KIBRA/Dendrin und andererseits durch die potentiell indirekte Bindung von KIBRA an Sra-1 gestützt. In durchgeführten Adhäsionsassays zeigten KIBRA *knock down* Podozyten signifikante Defizite in der Fähigkeit, sich wieder am Substrat anzuheften, wohingegen Podozyten mit verstärkter KIBRA Expression sich im Vergleich zu Kontrollzellen als wesentlich adhärenter erwiesen.

Diese Ergebnisse sprechen gleichfalls für eine Assoziation von KIBRA an das Aktin-Zytoskelett, da die Verankerung einer Zelle an ein Substrat durch Fokalkontakte über das Aktin-Zytoskelett vermittelt wird. Neben den hochdynamischen Strukturen des Zytoskeletts nimmt die Zellpolarität bei der Migration von Zellen eine wichtige Funktion ein. Die Ergebnisse der Migrations- und *Wound Healing* Assays zeigten eindeutig die eingeschränkte Koordinationsfähigkeit von KIBRA *knock down* Podozyten im Vergleich zu Kontrollzellen.

Die beobachteten Migrations- und Adhäsionsdefizite der KIBRA *knock down* Podozyten können als weiteres Indiz für die wichtige Funktion, die KIBRA in Bezug auf das Zytoskelett und die Zellpolarität zukommt, interpretiert werden.

Bei Untersuchungen des WAVE 2 Proteinkomplexes, zu dem u. a. Sra-1 und Nap1 gehören, konnten Steffen et al. zeigen, dass durch die reduzierte Expression sowohl von Sra-1 als auch von Nap1 die Rac-abhängige Ausbildung von Lamellipodien in Melanomzellen aufgehoben wurde. Diese Erkenntnisse und die möglicherweise indirekte Interaktion KIBRA/Sra-1 könnten in ähnlicher Weise die Adhäsions- und Migrationsdefizite der KIBRA KD Podozyten erklären.

Die Ergebnisse dieser Arbeit führten zusammen mit den bereits bekannten Daten zu einem Modell, in dem KIBRA in Podozyten eine Adapterfunktion wahrnimmt (Vgl. Einleitung, Abb. 1.13; Abb. 6.1 B). In dieser Vorstellung verbindet KIBRA das Aktin-Zytoskelett über

die Assoziation an Dendrin und Sra-1 mit den beiden Polaritätskomplexen CRB3/PALS1/PATJ und PAR3/PAR6/aPKC ζ . Da die Schlitzmembran ähnlich den *tight junctions* und *adherens junctions* einen hoch spezialisierten Zell-Zell-Kontakt darstellt, könnten die beiden Polaritätskomplexe dort lokalisiert sein. Der Nachweis von Sra-1 an der Spitze von Lamellipodien gibt Anlass zu der Vermutung, dass dieses Protein innerhalb des WAVE Komplexes in den sekundären Fußfortsätzen von Podozyten lokalisiert ist. Weitere Untersuchungen zur Bestätigung dieses Modells der Adapterfunktion von KIBRA liegen daher im Fokus dieser Arbeitsgruppe.

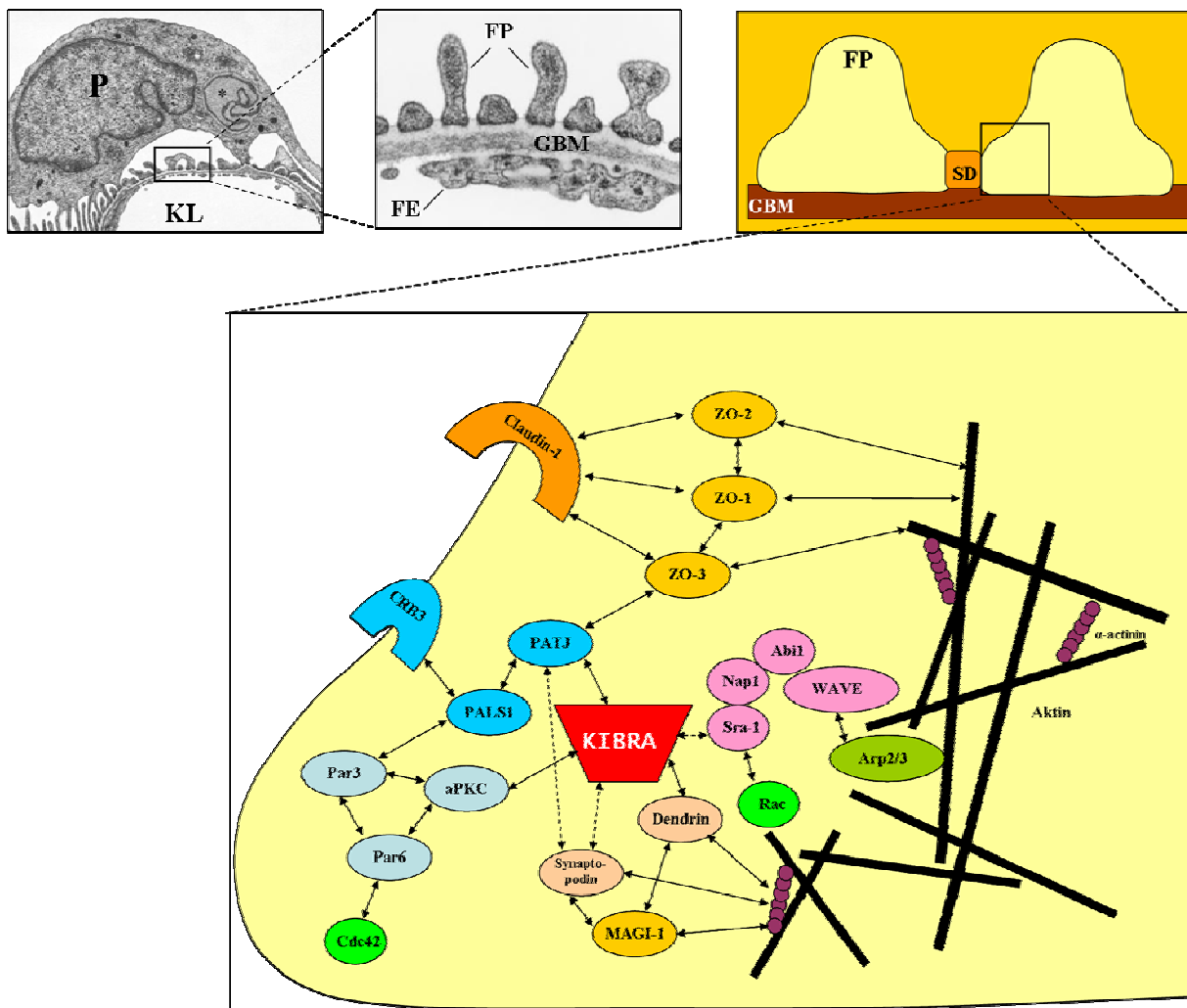


Abb. 6: Modell des Proteins KIBRA und seiner Interaktionspartner im Podozyten.

Die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Rattennierenschnitts (oben links) zeigt einen Podozyten (P), die Vergrößerung (Mitte) die drei Schichten des glomerulären Filters mit Podozytenfußfortsätzen (FP), glomerulärer Basalmembran (GBM) und fenestriertem Endothel (FE). Die schematische Darstellung (oben rechts) zeigt zwei benachbarte FP, die darunter liegende GBM und die zwischen den FP liegende Schlitzmembran (SD). Die Vergrößerung (unten) zeigt ein Modell der direkten Protein-Interaktionen (schwarze Pfeile) bzw. potentieller Interaktionen (gestrichelte Pfeile). Elektronenmikroskopische Aufnahmen modifiziert nach Pavenstädt, Kriz, Kretzler 2003 [67].

7. Ausblick

Sinnvoll erscheinen für die Zukunft Untersuchungen, die aufklären, inwieweit KIBRA als möglicher Adapter zwischen Polaritätskomplexen und Zytoskelett dient. Durch verschiedene Experimente konnte die Ausbildung von Homodimeren des Proteins KIBRA validiert werden, welche über die internen C2-Domänen vermittelt wird (Kremerskothen, Duning, unveröffentlichte Daten). Welche Bedeutung dieser *head-to-tail* Dimerisierung zukommt, bleibt zu klären. Die Suche nach weiteren Interaktionspartnern von KIBRA, insbesondere der WW-Domänen, könnte behilflich sein, zusätzliche Funktionen dieses Proteins aufzudecken. Mit dem Wissen um eine verstärkte Expression von KIBRA im Gehirn und der Niere, die zu der Namensgebung führte (*kidney* und *brain*), stellt sich die Frage, welche Bedeutung dieser Lokalisation zukommt. Obwohl Neuronen aus dem Ektoderm hervorgehen und Podozyten mesodermalen Ursprungs sind, zeigt sich eine große morphologische Ähnlichkeit dieser Zelltypen, die beide hochspezialisiert sind und stark verzweigte Ausläufer bilden. Die jüngst gezeigte Assoziation von KIBRA an Gedächtnisleistungen beim Menschen veranschaulicht die wichtige Rolle, die KIBRA zukommt.

Die geplante Generation genetisch manipulierter Mäuse mit induzierbarem, podozytenspezifischen KIBRA *knock out* soll der weiteren funktionellen Untersuchung dieses Proteins dienen und medizinisch relevante Fragestellungen aufdecken, analog zu verschiedenen *knock out* Maus Modellen, durch welche die essentielle Rolle vieler Schlitzmembranproteine aufgeklärt werden konnte. Untersuchungen zur KIBRA Expression bei verschiedenen Erkrankungen der Niere könnten gegebenenfalls dem besseren Verständnis genetisch bedingter Krankheitsbilder dienen und eventuell eine Therapie in Aussicht stellen.

Des Weiteren soll die Expression verschiedener Verkürzungsmutanten von KIBRA in Podozyten in Zukunft Aufschluss über die Relevanz der einzelnen Domänen dieses Proteins zur Lokalisierung bringen. Durch *Live-Cell-Imaging* Versuche könnten dynamische Umstrukturierungen von KIBRA untersucht werden, vor allem im Zuge von Migrations- und *Wound Healing* Experimenten.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte durch die Identifizierung neuer Interaktionspartner und durch funktionelle Assays ein Beitrag zum besseren Verständnis der Funktion von KIBRA im Podozyten geleistet werden. Für die Zukunft geplant sind weitere Untersuchungen zur Polaritätsfunktion von KIBRA in renalen und neuronalen Zellen.

8. Bibliographie

1. Aguda AH, Burtnick LD, Robinson RC: The state of the filament. *EMBO Rep* 2005;6:220-226.
2. Ahmed M, Kanaan I, Alarifi A, Ba-Essa E, Saleem M, Tulbah A, McArthur P, Hessler R: ACTH-producing pituitary cancer: experience at the King Faisal Specialist Hospital & Research Centre. *Pituitary* 2000;3:105-112.
3. Ahola H, Heikkila E, Astrom E, Inagaki M, Izawa I, Pavenstadt H, Kerjaschki D, Holthofer H: A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1731-1737.
4. 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;8:485-491.
5. Benzing T: Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1382-1391.
6. Bilder D: PDZ domain polarity complexes. *Curr Biol* 2003;13:R661-R662.
7. Bilder D, Schober M, Perrimon N: Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol* 2003;5:53-58.
8. Bompard G, Caron E: Regulation of WASP/WAVE proteins: making a long story short. *J Cell Biol* 2004;166:957-962.
9. Buther K, Plaas C, Barnekow A, Kremerskothen J: KIBRA is a novel substrate for protein kinase Czeta. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:703-707.
10. Chapman ER, Hanson PI, An S, Jahn R: Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J Biol Chem* 1995;270:23667-23671.
11. Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B: The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells. *J Cell Biol* 2005;171:383-392.
12. Condeelis J: Life at the leading edge: the formation of cell protrusions. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:411-444.
13. Dobrosotskaya I, Guy RK, James GL: MAGI-1, a membrane-associated guanylate kinase with a unique arrangement of protein-protein interaction domains. *J Biol Chem* 1997;272:31589-31597.
14. Donahue TR, Hiatt JR, Busuttill RW: Collagenase and surgical disease. *Hernia* 2006;10:478-485.
15. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez-Solis R, Zambrowicz BP, Powell DR: Proteinuria and perinatal lethality in mice

- lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001;21:4829-4836.
16. Drenckhahn D, Franke RP: Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988;59:673-682.
 17. Drier EA, Tello MK, Cowan M, Wu P, Blace N, Sacktor TC, Yin JC: Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* 2002;5:316-324.
 18. Endlich N, Endlich K: Stretch, tension and adhesion - adaptive mechanisms of the actin cytoskeleton in podocytes. *Eur J Cell Biol* 2006;85:229-234.
 19. Endlich N, Kress KR, Reiser J, Uttenweiler D, Kriz W, Mundel P, Endlich K: Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:413-422.
 20. Etienne-Manneville S, Hall A: Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 2001;106:489-498.
 21. Fan Q, Xing Y, Ding J, Guan N, Zhang J: The relationship among nephrin, podocin, CD2AP, and alpha-actinin might not be a true 'interaction' in podocyte. *Kidney Int* 2006;69:1207-1215.
 22. Farquhar MG: The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. *J Clin Invest* 2006;116:2090-2093.
 23. Fields S, Song O: A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 1989;340:245-246.
 24. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-811.
 25. Foley KP, Leonard MW, Engel JD: Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet* 1993;9:380-385.
 26. Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K: Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F856-F865.
 27. Gautreau A, Ho HY, Li J, Steen H, Gygi SP, Kirschner MW: Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:4379-4383.
 28. Guan KL, Dixon JE: Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 1991;192:262-267.
 29. Hall A: Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998;279:509-514.
 30. Herb A, Wisden W, Catania MV, Marechal D, Dresse A, Seeburg PH: Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol Cell Neurosci* 1997;8:367-374.

31. Huber TB, Benzing T: The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14:211-216.
32. Hung AY, Sheng M: PDZ domains: structural modules for protein complex assembly. *J Biol Chem* 2002;277:5699-5702.
33. Hynes RO: Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-554.
34. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
35. Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K, Xiao Q: The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:143-153.
36. Ihalmo P, Palmen T, Ahola H, Valtonen E, Holthofer H: Filtrin is a novel member of nephrin-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:364-370.
37. Innocenti M, Zucconi A, Disanza A, Frittoli E, Areces LB, Steffen A, Stradal TE, Di Fiore PP, Carlier MF, Scita G: Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 2004;6:319-327.
38. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada H, Suzuki H, Kihara I, Yamamoto T: FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001;59:1003-1012.
39. Kerjaschki D: Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest* 2001;108:1583-1587.
40. Kim E, Sheng M: PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:771-781.
41. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS: CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003;300:1298-1300.
42. Klemm JD, Schreiber SL, Crabtree GR: Dimerization as a regulatory mechanism in signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1998;16:569-592.
43. Kozlov G, Gehring K, Ekiel I: Solution structure of the PDZ2 domain from human phosphatase hPTP1E and its interactions with C-terminal peptides from the Fas receptor. *Biochemistry* 2000;39:2572-2580.
44. Kremerskothen J, Kindler S, Finger I, Veltel S, Barnekow A: Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem* 2006;96:1659-1666.
45. Kremerskothen J, Plaas C, Buther K, Finger I, Veltel S, Matanis T, Liedtke T, Barnekow A: Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:862-867.

46. Kurschner C, Mermelstein PG, Holden WT, Surmeier DJ: CIPP, a novel multivalent PDZ domain protein, selectively interacts with Kir4.0 family members, NMDA receptor subunits, neurexins, and neuroligins. *Mol Cell Neurosci* 1998;11:161-172.
47. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
48. Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359-369.
49. Lee DB, Huang E, Ward HJ: Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;290:F20-F34.
50. Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG: Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9814-9819.
51. Lemmers C, Medina E, Delgrossi MH, Michel D, Arsanto JP, Le BA: hINADI/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;277:25408-25415.
52. Li Y, Karnak D, Demeler B, Margolis B, Lavie A: Structural basis for L27 domain-mediated assembly of signaling and cell polarity complexes. *EMBO J* 2004;23:2723-2733.
53. Macara IG: Parsing the polarity code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:220-231.
54. Macara IG: Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* 2004;14:R160-R162.
55. Macias MJ, Wiesner S, Sudol M: WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* 2002;513:30-37.
56. Margolis B, Borg JP: Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci* 2005;118:5157-5159.
57. McDonnell MW, Simon MN, Studier FW: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 1977;110:119-146.
58. Mitchison TJ, Cramer LP: Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* 1996;84:371-379.
59. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM: Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995;131:791-805.
60. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.
61. 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;139:193-204.

62. Nelson WJ: Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* 2003;422:766-774.
63. Niethammer M, Valtschanoff JG, Kapoor TM, Allison DW, Weinberg RJ, Craig AM, Sheng M: CRIPT, a novel postsynaptic protein that binds to the third PDZ domain of PSD-95/SAP90. *Neuron* 1998;20:693-707.
64. Papassotiropoulos A, Stephan DA, Huentelman MJ, Hoerndli FJ, Craig DW, Pearson JV, Huynh KD, Brunner F, Corneveaux J, Osborne D, Wollmer MA, Aerni A, Coluccia D, Hanggi J, Mondadori CR, Buchmann A, Reiman EM, Caselli RJ, Henke K, de Quervain DJ: Common Kibra alleles are associated with human memory performance. *Science* 2006;314:475-478.
65. Patrie KM: Identification and characterization of a novel tight junction-associated family of proteins that interacts with a WW domain of MAGI-1. *Biochim Biophys Acta* 2005;1745:131-144.
66. Patrie KM, Drescher AJ, Welihinda A, Mundel P, Margolis B: Interaction of two actin-binding proteins, synaptopodin and alpha-actinin-4, with the tight junction protein MAGI-1. *J Biol Chem* 2002;277:30183-30190.
67. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003;83:253-307.
68. Pawson T, Nash P: Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. *Genes Dev* 2000;14:1027-1047.
69. Penkert RR, DiVittorio HM, Prehoda KE: Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nat Struct Mol Biol* 2004;11:1122-1127.
70. Ponting CP: Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci* 1997;6:464-468.
71. Raats CJ, van den BJ, Bakker MA, Oppers-Walgreen B, Pisa BJ, Dijkman HB, Assmann KJ, Berden JH: Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 2000;156:1749-1765.
72. Rayala SK, den HP, Manavathi B, Talukder AH, Song C, Peng S, Barnekow A, Kremerskothen J, Kumar R: Essential role of KIBRA in co-activator function of dynein light chain 1 in mammalian cells. *J Biol Chem* 2006;281:19092-19099.
73. Regele HM, Fillipovic E, Langer B, Poczewki H, Kraxberger I, Bittner RE, Kerjaschki D: Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:403-412.
74. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P: The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1-8.
75. Reiser J, Oh J, Shirato I, Asanuma K, Hug A, Mundel TM, Honey K, Ishidoh K, Kominami E, Kreidberg JA, Tomino Y, Mundel P: Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem* 2004;279:34827-34832.

76. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302:1704-1709.
77. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD: Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 2001;153:1175-1186.
78. Rizo J, Sudhof TC: C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 1998;273:15879-15882.
79. Roh MH, Liu CJ, Laurinec S, Margolis B: The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions. *J Biol Chem* 2002;277:27501-27509.
80. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, Gubler MC, Antignac C: Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 2002;160:131-139.
81. Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, Antignac C: Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2004;24:550-560.
82. Roy P, Jacobson K: Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004;57:84-95.
83. Sacktor TC, Osten P, Valsamis H, Jiang X, Naik MU, Sublette E: Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8342-8346.
84. Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P: A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:630-638.
85. Saras J, Heldin CH: PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem Sci* 1996;21:455-458.
86. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthofer H, Kriz W, Endlich K: Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int* 2004;66:91-101.
87. 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;111:1255-1263.
88. Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G: NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J* 2003;17:115-117.
89. Sheetz MP, Felsenfeld D, Galbraith CG, Choquet D: Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp* 1999;65:233-243.

90. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999;286:312-315.
91. Shin K, Fogg VC, Margolis B: Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:207-235.
92. Shin K, Straight S, Margolis B: PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;168:705-711.
93. Shin K, Wang Q, Margolis B: PATJ regulates directional migration of mammalian epithelial cells. *EMBO Rep* 2007.
94. Small JV, Stradal T, Vignall E, Rottner K: The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 2002;12:112-120.
95. Songyang Z, Fanning AS, Fu C, Xu J, Marfatia SM, Chishti AH, Crompton A, Chan AC, Anderson JM, Cantley LC: Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 1997;275:73-77.
96. Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV, Rottner K, Stradal TE: Filopodia formation in the absence of functional. *Mol Biol Cell* 2006;17:2581-2591.
97. Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J, Stradal TE: Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J* 2004;23:749-759.
98. Stiffler MA, Grantcharova VP, Sevecka M, MacBeath G: Uncovering quantitative protein interaction networks for mouse PDZ domains using protein microarrays. *J Am Chem Soc* 2006;128:5913-5922.
99. Stock C, Gassner B, Hauck CR, Arnold H, Mally S, Eble JA, Dieterich P, Schwab A: Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange. *J Physiol* 2005;567:225-238.
100. Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G: Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 2004;14:303-311.
101. Stradal TE, Rottner K, Disanza A, Confalonieri S, Innocenti M, Scita G: Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins. *Trends Cell Biol* 2004;14:303-311.
102. Sudol M, Hunter T: NeW wrinkles for an old domain. *Cell* 2000;103:1001-1004.
103. Suzuki A, Ishiyama C, Hashiba K, Shimizu M, Ebnet K, Ohno S: aPKC kinase activity is required for the asymmetric differentiation of the premature junctional complex during epithelial cell polarization. *J Cell Sci* 2002;115:3565-3573.
104. Tanentzapf G, Tepass U: Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol* 2003;5:46-52.

105. Tountas NA, Brautigan DL: Migration and retraction of endothelial and epithelial cells require PHI-1, a specific protein-phosphatase-1 inhibitor protein. *J Cell Sci* 2004;117:5905-5912.
106. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J: Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006;354:1387-1401.
107. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA, Schachter AD, Poch E, Abreu PF, Appel GB, Pereira AB, Kalluri R, Pollak MR: NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest* 2002;110:1659-1666.
108. Ubach J, Zhang X, Shao X, Sudhof TC, Rizo J: Ca²⁺ binding to synaptotagmin: how many Ca²⁺ ions bind to the tip of a C2-domain? *EMBO J* 1998;17:3921-3930.
109. Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, Yamanaka Y, Goudreault M, Elder K, Kulkarni S, Gish G, Virag C, Lim C, Colwill K, Starostine A, Metalnikov P, Pawson T: A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 2006;125:535-548.
110. Wiesner S, Legate KR, Fassler R: Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1081-1099.
111. Zamir E, Geiger B: Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001;114:3583-3590.

9. Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematischer Aufbau der Säugerniere.....	1
Abb. 1.2:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines glomerulären Kapillarknäuels der Ratte.....	2
Abb. 1.3:	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Podozytenfußfortsatzes	3
Abb. 1.4 a:	Schematische Darstellung der Schlitzmembran	3
Abb. 1.4 b:	Schematische Darstellung der Schlitzmembran	4
Abb. 1.5:	Migrierende Zelle	5
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der Zellmigration	5
Abb. 1.7:	Modell des apikalen Polaritätskomplexes an <i>tight junctions</i>	8
Abb. 1.8:	Modell der beiden apikalen Polaritätskomplexe an <i>tight junctions</i>	8
Abb. 1.9:	Dreidimensionale schematische Darstellung einer PDZ-Domäne	9
Abb. 1.10:	Schematische Darstellung des Proteins KIBRA	10
Abb. 1.11:	Dreidimensionale schematische Darstellung einer WW-Domäne	11
Abb. 1.12:	Dreidimensionale schematische Darstellung einer C2-Domäne	11
Abb. 1.13:	Modell des Proteins KIBRA im Podozyten.....	14
Abb. 3.1:	Der Strukturindex (SI) als Maß für die Morphologie einer Zelle.....	47
Abb. 3.2:	Mechanismus der RNA-Interferenz.....	49
Abb. 3.3:	Klonierung von <i>short hairpin</i> -Konstrukten in das pSuper Vektorsystem.....	50
Abb. 4.1 A:	Schematische Darstellung des humanen Gerüstproteins PATJ <i>full length</i> und den in Hefe Ko-Transformationen als <i>prey</i> eingesetzten Verkürzungsmutanten.....	55
Abb. 4.1 B:	β -Galaktosidase Filter Assay	57
Abb. 4.2 A:	Schematische Darstellung von PATJ <i>full length</i> und den im GST- <i>pulldown</i> eingesetzten Verkürzungsmutanten	58
Abb. 4.2 B:	Aufnahme eines <i>Coomassie</i> gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen	58
Abb. 4.2 C:	Die Western Blot Analyse eines GST- <i>pulldowns</i> zeigt die Interaktion GST.PATJ.PDZ 7-10/GFP.KIBRA.....	59
Abb. 4.3 A:	Schematische Darstellung von KIBRA <i>full length</i> und den im GST- <i>pulldown</i> eingesetzten Verkürzungsmutanten	60

Abb. 4.3 B:	Aufnahme eines <i>Coomassie</i> gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen	60
Abb. 4.3 C:	Die Western Blot Analyse eines GST- <i>pulldowns</i> zeigt die Interaktion GST.KIBRA.C-Terminus/FLAG.PATJ	61
Abb. 4.3 D:	Die Western Blot Analyse eines GST- <i>pulldowns</i> zeigt die Interaktion GST.KIBRA.C-Terminus/PATJ.....	62
Abb. 4.4 A:	Schematische Darstellung des murinen Proteins Sra-1 <i>full length</i> und der in Hefe Ko-Transformationen als <i>bait</i> eingesetzten Verkürzungsmutante.....	63
Abb. 4.4 B:	β-Galaktosidase Filter Assay	64
Abb. 4.4 C:	Schematische Darstellung von KIBRA <i>full length</i> und den im GST- <i>pulldown</i> eingesetzten N-terminalen Verkürzungsmutanten mit und ohne Pro►Ala Mutationen der WW-Domänen	65
Abb. 4.4 D:	Aufnahme eines <i>Coomassie</i> gefärbten SDS-PAA-Gels mit rekombinant exprimierten, affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteinen	65
Abb. 4.4 E:	Die Western Blot Analyse eines GST- <i>pulldowns</i> zeigt die Interaktion GST.KIBRA.WW/Sra-1	66
Abb. 4.5:	Die Western Blot Analyse weist FLAG.KIBRA in Podozytenlysat nach.....	67
Abb. 4.6 A:	Western Blot Analyse zur Ermittlung der KIBRA <i>knock down</i> Effizienz verschiedener <i>short hairpin</i> Konstrukte im pSuper Vektorsystem	68
Abb. 4.6 B:	Auswertung eines Luciferase Assays zur Ermittlung der KIBRA <i>knock down</i> Effizienz verschiedener <i>short hairpin</i> Konstrukte.....	69
Abb. 4.6 C:	Nachweis einer RNA-Isolierung aus transduzierten humanen Podozyten.....	70
Abb. 4.6 D:	Auswertung einer RT-PCR zur Validierung des KIBRA <i>knock down</i> (KD) in kultivierten, humanen Podozyten	71
Abb. 4.6 E:	Western Blot Analyse zur Validierung des KIBRA <i>knock down</i> (KD) in kultivierten, humanen Podozyten	72
Abb. 4.7 A:	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> (KD) Podozyten mit einem KIBRA spezifischen Antikörper.....	73
Abb. 4.7 B:	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> (KD) Podozyten mit einem KIBRA spezifischen Antikörper (Vergrößerung)	73
Abb. 4.8 A:	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> (KD) Podozyten mit einem Tubulin spezifischen Antikörper	74
Abb. 4.8 B:	Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> (KD) Podozyten mit einem Tubulin spezifischen Antikörper (Vergrößerung)	74

Abb. 4.9 A:	Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> Podozyten.....	75
Abb. 4.9 B:	Phalloidin-Färbung des Aktin-Zytoskeletts kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> Podozyten (Vergrößerung).....	75
Abb. 4.10 A:	Adhäsionsassay kultivierter, humaner KIBRA <i>knock down</i> Podozyten und Leervektor transduzierter Podozyten.....	77
Abb. 4.10 B:	Adhäsionsassay kultivierter, muriner KIBRA überexprimierender Podozyten und Leervektor transduzierter Podozyten.....	77
Abb. 4.11:	Migrationsassay kultivierter, humaner KIBRA KD- und Leervektor transduzierter Podozyten	79
Abb. 4.12:	Migrationsassay kultivierter, muriner KIBRA überexprimierenden und Leervektor transduzierter Podozyten	81
Abb. 4.13:	<i>Wound Healing</i> Assays kultivierter, humaner KIBRA KD Podozyten (A) und muriner FLAG-KIBRA transduzierter Podozyten (B)	83
Abb. 4.14:	<i>Wound Healing</i> Assay kultivierter, humaner KIBRA KD Podozyten	84
Abb. 4.15:	<i>Wound Healing</i> Assay kultivierter, muriner FLAG-KIBRA transduzierter Podozyten	85
Abb. 6.1:	Modell des Proteins KIBRA und seiner Interaktionspartner im Podozyten..	103

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Klassifizierung der PDZ-Domänen anhand der Konsensusbindungssequenz ..	9/91
Tab. 2.1:	<i>Home made</i> ECL	21
Tab. 3.1:	PCR-Bedingungen.....	33
Tab. 3.2:	Rezepturen für SDS-PAA-Gele.....	38
Tab. 3.3:	Produktion von Lentiviren.....	52
Tab. 4.1:	Ko-Transformationen des Hefestammes MAV 203 (PATJ/KIBRA)	56
Tab. 4.2:	Ko-Transformationen des Hefestammes MAV 203 (Sra-1/KIBRA).....	64

9.3 Abkürzungen und Akronyme

9.3.1 Materialien und Einheiten

°C	Grad Celcius
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
293T	Variante der HEK Zelllinie, die das große T-Antigen des SV40-Virus exprimiert
AA	Acrylamid-Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne (Y2H)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
BD	Bindedomäne (Y2H)
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calciumionen
cDNA	komplementäre DNA
CDS	Für ein Protein kodierende Sequenz einer DNA (<i>coding sequence</i>)
DAG	Diacylglycerin
dM	Doppelmutante
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced Chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	(FBS, FKS) fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLAG	Octapeptid, DYDDDDDK, spezifisches Antikörperepitop der Firma Sigma-Aldrich
<i>full length</i>	Bezeichnung für ein Protein, das in seiner gesamten Länge exprimiert wird
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFP	verstärktes grünfluoreszierendes Protein; (eGFP, <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion S-Transferase
h	human oder Stunde
HEK	humane embryonale Nierenepithelzelllinie (<i>human embryonic kidney</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
Kan	Kanamycin
kD	Kilodalton
l	Liter
<i>library</i>	cDNA Genbank
m	murin oder milli

M	molar (mol/l)
mA	Milliampère
Mg ²⁺	Magnesiumionen
Min	Minute
mM	Millimolar
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> ; reverse Transkriptase
nm	Nanometer
O/H	Rotationsinkubator (<i>over head</i>)
O/N	Über Nacht (<i>over night</i>)
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte physiologisch Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PFA	Paraformaldehyd (Polyformaldehyd)
PIP3	Phosphatidylinositol-1, 4, 5-bisphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkription mit nachfolgender PCR
<i>Scaffolding</i> -Protein	Gerüst-Protein
SD	Schlitzmembran (<i>slit diaphragm</i>)

SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
Std	Stunde
SV	Simian Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20®
U	Einheit der Enzymaktivität (<i>unit</i>)
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
V5	spezifisches Antikörperepitop aus 9-14 AS (GKP)IPNPLLGLDST
w/v	Gewicht/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y2H	Hefe-2-Hybrid (<i>Yeast Two Hybrid</i>)
βME	β-Mercaptoethanol

9.3.2 Symbole für die DNA- und RNA-Basen

Base	Buchstabensymbol
Adenin	A
Cytosin	C
Guanin	G
Thymin	T
Uracil	U

9.3.3 Symbole für die Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Cystein	Cys	C
Aspartat	Asp	D
Glutamat	Glu	E
Phenylalanin	Phe	F
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Lysin	Lys	K
Leucin	Leu	L
Methionin	Met	M
Asparagin	Asn	N
Prolin	Pro	P
Glutamin	Gln	Q
Arginin	Arg	R
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Valin	Val	V
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermann Pavenstädt, der mir diese Arbeit in seiner Gruppe sowie Aufenthalte in der AG Benzing in Freiburg und der AG Schwab in Münster ermöglicht hat. Jedem Mitglied der gesamten Arbeitsgruppe Pavenstädt, inklusive aller ehemaligen Mitarbeiter, möchte ich gleichermaßen für jeden Beitrag zu meiner Ausbildung danken. Besondere Dankbarkeit möchte ich gegenüber PD Dr. Joachim Kremerskothen für seine Betreuung meiner Arbeit an dem KIBRA Projekt aussprechen und für die viele investierte Zeit. Ebenso danke ich Dr. Michael Bayer, Dr. Christian Reinhardt und Katja Brinkmann für die Vorarbeiten. Danke an Dr. Hsiang-Hao Hsu für die Hilfestellung am Fluoreszenzmikroskop und an Dr. Kerstin Duning und Dr. Thomas Weide für die gemeinschaftliche Arbeit an diesem gleichermaßen faszinierenden wie schwierigen Projekt. Weiteren Dank möchte ich zum Ausdruck bringen gegenüber Dr. Marc Schlüter für die großartige Unterstützung bei der Generierung der Hefedaten. Dr. Christina Schäfer danke ich für ihre Bereitschaft viele lehrreiche Seminare in ihrer Freizeit vorzubereiten, für die Beantwortung vieler Fragen und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke an meine ganze Gruppe.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolf-Michael Weber und Frau Prof. Dr. Liebau für die Übernahme der Gutachten.

Für die sehr nette und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Migrations-, *Wound Healing*- und Adhäsionsexperimente in seiner Gruppe in der Physiologie in Münster danke ich Herrn Prof. Dr. Albrecht Schwab, Sabine Mally und Dipl. Biol. Hermann Krähling. Dank im Besonderen für die unbeschreibliche Atmosphäre.

Einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit verdanke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Benzing und seinen Mitarbeitern Dr. Bernhard Schermer sowie Roman-Ulrich Müller. Während meines dreimonatigen Aufenthaltes in der AG Benzing in Freiburg habe ich viel gearbeitet und viel gelernt. Dabei wurde ich auf so bemerkenswert nette und selbstverständliche Weise von jedem einzelnen Mitglied dieser Gruppe integriert, dass mir die Worte fehlen. Und das ist selten.

Hiermit versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Münster, den 12.02.2007

Hiermit versichere ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegt habe.

Münster, den 12.02.2007

Hiermit erkläre ich mich mit der Zulassung von Zuhörerinnen/Zuhörern bei der mündlichen Prüfung einverstanden.

Münster, den 12.02.2007

Lebenslauf

Persönliche Daten

Eva-Maria Schurek
22.07.1974 in Berlin geboren
ledig
deutsch

Promotionsstudiengang

Januar 2004-dato Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Betreuer: Prof. Dr. H. Pavenstädt, Universitätsklinikum
Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik D,
Molekulare Nephrologie

Studium

24.01.2003 Diplom
WS 1995-2003 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Fachrichtung: Diplom-Biologie
Hauptfach: Zoologie
Nebenfächer: Mikrobiologie, Biochemie
WS 1994/95-SS 1995 Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Fachrichtung: Lehramt Biologie/Deutsch

Schulbildung

10.06.1994 Abitur am Gymnasium Johanneum, Lingen/Ems
1992-1994 Gymnasium Johanneum, Lingen/Ems
1990-1992 Franziskus-Gymnasium, Lingen/Ems
1986-1990 Gymnasium Schillerschule, Hannover
1984-1986 Orientierungsstufe Nackenbergerstraße, Hannover
1980-1984 Grundschule Hinrich-Wilhelm-Kopf-Schule, Hannover

Tätigkeiten

01.04.-30.09.2002	studentische Hilfskraft, AG Prof. Dr. D. Ribbert, Institut für Allgemeine Zoologie und Genetik, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
15.04.2004-dato	Übungsleiterin beim Hochschulsport Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster