

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
(Allgemeine Innere Medizin sowie Nephrologie und Hypertonie)
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -

**Analysen zur Rolle von Rab7
für den mTOR-Signalweg in Podozyten**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Zündorf, Freya Ricarda

aus Bielefeld

-2016-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Mathias Herrmann

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Thomas Weide

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ursula Rescher

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik D
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt -
Referent: Priv.-Doz. Dr. Thomas Weide
Korreferent: Prof. Dr. Ursula Rescher

ZUSAMMENFASSUNG

Analysen zur Rolle von Rab7 für den mTOR-Signalweg in Podozyten
Zündorf, Freya Ricarda

Podozyten sind essentielle Zellen der renalen Filtrationsbarriere. Sie stellen sicher, dass kein Eiweiß über den Urin verloren geht. Neuere Untersuchungen machen zunehmend deutlich, dass endolysosomale und autophagosomale Prozesse für das Überleben der Podozyten wichtig sind. Das Protein Rab7 ist sowohl auf endolysosomalen als auch auf Membranen autophagozytotischer Kompartimente lokalisiert. Bisher unveröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Pavenstädt zeigen, dass Mäuse, denen Rab7 in den Podozyten fehlt, eine starke Proteinurie entwickeln und gravierende morphologische Veränderungen der Schlitzmembran-Architektur aufweisen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Rab7-Aktivitätslevel auf den für Podozyten wichtigen mTOR-Signalweg auswirken. Der mTOR-Signalweg reguliert Zellwachstum und -proliferation und kontrolliert autophagozytotische Prozesse. Darüber hinaus ist bekannt, dass die mTOR-Kinase an endolysosomale Membranen rekrutiert werden kann. Es wurden stabile Zelllinien erstellt, in denen die Überexpression einer dauerinaktiven oder einer daueraktiven Mutante des Rab7-Proteins induziert werden konnte. Für die daueraktive, membrangebundene Rab7 Q67L-Mutante konnte eine verminderte Zellviabilität und gleichzeitig eine Störung in der Reaktivierung und Rekrutierung von mTOR auf lysosomale Kompartimente festgestellt werden.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass Rab7-Aktivitätslevel mTOR-Kinase abhängige Funktionen beeinflussen. Daraus folgt, dass Fehlfunktionen von Rab7 bei der Pathogenese chronischer Nierenerkrankungen ein wichtiger Kofaktor sein können.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Disseration mit dem Titel

„Analysen zur Rolle von Rab7 für den mTOR-Signalweg in Podozyten“

in dem Institut für Molekulare Nephrologie, Medizinische Klinik D,
Universitätsklinikum Münster

unter Anleitung von
Priv.-Doz. Dr. Thomas Weide

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Disseration, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Freya Ricarda Zündorf

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	55
Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Aufbau und Funktion der Niere	1
1.2 Endolysosomale Prozesse sind überlebenswichtig für Podozyten	3
1.3 Das Rab7-Protein	4
1.4 Die Aktivierung der mTOR-Kinase findet auf lysosomalen Kompartimenten statt	5
1.5 mTOR spielt eine wichtige Rolle im Podozyten	7
1.6 Zielsetzung	7
2 Materialien	9
2.1 Geräte	9
2.2 Laborbedarf	10
2.3 Chemikalien	12
2.4 Lösungen, Medien und Puffer	13
2.5 Enzyme	15
2.6 Primer	15
2.7 Plasmide und Vektoren	15
2.8 Primäre Antikörper	16
2.9 Sekundäre Antikörper	17
2.10 Bakterien	17
2.11 Eukaryotische Zelllinien	18
2.12 Kommerzielle Kits	18
2.13 Software	18
3 Methoden	19
3.1 Methoden der Mikrobiologie	19
3.1.1 Transformation von Bakterien	19
3.1.2 Plasmid-DNA Isolierung	19
3.2 Methoden der Molekularbiologie	19

3.2.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	19
3.2.2	Klonierung von DNA.....	20
3.2.3	Gateway® -Klonierungen	21
3.2.4	Sequenzierung	21
3.3	Methoden der Zellkultur	22
3.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien	22
3.3.2	Transiente Transfektion	23
3.3.3	Generierung von stabilen Zelllinien.....	23
3.3.4	Herstellung von Zelllysaten	24
3.3.5	Einfrieren von Zellen	25
3.3.6	Bestimmung der Zellviabilität	25
3.4	Methoden der Proteinbiochemie	26
3.4.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten (SDS-PAGE).....	26
3.4.2	Western Blot.....	26
3.4.3	Fluoreszenzmikroskopie	27
3.5	Das pINDUCER21-Puro-System	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Generierung von Zelllinien zur induzierbaren Verschiebung der Rab7-Aktivität	30
4.1.1	Herstellung von pINDUCER-Expressionsvektoren	30
4.1.2	Erstellung der Zelllinien.....	32
4.2	Daueraktives Rab7 Q67L vermindert die Zellviabilität.....	33
4.3	Einfluss der Rab7-Mutanten auf den mTOR-Signalweg.....	34
4.4	Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu einer Akkumulation von LC3 II und unreifem Cathepsin D	37
4.5	Einfluss der Rab7-Mutanten auf mTOR in ausdifferenzierten AB8-Zellen	38
5	Diskussion	42
5.1	Herstellung stabiler Zelllinien zur Überexpression von daueraktivem- und dauerinaktivem Rab7	42
5.2	Die Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen haben eine geringere Zellviabilität	43
5.3	Rab7 Q67L beeinflusst mTOR-Reaktivierung nach Hungern.....	44
5.4	Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu einer einer gesteigerten Autophagozytose und lysosomalen Reifungsstörungen.....	46

5.5 Rab7 Q67L führt zu einer verminderten mTOR-Kinase Aktivierung nach Hungern	47
5.6 Ausblick	48
6 Literaturverzeichnis	49
7 Lebenslauf.....	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gesunde und kranke Podozytenstruktur	2
Abbildung 2: Endolysomale Reifung und Rab-GTPase-Zyklus	5
Abbildung 3: Aktivierung von mTORC1.....	6
Abbildung 4: Der pINDUCER21-Puro Vektor	29
Abbildung 5: Restriktionsverdau des pENTR-eGFP-Rab7 T22N und pENTR eGFP-Rab7 Q67L	31
Abbildung 6: Restriktionsverdau des pINDUCER21-eGFP-Rab7 T22N und pINDUCER21-eGFP-Rab7 Q67L	32
Abbildung 7: Die induzierte Überexpression von Rab7-Mutanten führt zu unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation	32
Abbildung 8: Daueraktives Rab7 Q67L vermindert die Zellviabilität	33
Abbildung 9: Die basale Aktivität der mTOR-Kinase wird durch die Rab7-Mutanten nicht beeinflusst	34
Abbildung 10: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante stört die mTOR-Reaktivierung nach Hungern	35
Abbildung 11: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante vermindert die mTOR-Rekrutierung auf Lamp2-positive Strukturen	37
Abbildung 12: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu einer Akkumulation von LC3 II und Vorformen von Cathepsin D.....	38
Abbildung 13: Die Überexpression der Rab7-Mutanten funktioniert auch in ausdifferenzierten AB8-Zellen	39
Abbildung 14: Ausdifferenzierte AB8-Zellen exprimieren signifikant mehr LC3-II als proliferierende AB8-Zellen	39
Abbildung 15: Rab7 Q67L stört Reaktivierung von mTOR nach Hungern in ausdifferenzierten Podozyten	40
Abbildung 16: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante vermindert die mTOR-Rekrutierung auf Lamp2-positive Strukturen in ausdifferenzierten AB8 Zellen	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	9
Tabelle 2: Laborbedarf	10
Tabelle 3: Chemikalien	12
Tabelle 4: Lösungen, Medien und Puffer	13
Tabelle 5: Enzyme.....	15
Tabelle 6: Primer	15
Tabelle 7: Plasmide und Vektoren	15
Tabelle 8: Primäre Antikörper.....	16
Tabelle 9: Sekundäre Antikörper.....	17
Tabelle 10: Bakterien	17
Tabelle 11: Eukaryotische Zelllinien.....	18
Tabelle 12: Kommerzielle Kits.....	18
Tabelle 13: Software	18
Tabelle 14: PCR Zyklus.....	22
Tabelle 15: Zelllinien	22
Tabelle 16: Zusammensetzung der Polyacrylamidelektrophorese-Gele.....	26

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin	IRES	interne ribosomale Bindestelle
APS	Ammoniumpersulfat	Kan	Kanamycin
ATP	Adenosintriphosphat	Kb	Kilobasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	kDa	Kilodalton
bp	Basenpaare	LB	<i>lysogeny broth</i>
cDNA	komplementäre DNA	LC3	<i>light chain 3</i>
CKD	<i>chronic kidney disease</i>	mTOR	<i>mechanistic Target of Rapamycin</i>
CMT	Charcot-Marie-Tooth	NGS	<i>normal goat serum</i>
Cs/Fe	<i>iron supplemented calf serum</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PFA	Paraformaldehyd
DMSO	Dimethylsulfoxid	PVDF	Polyvenyldifluorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RILP	<i>Rab-interacting lysosomal protein</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	RNA	Ribonukleinsäure
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt solution</i>	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	Raumtemperatur
<i>eGFP</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	SDS	Natriumlaurylsulfat
FCS	Fetales Kälberserum	SDS-	SDS-Polyacrylamid-
GAP	<i>GTPase activating protein</i>	PAGE	Gelelektrophorese
GBM	glomeruläre Basalmembran	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GDP	Guanosindiphosphat	TBST	<i>tris buffered saline plus Tween-20</i>
GTP	Guanosintriphosphat	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HEK	humane embryonale Nierenzellen	U_pM	Umdrehungen pro Minute
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure	VSVG	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein</i>
HRP	Meerrettichperoxidase	WB	Western Blot
IF	Immunfluoreszenz		

1 Einleitung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD, engl.: *chronic kidney disease*) spielt eine wichtige Rolle für unsere immer älter werdende Gesellschaft. In Teilen von Deutschland herrschen Prävalenzen von bis zu 17,3 % (Bruck et al. 2016). Trotzdem gibt es in der Bevölkerung nur ein geringes Bewusstsein für die Erkrankung. Die CKD kann zu gefährlichen Folgen wie tödlichen kardiovaskulären Erkrankungen oder einem akuten Nierenversagen führen. Deshalb ist es von Bedeutung, den Ursachen dieser „stillen Epidemie“ (Stenvinkel 2010) tiefer auf den Grund zu gehen und das Bewusstsein in der Bevölkerung zu stärken.

Wenn die CKD so weit fortgeschritten ist, dass eine Nierenersatztherapie notwendig ist, spricht man von einer *End-Stage Renal Disease* (ESRD). Ein Großteil dieser ESRD ist auf eine Schädigung der Glomerula zurückzuführen, wobei die Podozyten hier oft der primäre Angriffspunkt sind (Wiggins 2007). Podozyten befinden sich beim erwachsenen Menschen im postmitotischen Stadium und haben nicht mehr die Fähigkeit sich zu teilen. Deshalb können geschädigte oder verlorene Podozyten nicht ersetzt werden (Pavenstädt et al. 2003; Scott and Quaggin 2015). Sind zu viele Podozyten geschädigt, verliert der Glomerulus seine Funktionsfähigkeit und die gesamte Filtrationseinheit, das sog. Nephron, geht zugrunde. Bei Verlust vieler Nephrone kommt es zu einer Abnahme der Nierenfunktion, die bis zu einer ESRD fortschreiten kann. Nur durch Nierenersatztherapien wie z.B. der Dialyse kann ein Mensch dann überleben. Patienten mit diabetischer Nephropathie sind unter den chronisch Nierenerkrankten diejenigen, die am häufigsten auf eine Nierenersatztherapie angewiesen sind (Estacio und Schrier 2001; Gödel et al. 2011).

1.1 Aufbau und Funktion der Niere

Die Niere ist aus einer Vielzahl einzelner Funktionseinheiten, den Nephronen, aufgebaut. Ein Nephron besteht aus einem Glomerulus, dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr. Afferente, zuführende Arteriolen leiten das zu filtrierende Blut in die Glomeruluskapillaren. Dort wird der Primärharn gewonnen, in der Bowman'schen Kapsel gesammelt und dem Tubulussystem zugeführt. Nicht filtrierte Blutbestandteile gelangen über die efferenten Arteriolen wieder in den Körperkreislauf. Für den Körper nützliche Stoffe (z.B. Kochsalz, Zucker, Eiweiß und Wasser), die die renale Filtrationsbarriere überqueren,

werden im Tubulussystem rückresorbiert. Von den täglich produzierten 180 Litern Primärharn werden letztendlich nur ca. 1,5 Liter Urin ausgeschieden (zu diesem Absatz vgl. Behrends et al. 2012).

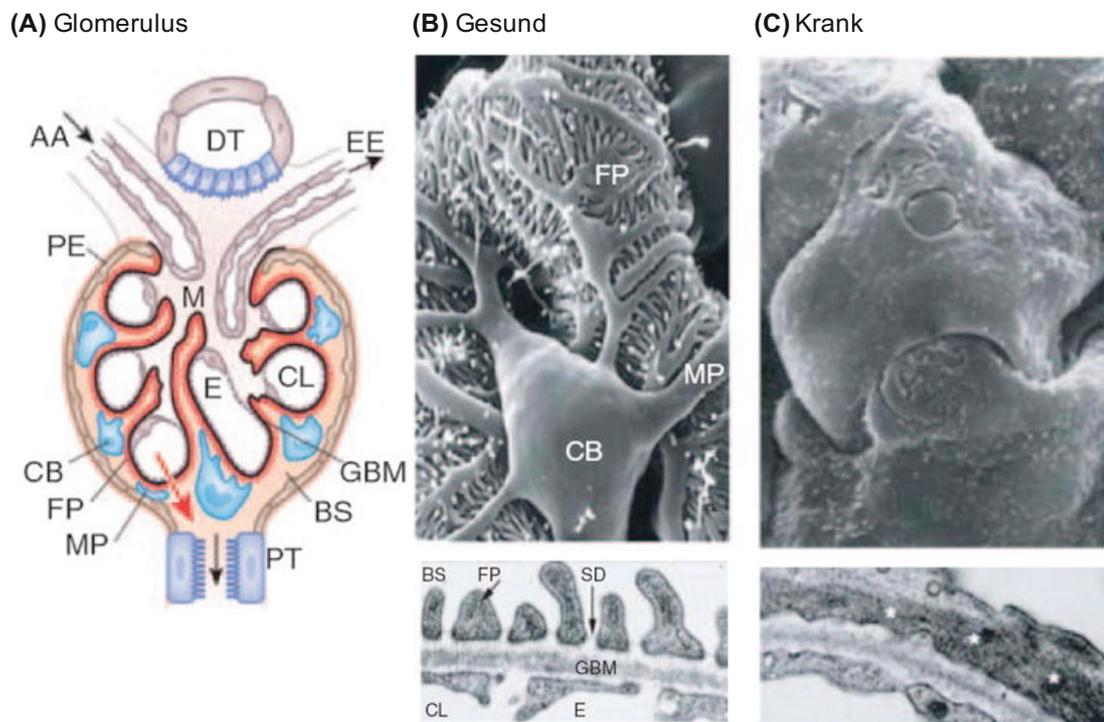


Abbildung 1: Gesunde und kranke Podozytenstruktur

(A) Dargestellt ist ein Glomerulus. AA - afferente Arteriole, DT - distaler Tubulus, EE - efferente Arteriole, M - Mesangialzellen, E - Endothelzellen, CL - Kapillarlumen (*capillary lumen*), CB - Zellkörper (*cell body*), FP - Fußfortsatz (*foot process*), MP - *major process*, GBM - glomeruläre Basalmembran, BS - Bowman'sche Kapsel (*Bowman's space*), PT - proximaler Tubulus. (B) und (C) zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen. Vom Bowman'schen Raum aus betrachtet sieht man im gesunden Zustand einen Zellkörper (CB), der sich über größere Fortsätze (MP) in die Fußfortsätze (FP) aufteilt, die der glomerulären Basalmembran aufliegen. Transmissionselektronenmikroskopische Bilder zeigen die dreischichtige Filtrationsbarriere aus Schlitzmembran (SD), glomerulärer Basalmembran (GBM), und den Endothelzellen (E). Im kranken Zustand verändert sich die Morphologie der Fußfortsätze enorm. Sie ziehen sich zurück und bilden keine Schlitzmembran mehr aus. (Abbildungen aus Mundel und Reiser 2010, mit Erlaubnis von Elsevier)

Die renale Filtrationsbarriere besteht aus drei Schichten. Das Blut passiert zunächst das fenestrierte glomeruläre Endothel, dann die glomeruläre Basalmembran (GBM) und schließlich die podozytäre Schlitzmembran. Letztere ist für die selektive Permeabilität des Filters von zentraler Bedeutung (Scott and Quaggin 2015). Blutbestandteile und Proteine werden dadurch zurückgehalten. Können Proteine, insbesondere das Albumin des Serums, die Filtrationsbarriere passieren und werden über den Urin ausgeschieden, spricht man von einer Proteinurie. Als Ursache für diese

Proteinurie wird der progressive Verlust von Podozyten angenommen. Auf molekularer Ebene geht man hierfür von unterschiedlichen Pathomechanismen aus, die alleine oder in Kombination auftreten können. Da die Podozytenzellkörper in der Bowman'schen Kapsel im Primärharn schwimmen und nur die Fußfortsätze an der GBM anhaften, besteht für sie ein erhöhtes Risiko lebend abzufallen, wenn geschädigte oder fehlerhaft exprimierte Adhäsionsproteine die Wechselwirkung zwischen der GBM und dem Podozyten stören (Kriz et al. 2013). Auch der Podozytenzelltod (Apoptose) oder bereits eine gestörte Schlitzmembran- oder Fußfortsatzarchitektur kann zu einer Schädigung der Filtrationsbarriere führen (Pavenstädt et al. 2003). Elektronenmikroskopisch kann man eine veränderte Morphologie der Podozyten beobachten, gekennzeichnet durch eine Retraktion der Fußfortsätze (Kriz et al. 2013). Die Retraktion der Fußfortsätze (*foot process effacement*) ist das bisher wichtigste morphologische Merkmal für eine Podozytenschädigung. Da es fast immer mit einer Proteinurie korreliert, gibt es zahllose Versuche, die molekularen Ursachen für diese Veränderungen zu identifizieren. Im Mittelpunkt steht die Untersuchung von Regulatoren der Aktindynamik (Greka und Mundel 2012).

Der progressive Verlust von Podozyten ist der häufigste Grund für eine ESRD (Kriz et al. 2013). Außerdem konnte schon früher ein entscheidender Zusammenhang zwischen der Stärke der Proteinurie und dem Risiko der Krankheitsprogression bis zu einer ESRD nachgewiesen werden (Zeeuw et al. 2004).

Über ein detaillierteres Verständnis der Mechanismen, die zum Podozyten- oder Podozytenfunktionsverlust führen, erhofft man sich, Zielstrukturen für mögliche Therapien aufzudecken. Bereits nachgewiesen ist die Rolle von Strukturproteinen für das Aufrechterhalten der podozytären Schlitzmembran (Tryggvason et al. 2006). Mittlerweile zeigen eine Reihe von Studien, dass auch endolysosomale und autophagosomale Prozesse wichtig für die Podozytenfunktion sind (Soda et al. 2012; Bechtel et al. 2013; Tagawa et al. 2016). Störungen dieser Prozesse könnten folglich an der Entstehung oder Progression von Podozytopathien beteiligt sein.

1.2 Endolysosomale Prozesse sind überlebenswichtig für Podozyten

Da es sich bei Podozyten wie bei Neuronen um postmitotische Zellen handelt, ist die Betrachtung neuronaler Krankheiten grundsätzlich von Interesse für die Podozytenforschung. Der Nachweis, dass endolysosomale und autophagolysosomale Prozesse für das Überleben der Podozyten wichtig sind (Soda et al. 2012; Bechtel et al. 2013;

Tagawa et al. 2016), ist besonders interessant, da im Zusammenhang mit bestimmten Formen der Charcot-Marie-Tooth-Neuropathie Gene identifiziert wurden, die im Zusammenhang mit lysosomalen und autophagolysosomalen Reifungsprozessen stehen. Zu diesen Genen gehören z.B. *MTMR2*, *MTMR13*, *DNM2*, *NDRG1*, *LITAF/SIMPLE* und auch das für diese Arbeit wichtige *Rab7* (Bucci et al. 2012). Für das Rab7-Protein wurden vier Mutationen identifiziert, die eine Rolle bei der Krankheitsentstehung der Charcot-Marie-Tooth2B (CMT2B)-Neuropathie spielen (Zhang et al. 2013). Bedingt durch eine fortschreitende Funktionsstörung der peripheren Nerven leiden Patienten an Muskelschwäche und Sensibilitätsverlust in Händen und Beinen (Gentil und Cooper 2012). Für die ermittelten Mutationen im Rab7-Protein konnte eine langsamere GTP-Hydrolyse als im Wildtyp-Protein nachweisen werden, was mit einer zeitlich erhöhten Rab7-Aktivität auf endolysosomalen Membranen einhergehen könnte (Spinosa et al. 2008; Cherry et al. 2013).

1.3 Das Rab7-Protein

Das Rab7-Protein gehört zur Familie der kleinen Rab-GTPasen (engl.: *Ras-related in brain*), die bei intrazellulären Vesikel- und Membrantransportprozessen eine zentrale Rolle spielen.

Es ist auf den Membranen von späten Endosomen, Lysosomen und Autolysosomen lokalisiert (Bucci et al. 2000) und spielt eine Schlüsselrolle bei dem Reifungsprozess vom frühen zum späten Endosom, indem es schrittweise das frühendosomale Rab5 ersetzt (Rink et al. 2005). Außerdem reguliert Rab7 den Transport von Lysosomen in Richtung des mikrotubuli-organisierenden Zentrums über den *downstream* Effektor RILP (Jordens et al. 2001) und ist an retrograden Transportprozessen zwischen Endosomen und Golgi Apparat beteiligt (Rojas et al. 2008). Über Interaktionen mit weiteren Effektoren (z.B. Rabring7 oder ORP1L) wirkt Rab7 in vielen weiteren endosomalen Transportprozessen und anderen zellulären Vorgängen mit (Zhang et al. 2009), auf die hier nicht eingegangen wird.

Reguliert wird Rab7 über den sog. Rab-GTPase-Zyklus. Im Zytoplasma liegt GDP-gebundenes Rab7 assoziiert an den löslichen Faktor GDI (*Guanine-Dissociation-Inhibitor*) vor. GDF (*GDI-Displacementfactor*) sorgt dafür, dass das prenylierte Rab7 an die Plasmamembran rekrutiert und dort inseriert wird. An der Plasmamembran aktivieren sog. GEFs (*Guanine-Nucleotide-Exchange-Factor*) die Rab-GTPasen, indem sie den Austausch von GDP zu GTP katalysieren. Für Rab7 ist bisher nur der sog. *HOPS-complex* als GEF identifiziert worden (Zhang et al. 2009). Die GAPs

unterstützen die eher schwache intrinsische GTPase-Aktivität (Hydrolyse von GTP zu GDP) der Rab-Proteine. GDP-gebundenes Rab7, dissoziiert von der Membran und gelangt wieder ins Zytosol (Zhang et al. 2009).

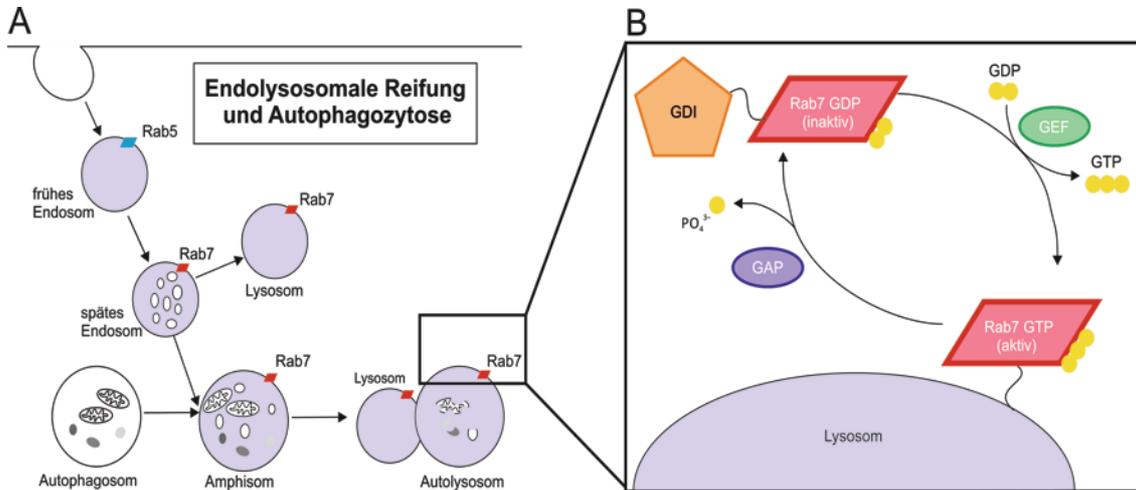


Abbildung 2: Endolysosomale Reifung und Rab-GTPase-Zyklus

(A) Endozytotisch aufgenommenes, extrazelluläres Material wird über Vesikel aufgenommen. Diese reifen über frühe und späte Endosomen zu Lysosomen. Zelleigenes Material wird in Autophagosomen gesammelt. Aus der Fusion mit späten Endosomen entstehen Amphisomen, die wiederum mit Lysosomen verschmelzen und Autolysosomen bilden (modifiziert nach Hansen and Johansen 2011). (B) Rab-GTPase-Zyklus: Inaktives, GDP-gebundenes Rab7 liegt assoziiert an einen löslichen Faktor (*GDI-Guanine-Dissociation-Inhibitor*) im Zytosol vor. *Guanosin-Nucleotide-Exchange-Factors* (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP. GTP-gebundenes Rab7 wird über Prenylierung an die Membran von späten Endosomen, Lysosomen oder Autolysosomen rekrutiert. *GTPase-Activating-Proteins* (GAPs) hydrolysieren GTP zu GDP und inaktivieren das Rab7 bis ein neuer Zyklus beginnt.

1.4 Die Aktivierung der mTOR-Kinase findet auf lysosomalen Kompartimenten statt

Die mTOR-Kinase (engl.: *mechanistic target of Rapamycin*) ist ein zentraler Regulator von Zellwachstum und -proliferation. Wenn ausreichend Nahrung vorhanden ist, bewirkt die mTOR-Kinase über Phosphorylierung von *downstream targets*, wie z.B. der p70S6-Kinase, eine Aktivierung der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums. Bei Nahrungsmangel wird die mTOR-Kinase inhibiert und gleichzeitig die Autophagozytose aktiviert. Autophagozytose bedeutet, dass die Zelle eigene Proteinkomplexe und Organellen lysosomal degradiert, um ihre Proteinsynthese und Energieproduktion aufrecht zu erhalten (Laplante und Sabatini 2009).

mTOR besteht aus zwei Komplexen. Der mTORC1-Komplex wird über Aminosäuren, Sauerstoff, Energie und Wachstumsfaktoren aktiviert. Er steigert die Translation von mRNA und die Biogenese von Ribosomen (Robida-Stubbs et al. 2012; Chua und Tang

2015). Der mTORC2-Komplex wird über Wachstumssignale und Interaktionen mit den Ribosomen aktiviert und spielt eine wichtige Rolle bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts (Jacinto et al. 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass endolysosomale Strukturen wichtig für die Aktivierung der mTOR-Kinase sind. Der mTORC1-Komplex wird zur Aktivierung auf endolysosomale Strukturen rekrutiert (Sancak et al. 2008). Man geht davon aus, dass die v-ATPase lysosomale Aminosäuren erkennt und mTORC1 über den Ragulator-Komplex an die Membran rekrutiert (Zoncu et al. 2011). Dort kommt mTORC1 vermutlich mit seinem Aktivator Rheb in Kontakt und sorgt über Phosphorylierung seiner *downstream targets* für Zellwachstum und -proliferation (Yadav et al. 2013).

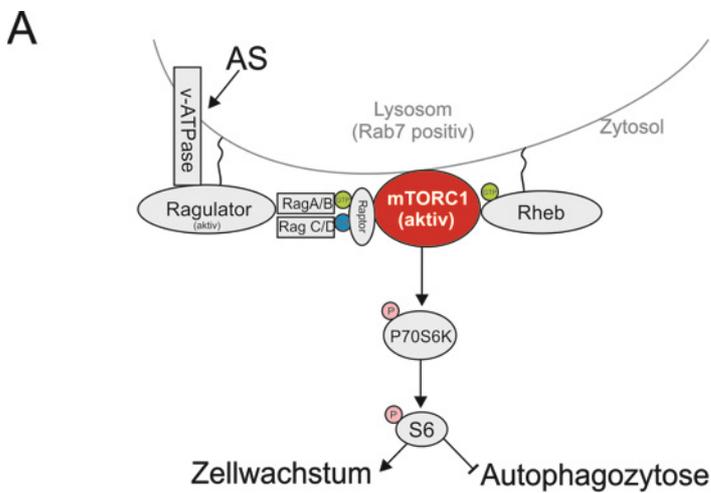
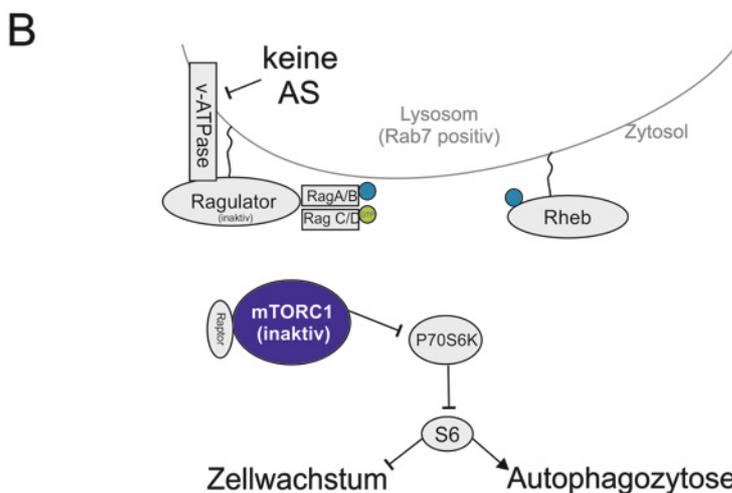


Abbildung 3: Aktivierung von mTORC1

(vereinfacht dargestellt)

(A) Sind Aminosäuren (AS) vorhanden wird der Ragulator-Komplex aktiviert und mTORC1 an die lysosomale Membran rekrutiert. Dort kommt mTORC1 mit seinem Aktivator Rheb in Kontakt und stimuliert über eine Phosphorylierungskaskade das Zellwachstum. **(B)** Sind keine AS vorhanden ist der Ragulator-Komplex inaktiv. mTORC1 wird nicht an die Membran rekrutiert. P70S6K wird nicht phosphoryliert. Das Zellwachstum wird gehemmt. Es findet stattdessen vermehrt Autophagozytose statt.



Hinweise in der Literatur deuten darauf hin, dass Störungen im Übergang vom frühen zum späten Endosom die Aktivierung von mTORC1 inhibieren (Flinn et al. 2010; Li et al. 2010). Beide Gruppen konnten zeigen, dass die Überexpression einer daueraktiven

Variante vom frühendosomalen Marker Rab5 die Aktivierung von mTORC1 verhindert. Der für die weitere Reifung wichtige Rab5/Rab7-Übergang wird in diesem Fall gestört. Li et al. wiesen darüber hinaus nach, dass ausschließlich membrangebundenes Rab5 mTORC1 beeinflusst (Li et al. 2010).

1.5 mTOR spielt eine wichtige Rolle im Podozyten

Dysregulationen des mTOR-Signalwegs können podozytäre Schädigungen und die Entstehung von Nierenerkrankungen bewirken. Es wurde gezeigt, dass ein Podozyten-spezifischer *knockout* von mTOR zu Bildung großer Vakuolen und Störungen in der Reformation von Lysosomen führt (Cina et al. 2012). Auch der *knockout* von Raptor, einer wichtigen regulatorischen Komponente der mTOR Kinase im mTORC1-Komplex, ruft in den Mäusen eine Proteinurie und progressive Glomerulosklerose hervor. Diese Effekte der pathologischen Podozytenfunktion werden durch den zusätzlichen *knockout* von Rictor, einer weiteren regulatorischen Komponente der mTOR-Kinase im sog. mTORC2-Komplex, verstärkt (Gödel et al. 2011). Außerdem spielt mTOR durch seine Regulation der Autophagozytose, welche für postmitotische Zellen wie Podozyten von besonderer Bedeutung ist, eine wichtige Rolle. Wenn mTOR aktiv ist, wird die Autophagozytose negativ reguliert. Es wird vermutet, dass eine zu starke negative Regulierung der Autophagozytose zu Podozytenschädigung und progressiven glomerulären Krankheiten wie z.B. der diabetischen Nephropathie führt (Weide und Huber 2011). Speziell für Podozyten wird sogar das Vorhandensein zellulärer Strukturen diskutiert, die ermöglichen, dass katabole und anabole Vorgänge parallel ablaufen können. Diese Strukturen werden als TASC-Komplex (engl.: *TOR-autophagy spatial coupling compartment*) bezeichnet (Narita et al. 2011).

1.6 Zielsetzung

Bisher unveröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe von Prof. Pavenstädt zeigen, dass Mäuse, denen Rab7 in den Podozyten fehlt, eine starke Proteinurie entwickeln und gravierende morphologische Veränderungen der Schlitzmembran-Architektur aufweisen. Diese *in vivo* Daten sind ein klarer Hinweis dafür, dass endolysosomale- und damit Rab7-abhängige Transportprozesse für Nierenerkrankungen mögliche Pathogenitätsfaktoren darstellen könnten.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, die zugrundeliegenden Mechanismen des Rab7-Phänotyps in Zellkultur-Modellen (*in vitro*) genauer zu analysieren. Hierfür sollten

stabile Zelllinien etabliert werden, die mehr auf die verschiedenen Rab7-Aktivitätslevel und nicht auf den kompletten Verlust von Rab7 abzielen. Anhand dieser Zelllinien sollte anschließend geklärt werden, wie sich Veränderungen der Rab7-Aktivität auf den für Podozyten wichtigen mTOR-Signalweg auswirken.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Analysegerät von Chemilumineszenz-Signalen	Lumi-Imager F1	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
	FluorChem® FC2	Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, USA
Autoklav	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
Brutschrank	B5050	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Lötmeister 3000	CFH Löt-und Gasgeräte GmbH, Offenau
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen Isernhagen, Deutschland
Elektrophorese-Apparatur (für Agarosegele)		Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophorese-Apparatur (für SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Cell for Mini precast gels	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Filmentwickler	Optimax X-ray Film Processor	PROTEC GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Inkubations-Schüttelschrank	Certomat® IS	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Mikroskop	Observer Z1, Apotome, HXP120, Axiocam MRm	Zeiss AG, Jena
Mikrotiterplatten-Reader	Infinite® M200	Tecan Trading AG, Männedorf
PCR-Cycler	GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Photometer	Smart Spec™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reinstwassersystem	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Sicherheitswerkbank für Zellkultur	HERAsafe	Heraeus, Hanau
	BIOWIZARD Silver Line	Kojair Tech oy, Vilpulla, Finnland

Stromversorgung (für Western Blot und Elektrophoresen)	Power Pac HC™ Standard Power Pack 25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge	Profuge™ 10K	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
UV Transilluminator	IL-200-M	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Vortexer	VortexGenie2	Scientific Industries, Inc. New York, USA
Waagen	Scout™ Pro Explorer® Pro	Ohaus, New Jersey, USA
Wasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Western Blot Apparatur	Semidry Transfercell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkultur-Incubator	Heracell 240 MCO-20AIC	Heraeus, Hanau Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
Zentrifugen	Mikro 200 R Allegra™ X-22R Multifuge 3S-R Megafuge 1.0R	Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen Beckman Coulter GmbH, Krefeld Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau

2.2 Laborbedarf

Tabelle 2: Laborbedarf

Name	Hersteller
1 kb DNA Marker	Promega GmbH, Mannheim
6 x Blue Orange Loading Dye Lösung	Promega GmbH, Mannheim
Cryoröhrchen	Nunc A/S, Roskilde, DK
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Deckgläschen	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
DMEM	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
EBSS Medium	Biochrom AG, Berlin
ECL-X-Ray Filme	Fuji Foto Film GmbH, Düsseldorf

Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Handschuhe (Latex/Nitril)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kälberserum mit Eisenzusatz (Cs/Fe)	Cell Concepts GmbH, Umkirch
Kanülen, 0,4 mm Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Lumi-Light/Lumi-LightPLUS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mikrotiterplatten, Greiner 96 Well polysterene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Mikrotiterplatten, Thermo Scientific™ Weiße 96-Well-Platten	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Objektträger	VWR International GmbH, Darmstadt
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Marker	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
PBS, 1x, steril	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PCR-Reaktionsgefäße	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Polyvenyldifluorid (PVDF)-Immobilon Membran (0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
Reaktionsgefäße (Safe lock) 0,5-2,0 mL	Eppendorf, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Röhrchen für Bakterienkulturen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
RPMI Medium	Biochrom AG, Berlin
Schalen für Bakterienkulturen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Schalen/Flaschen für Zellkultur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Skalpelle	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterilfilter (0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
Stripetten	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Trypsin EDTA (10x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Western Blot Papier	Whatman Schleicher & Schüll GmbH, Dassen
Zentrifugationsröhrchen (15 mL, 50 mL)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Standort
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ammoniumchloride (NH₄Cl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bafilomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampicillin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Doxycyclin hyclate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/mL)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycerin (Glycerol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hepes	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kalziumchlorid (CaCl₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Methanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen

Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA) 4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polybrene	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rinderalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>, BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.4 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 4: Lösungen, Medien und Puffer

Name	Inhalt
LB Agarplatten	LB-Medium 20 g/L Agar,
- mit Ampicillin	- Verwendung von LB-Amp
- mit Kanamycin	- Verwendung von LB-Kan
LB Medium	20 g/L LB-Broth ad H ₂ O
- mit Ampicillin	- 1 mL/L Amp
- mit Kanamycin	- 350 µL/L Kan
10x CutSmart® New England Bio Labs	0,05M CH ₃ CO ₂ K 0,02M C ₄ H ₁₁ NO ₃ 0,01M C ₄ H ₈ MgO ₄ 100µg/ml BSA pH 7.9 bei 25°C
HEBS Puffer (2x)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 12 mM Glucose ad H ₂ O, pH 7.05
IF Antikörper Lösung	98 % (v/v) IF Waschpuffer 2 % (v/v) normal goat serum (NGS)

IF Block Lösung	90 % (v/v) IF Waschpuffer 10 % (v/v) normal goat serum (NGS)
IF Permeabilisierungs-Lösung	10 % (v/v) 10 x PBS 0,2 % (v/v) Triton X-100 ad H ₂ O
IF Wasch Lösung	0,2 % Gelantine (w/v) ad IF Permeabilisierungs-Lösung
SDS-Probenpuffer	20 % (v/v) Glycerin 125 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenol-Blau 5 % β-Mercaptoethanol ad H ₂ O
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 0,05 % (w/v) SDS 0,2 M Glycin ad H ₂ O
Lysis-Puffer	50 mM Hepes (1M) 150 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 10 % (v/v) Glycerin 1 % (v/v) Triton X-100 ad H ₂ O
10x PBS	0,038M NaH ₂ PO ₄ 0,162M Na ₂ HPO ₄ 1,5M NaCl ad H ₂ O pH 7,4
Mild Stripping-Puffer	15 g Glycin 1 g SDS 10 mL Tween 20 pH einstellen auf 2,2 ad 1l mit H ₂ O
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA-Na ₂ Salz 40 mM Essigsäure Ad H ₂ O, pH 8,2
TBS	50 mM Tris 150 mM NaCl ad 800 mL mit H ₂ O, pH 7,5
TBST	10 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1l mit H ₂ O
Transfer-Puffer	25 mM Tris (1M Stammlösung pH 8,3) 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol ad H ₂ O

Tris/HCl (1M)	121.14 g Tris ad 1l mit H ₂ O pH 7,4 (HCl)
----------------------	---

2.5 Enzyme

Tabelle 5: Enzyme

Name	Hersteller
Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gateway® LR Clonase® Enzym Mix	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Proteinase K	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pac I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Asc I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Pst I	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Hind III	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
T4 DNA Ligase und Buffer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Accuprime™ Pfx DNA Polymerase	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.6 Primer

Tabelle 6: Primer

Primer	Sequenz (5'-3')
M13 forward	gtaaaacgacggccag
M13 reverse	caggaaacagctatgac

2.7 Plasmide und Vektoren

Tabelle 7: Plasmide und Vektoren

Name	Beschreibung; Resistenz	Hersteller
pINDUCER21-Puromycin (#967)	Doxycyclin induzierbarer lentiviraler Genexpressionsvektor mit Puromycin-Resistenzgen; Ampicillin Resistenz	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
pENTR™ EGFP-Rab9 S21N_del_AscI-beh.insert (#963)	pENTR™; Kanamycin Resistenz	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
Rab7 T22N Homo sapiens (#1216)	Dauerinaktive Form von Rab7, markiert mit pRFP C2	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

Rab7 Q68L Homo sapiens (#1217)	Daueraktive Form von Rab7, markiert mit pRFP C2	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
pENTR™/D-TOPO® Rab7 EGFP T22N	<i>Entry</i> -Vektor mit Rab7 in dauerinaktiver Form für Gateway® Klonierungen	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster (selbst erstellt)
pENTR™/D-TOPO® Rab7 EGFP Q68L	<i>Entry</i> -Vektor mit Rab7 in daueraktiver Form für Gateway® Klonierungen	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster (selbst erstellt)
pIND21-Puro-ApoL2-FL (#1210)	pINDUCER Plasmid als Vergleich im diagnostischen Verdau von Rab7 pINDUCER Plasmiden	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
pIND21-Puro-Rab7_T22N (#1272)	pINDUCER Plasmid zur Herstellung einer stabilen Zelllinie mit induzierbar dauerinaktiver Form von Rab7	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster (selbst erstellt)
pIND21-Puro-Rab7_Q67L (#1273)	pINDUCER Plasmid zur Herstellung einer stabilen Zelllinie mit induzierbar daueraktiver Form von Rab7	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster (selbst erstellt)
psPAx2 (#89)	Kodiert für Virusverpackung der DNA, Einsatz bei der lentiviralen Transduktion	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
pMD2-VSVG (#92)	Kodiert für die Virushülle, Einsatz bei der lentiviralen Transduktion	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

2.8 Primäre Antikörper

Tabelle 8: Primäre Antikörper

Zielprotein	Hersteller	Herstellungsmodell	Verdünnung
Aktin	Sigma	Kaninchen	1 : 2000 (WB)
Cathepsin D	Santa Cruz	Ziege	1 : 500 (WB)
Lamp2	Santa Cruz	Maus	1 : 500 (WB) 1 : 100 (IF)
LC3	Novus biologicals	Kaninchen	1 : 4000 (WB) 1 : 200 (IF)
Rab7	abcam	Maus	1 : 1000 (WB)
Phospho-p70 S6 Kinase	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1 : 1000 (WB)
Phospho-S6	Cell Signaling	Kaninchen	1 : 1000 (WB)

Ribosomal Protein (Ser 235/236)	Technology		
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser 240/244)	Cell Signaling Technology	Kaninchen	1 : 1000 (WB)

2.9 Sekundäre Antikörper

Tabelle 9: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Herstellungsmodell	Verdünnung
HRP-konjugiertes anti-Maus IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., England	Ziege	1 : 2000
HRP-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., England	Ziege	1 : 2000
HRP-konjugiertes anti-Ziege IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., England	Esel	1 : 2000
Alexa Fluor® 647-konjugiertes anti-Maus IgG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	Ziege	1 : 1000
Alexa Fluor® 647-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	Ziege	1 : 1000
Alexa Fluor® 594-konjugiertes anti-Maus IgG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	Ziege	1 : 1000
Alexa Fluor® 594-konjugiertes anti-Kaninchen IgG	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	Ziege	1 : 1000

2.10 Bakterien

Tabelle 10: Bakterien

Spezies	Genotyp	Hersteller
DH10B	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15ΔlacX74endA1recA1deoR Δ(ara,leu)7697araD139galUgalKnpGrpsLλ	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.11 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 11: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Bedingungen	Herkunft
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	37 °C, 5 % CO ₂	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
AB8	Humane Podozytenzelllinie	33 °C, 5 % CO ₂	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster
AB8	Humane Podozytenzelllinie (ausdifferenzierend)	37 °C, 5 % CO ₂	AG Pavenstädt, Universitätsklinikum Münster

2.12 Kommerzielle Kits

Tabelle 12: Kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
Zyppi™ Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, USA

2.13 Software

Tabelle 13: Software

Programmname	Hersteller
Axiovision 4.8	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH© 2006-2009
BLAST (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>) http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
CHROMAS Lite Version 2.01	Conor McCarthy© 1998-2005
CorelDRAW Graphics Suite X6	Corel Corporation© 2012
GraphPad Prism 5	GraphPad Software© 2010
Image J	MacBiophotonics Facility© 1993-2006
Microsoft Office 2007	Microsoft Cooperation© 2007
PubMed (<i>U.S. National Library of Medicine/ National Institutes of Health</i>) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	NCBI

3 Methoden

3.1 Methoden der Mikrobiologie

3.1.1 Transformation von Bakterien

Transformation ist die Aufnahme freier DNA in Bakterien. Dies ist nützlich, wenn man z.B. einen Ligationsansatz vervielfältigen will. In dieser Arbeit wird in *E.coli* (DH10B) Stämme transformiert, die durch Behandlung mit CaCl_2 kompetent gemacht wurden. Ein Aliquot der Bakterien (ca. 100 μL) wird auf Eis aufgetaut und mit dem zu transformierenden Plasmid vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wird die Suspension einem einminütigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und anschließend weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es werden 200 μL LB-Medium hinzugefügt. Dieser Ansatz wird eine Stunde bei 37 °C in einem Bakterienrüttler bei 700 UpM inkubiert und anschließend auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausplattiert. Über Nacht werden die Platten bei 37 °C bebrütet.

3.1.2 Plasmid-DNA Isolierung

Um DNA-Plasmide zu isolieren, werden Kolonien von einer LB-Agar-Platte gepickt und in flüssiges LB-Medium gegeben. Durch Zugabe von Antibiotika in das LB-Medium werden Plasmide mit bekannter Resistenz selektioniert. Die Ansätze werden anschließend über Nacht bei 37 °C und 200 UpM inkubiert. Bei besonders großen Plasmiden, wie z.B. dem pINDUCER21 (3.5), wird eine niedrigere Temperatur von 30 °C gewählt, um durch langsames Wachstum die Fehlerrate bei der Replikation zu vermindern.

Mithilfe des Zyppi™ Plasmid Miniprep Kit werden aus der Bakteriensuspension die Plasmide isoliert. Zur Gewinnung größerer Mengen an DNA wird das PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit genutzt. Beide Kits werden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration einer Probe ist zur Weiterverarbeitung von isolierten DNA-Plasmiden oft von Bedeutung. Anhand der Absorption bei 260 nm Wellenlänge wird die Konzentration mit einem Photometer bestimmt.

Die zusätzliche Ermittlung des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der Probe zu. Bei maximaler Reinheit von DNA beträgt das Verhältnis 1,8. Niedrigere Werten deuten auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen hin.

3.2.2 Klonierung von DNA

Ziel der Klonierung ist die identische Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Es erfolgt ein Transfer von einem Genfragment in einen Vektor. Dazu werden das gewünschte Genfragment und der Vektor, in den es integriert werden soll, zunächst mit Restriktionsenzymen geschnitten. Hierbei entstehen komplementäre Enden in Genfragment und Zielvektor, die miteinander hybridisieren. Anschließend erfolgt eine kovalente Verknüpfung der Enden, katalysiert durch das Enzym Ligase.

3.2.2.1 Restriktionsenzymverdau der DNA

Zur Restriktion der Vektoren werden 8,5 µL DNA mit 1 µL Enzym und 2 µL des passenden Puffers zusammengegeben und auf ein Gesamtvolumen von 20 µL mit H₂O aufgefüllt. Der Puffer wird nach Angaben des Herstellers der Enzyme gewählt. Die Ansätze werden zwei bis drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch anschließendes Auftragen auf ein Agarosegel wird die Größe der entstandenen DNA-Fragmente überprüft.

Neben der Klonierung kommt der Restriktionsenzymverdau auch diagnostisch zur Überprüfung der aufgearbeiteten DNA zum Einsatz.

3.2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die restringierten Plasmide werden in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Aufgrund der negativ geladenen Zuckerketten wandert die DNA nach Anlegen einer elektrischen Spannung von 80-100 Volt in Richtung der Anode. Je nach Größe des DNA-Fragments wählt man die Agarosekonzentration. Bei höherer Agarosemenge wird das Netzwerk dichter, sodass größere Genfragmente stärker zurückgehalten werden als kleinere. In dieser Arbeit werden ab einer aufzutrennenden Fragmentgröße von ca. 500 Basenpaaren zweiprozentige Agarosegele eingesetzt.

Dem flüssigen Gel wird Ethidiumbromid hinzugefügt, welches die DNA mit UV-Licht sichtbar macht. Eine parallel aufgetragene, 1 kB DNA-ladder ermöglicht die Bestimmung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente.

3.2.2.3 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Die fluoreszierenden DNA-Banden werden mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass die DNA nur möglichst kurz dem UV-Licht ausgesetzt wird, um Mutationen zu vermeiden. Anschließend werden die DNA-Fragmente mit dem Zymoclean™ DNA recovery set nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die aufgereinigte DNA kann dann z.B. für eine Ligation eingesetzt werden.

3.2.2.4 Ligation von DNA

Unter der Ligation von DNA versteht man die Verknüpfung freier DNA-Enden unter Bildung einer Phosphodiesterbindung. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Ligase. Mithilfe dieser Methode wird ein Insekt in den gewünschten Vektor integriert. Hierbei ist zu beachten, dass Insekt und Vektor in einem molaren Verhältnis von 3:1 vorliegen sollten. In dieser Arbeit werden die T4-Ligase und der T4-Ligase-Puffer von Thermo Scientific™ verwendet. Der Ansatz wird eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.3 Gateway® -Klonierungen

Eine weitere Möglichkeit zur Klonierung ist der Transfer von DNA-Abschnitten mit dem Gateway®-System von Invitrogen™. Mittels eines Enzymmixes wird das zu transferierende Gen aus dem *entry*-Vektor (pENTR™) geschnitten (Exzisionasefunktion) und anschließend in den Akzeptorvektor integriert (Integrasefunktion). Die Erkennung läuft über sog. *attL-sites* im *entry*-Klon und *attR-sites* im Zielvektor. In dieser Arbeit wird das Gateway™-System zur Herstellung der pINDUCER21-Konstrukte verwendet.

Zur Durchführung der Klonierung werden jeweils 150 ng des *entry*- und *destination* Vektors zusammengegeben und mit TE-Puffer (pH 8,0) auf 4 µL aufgefüllt. Zu der Probe wird 1 µL LR-Clonase™-II-enzyme mix gegeben. Es folgt eine Inkubationsphase von vier Stunden bei 25 °C, die durch die Zugabe von 0,5 µL Proteinase K gestoppt wird. Daraufhin wird die Reaktion weitere zehn Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Konstrukt wird anschließend in *E.coli* transformiert (3.1.1).

3.2.4 Sequenzierung

Die Sequenz aufgereinigter Plasmide wird mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger bestimmt. Für die Sequenzierung werden 150 ng Plasmid-DNA, 1 µL Sequenzier-

Primer, 2 µL BigDye-Puffer (5x) und 1 µL BigDye 3.1 Mix zusammenpipettiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µL aufgefüllt. In einem Thermocycler wird anschließend eine PCR mit folgenden Zyklen durchgeführt:

Tabelle 14: PCR Zyklus

Temperatur	Zeit	Wiederholung
95 °C	2 min	1x
95 °C	15 sec	30x
50 °C	15 sec	30x
60 °C	4 min	30x

Nach Beendigung der PCR wird jeweils 10 µL H₂O zu den Proben hinzugefügt. Zur Analyse werden die Proben in das Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster gebracht.

3.3 Methoden der Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien

In dieser Arbeit werden HEK 293T- und AB8-Zelllinien genutzt, die unter folgenden Bedingungen kultiviert werden:

Tabelle 15: Kultivierungsbedingungen der Zelllinien

Zelllinie	Bedingungen	Medium
HEK 293T	37 °C, 5 % CO ₂	DMEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
AB8 humane Podozyten (proliferierend)	33 °C, 5 % CO ₂	RPMI 1640 10 % FCS
AB8 humane Podozyten (differenzierend)	37 °C, 5 % CO ₂	1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Supplement

Die Zelllinien werden in Schalen mit 10 cm Durchmesser bis zu einer Konfluenz von 80–90 % gehalten. Alle zwei bis drei Tage wird das Medium ausgetauscht, um den Zellen ausreichend Nährstoffe zur Verfügung zu stellen.

Zur Subkultivierung der Zellen werden die humanen Podozytenzelllinien zunächst mit 700 µL Trypsin von der Oberfläche gelöst. Die Zugabe von 9 mL Medium stoppt die Reaktion des Trypsins. Anschließend wird in der Regel ein Drittel der Zellsuspension in eine neue Kulturschale überführt. Die HEK 293T-Zellen zeigen eine deutlich geringere Oberflächenadhärenz, sodass sie lediglich durch Auf- und Abpipettieren von der Schale gelöst werden. Hier wird ca. ein Zehntel der Zellsuspension in eine neue Kulturschale überführt.

3.3.2 Transiente Transfektion

Als transiente Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Im Gegensatz zur Erstellung stabiler Zelllinien wird die DNA bei dieser Methode nicht fest in das Genom integriert. Die Auswirkungen der transienten Überexpression der eingeschleusten Proteine oder Mutanten können in Immunpräzipitat- oder Western Blot-Untersuchungen analysiert werden.

Die transiente Transfektion erfolgt mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Dazu werden die Zellen in 10 cm(Ø)-Schalen bis zu einer Konfluenz von 50-70 % kultiviert. 10 µg der gewünschten Plasmid-DNA werden mit 500 µL Calciumchlorid zusammengegeben und vermischt. Unter permanentem Schütteln (Vortexer) tröpfelt man anschließend 500 µL HEBS-Puffer (2x) hinzu. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Mischung auf die Zellen gegeben. Das Transfektionsmedium bleibt sechs bis acht Stunden auf den Zellen, dann wird es durch normales Wachstumsmedium ersetzt. Nach weiteren 16–40 Stunden werden die Zellen aufgearbeitet.

3.3.3 Generierung von stabilen Zelllinien

In dieser Arbeit wird die lentivirale Transduktion genutzt, um stabile, induzierbare Zelllinien herzustellen. Zum einen soll die aktive, membran-assoziierte Form von Rab7 hochreguliert werden und zum anderen die inaktive, zytoplasmatisch-lokalisierte Form. Dazu werden die zu transduzierenden DNA-Konstrukte pINDUCER21-Rab7 T22N und pINDUCER21-Rab7 Q67L zusammen mit Plasmiden für Virusproduktion durch Calciumphosphat Präzipitation in HEK 293T-Zellen eingebracht. Die HEK-Zellen werden am Vortag in T75 Kulturflaschen überführt und so gespalten, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von 50-70 % aufweisen. Am Morgen des Folgetags werden jeweils 10 µg der pINDUCER21-Plasmide mit 6,5 µg psPAX2 (kodiert für die Virusverpackung der DNA) und 3,5 µg pMD2-VSVG (kodiert für die Virushülle)

zusammengegeben und transient in die HEK 293T-Zellen transfiziert (3.3.2). Das genetische Material zur Erstellung des Virus ist aus Sicherheitsgründen auf zwei unterschiedliche Plasmide aufgeteilt und wichtige Informationen wurden entfernt, sodass sich das Virus in den Zielzellen nicht repliziert.

Sind sowohl die zu übermittelnde DNA-Sequenz, als auch alle für die Virusproduktion nötigen genetischen Informationen in der Zelle vorhanden, wird das Virus produziert und in das Medium sekretiert.

Nach 72 Stunden bei 37 °C wird der virushaltige Überstand abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Zum Filtrat werden zur Steigerung der Infektionsrate 0,8 µL/mL Polybrene hinzugefügt. Das virushaltige Medium wird im Verhältnis 1:1 mit frischem Medium kombiniert und auf die Zielzellen gegeben (AB8 und HEK 293T). Die Reste des Virusmediums werden sicher verpackt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Zielzellen werden bei 37 °C (HEK 293T) bzw. 33 °C (AB8) über 24 Stunden mit dem virushaltigen Medium inkubiert. Danach beginnt die erste Regenerationsphase. Es erfolgt eine Waschung mit PBS und das virushaltige Medium wird durch normales ersetzt. Nach der 24-stündigen Regenerationsphase erfolgt ein zweiter Infektionszyklus nach dem bereits beschriebenen Schema.

Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt unter Zugabe von 4 µg/mL Puromycin für HEK 293T-Zellen und 2 µg/mL für AB8-Zellen. Darüber werden die pINDUCER21-Zellen mit der Puromycin-Resistenzkassette selektioniert. Als Kontrolle werden zusätzlich nicht transduzierte Zellen der beiden Zelllinien kultiviert, die unter Zugabe von Puromycin absterben. Nach zweimaligem Transfer der Zellen in neue Kulturschalen sind diese auf die niedrigere Sicherheitsstufe S1 herabgesetzt und können mit Doxycyclin induziert werden (3.5).

3.3.4 Herstellung von Zelllysaten

Die Herstellung von Zelllysaten dient der späteren Untersuchung von Proteinen in Western Blots oder Immunpräzipitaten. Hierfür werden die Zellen in 6-well Schalen kultiviert. Nach Absaugen des Nährmediums werden die Zellen mit 1 mL PBS-Puffer (10x) gewaschen. Der Puffer wird einige Male über die Zellen geschwenkt und im Anschluss direkt wieder entfernt. Je nach Dichte werden die Zellen nun mit 200-600 µL SDS-Probenpuffer (1x) versehen und für eine Stunde bei 100 UpM geschüttelt. Anschließend werden die Zellen durch mehrmaliges aufziehen in die Pipettenspitze vereinzelt und in 1,5 mL Eppendorf Gefäße überführt. Die

Zellsuspension wird fünf Minuten im Ultraschall gebadet und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Vor dem Auftragen in das SDS-Gel werden die Proben fünf Minuten bei 95 °C gekocht. Dadurch destabilisiert die Zellmembran und die Wasserstoffbrückenbindungen werden aufgebrochen, sodass die Proteine in Primärstruktur vorliegen. Das im Probenpuffer enthaltene SDS ummantelt die Aminosäureketten, sodass die Aminosäuren eine einheitliche negative Ladung aufweisen, die ungefähr proportional zur Größe der Proteine ist. Die Proteine in den Proben können mit der SDS-PAGE (3.4.1) aufgetrennt werden.

3.3.5 Einfrieren von Zellen

Um transduzierte Zelllinien längerfristig zu lagern und um im Falle von Kontaminationen über eine Reserve zu verfügen, werden Zellen eingefroren.

Bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % werden die Zellen auf 10 cm(Ø)-Schalen kultiviert. Anschließend werden sie in frischem Medium aufgenommen und fünf Minuten bei 1000 UpM zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit PBS gewaschen und erneut fünf Minuten zentrifugiert. Nun werden die Zellen mit Gefriermedium (10 % DMSO) vermischt und in Kryoröhrchen überführt. Über Nacht werden die Röhrchen zunächst bei -20 °C gelagert, dann sechs Stunden bei -80 °C und letztendlich bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.3.6 Bestimmung der Zellviabilität

Die Anzahl lebender Zellen kann mit dem RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay kontinuierlich über bis zu 72 Stunden bestimmt werden. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen in Neubauer Zählkammern ausgezählt und soweit verdünnt bis sich 5.000-50.000 Zellen in 100 µL befinden. Diese werden auf 96 well Platten mit weißem Boden ausgesät. In einer Konzentration von 1:500 werden das Luciferase-Enzym und Luciferase-Prosubstrat in aufgewärmtes Medium gegeben und je 100 µL auf die Zellen gegeben. Lebende Zellen reduzieren das Prosubstrat zu einem Substrat, dass von dem Luciferase-Enzym zu Lumineszenzsignalen verarbeitet wird. Die Signale werden zu definierten Zeitpunkten am Tecan-Gerät gemessen.

3.4 Methoden der Proteinbiochemie

3.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) trennt Proteine ihrer Länge nach auf. Damit werden aus Zellkulturen gewonnene Lysate (3.3.4) auf das Vorhandensein von Proteinen untersucht und deren Konzentration bestimmt.

Die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese besteht aus einem Sammelgel (5 %) und einem Trenngel (8-15 %), die wie in der Tabelle 16 dargestellt zusammengesetzt werden.

Das pH-neutrale Sammelgel kann von den Proteinen leicht durchwandert werden. Es sorgt dafür, dass die Proteine konzentriert werden, bevor sie in das basische, engmaschigere Trenngel eintreten. Dort erfolgt die eigentliche Auftrennung nach der Größe der Proteine. Das Sammelgel passieren die Proben bei 150 Volt, dann wird der Strom auf 200 Volt für die Passage des Trenngels heraufgesetzt. Sobald die ersten Proben das Trenngel verlassen, wird der Vorgang beendet. Als Marker werden 3 µL des Page Ruler™-Protein-Marker aufgetragen.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Polyacrylamidelektrophorese-Gele

Reagenz	Sammelgel 5 % Volumina [mL] (2 ml)	Trenngel 10 % Volumina [mL] (8 ml)
dH ₂ O	1,4	3,2
Acrylamid	0,33	2,7
Rotiphorese® 30 %		
1,5 M Tris pH 8,8	-	2,0
1 M Tris pH 6,8	0,25	-
SDS	0,02	0,08
APS	0,02	0,08
TEMED	0,002	0,003

3.4.2 Western Blot

Die Western Blot-Analyse ermöglicht die immunologische Detektion der Proteine, die zuvor mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden.

In dieser Arbeit wird das *semi dry*-Verfahren angewandt. Dazu wird eine PVDF-Membran eine Minute in Methanol aktiviert und vier Lagen Whatman-Filterpapier

in Transferpuffer getränkt. Ausgehend von der Anode der Blotkammer schichtet man zwei Lagen Filterpapier, die PVDF-Membran, das Acrylamidgel und weitere zwei Lagen Filterpapier übereinander. Anschließend werden Luftblasen, die sich eventuell zwischen den Schichten befinden, ausgestrichen. Nach dem Verschluss der Blotkammer, beginnt der 90-minütige Proteintransfer mit Anlegen einer Spannung, die auf einen Stromfluss von 1-1.2 mA/cm² Gel begrenzt ist, was 72 mA pro Membran entspricht. Die negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld vom Gel in Richtung der Membran, in der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert werden. Ist der Transfer beendet, wird die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur und 80 UpM in Blocklösung geblockt. Diese setzt sich je nach Antikörper aus TBS-T Puffer mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA zusammen und soll unspezifische Bindungen an die PVDF-Membran verhindern.

Die Membran wird je nach Größe der Proteine, die detektiert werden sollen, in Streifen geschnitten. Diese werden bei Raumtemperatur über Nacht oder bei 37 °C für zwei Stunden mit dem ersten Antikörper behandelt, der in Blocklösung verdünnt wird. Im Anschluss an die Inkubation mit dem primären Antikörper, werden die Membranstreifen jeweils drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T bei 80 UpM gewaschen. Es folgt die Zugabe des Sekundäntikörpers, der in Blocklösung verdünnt für eine Stunde bei Raumtemperatur und 80 UpM auf die Membranstreifen gegeben wird. Die drei Waschschriffe werden wiederholt. Zum Abschluss werden die Streifen mit Lumi-Light® oder Lumi-Light®PLUS nach Angaben des Herstellers behandelt, woraufhin die Lumineszenz durch Exposition mit einem Röntgenfilm oder unter Verwendung eines Lumineszenzimagers sichtbar gemacht wird.

Soll die Membran erneut zur Immunodetektion mit anderen Antikörpern eingesetzt werden, können die alten Antikörper durch „strippen“ von der Membran entfernt werden. Dazu werden sie 30 Minuten bei 37 °C in *mild stripping*-Puffer inkubiert und anschließend fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Die Membran kann danach wieder geblockt und mit neuen Antikörpern inkubiert werden.

3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Durch die Betrachtung immunologisch gefärbter Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop kann die Lokalisation von Proteinen untersucht werden. Ähnlich wie beim Western Blot werden die Zellen zunächst mit spezifischen Primäntikörpern markiert, an die wiederum Fluorophor-gekoppelte Sekundäntikörper binden. Darüber hinaus kann man die Expression rekombinanter Proteine mit Eigenfluoreszenz wie z.B. *eGFP* unter dem Fluoreszenzmikroskop detektieren.

Die zu untersuchenden Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 80 % auf Deckgläschen kultiviert, mit PBS gewaschen und anschließend 20 Minuten bei RT mit 4 %-igen Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA wird durch dreimal 5-minütiges Waschen mit PBS wieder entfernt. Die Zugabe von NH_4Cl [50 mM] für 10 Minuten stoppt die Fixierung. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit TritonX-100 (0,2 % in 1x PBS) 5 Minuten permeabilisiert. Es folgen drei weitere Waschschritte bevor die Zellen 20 Minuten in Blockierlösung inkubiert werden, um reaktive Oberflächen zu blockieren. Anschließend werden die Zellen für mindestens 60 Minuten (alternativ über Nacht in einer feuchten Kammer) mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach drei 5-minütigen Waschgängen in PBS erfolgt die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000) und dem Kernfärbungsmarker DAPI (Verdünnung 1:5000). Die Zellen werden ein letztes Mal in PBS gewaschen (3x 5 Minuten) und die Deckgläschen in Aqua bidest gebadet. Im Anschluss wird 10 μL Mowiol auf den Objektträger gegeben und das Deckgläschen vorsichtig mit den Zellen nach unten aufgelegt.

Nachdem das Mowiol ausgehärtet ist (über Nacht bei 4 °C oder 10 Minuten bei 37 °C), können die immunologisch gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.5 Das pINDUCER21-Puro-System

Zu Herstellung von stabilen Zelllinien mit induzierbaren Rab7-Aktivitätslevels wird das pINDUCER21-Puro-System eingesetzt. Dieses ermöglicht in einer Zellpopulation die einheitliche Expression einer zu untersuchende cDNA durch Doxyzyklin-Stimulation (Meerbrey et al. 2011). In der Arbeitsgruppe von Prof. Pavenstädt wurde der pINDUCER21(ORF-EG)-Vektor von Meerbrey et al. modifiziert, indem anstelle von *eGFP* eine Puromycin-Resistenzkassette eingesetzt wurde (Abb. 4) (Schulze et al. 2014).

Vermittelt durch eine IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) wird die Puromycin-Kassette von dem konstitutiv exprimierenden EF1- α Promotor reguliert. Dieser ist gleichzeitig für die Expression des Transaktivators rtTA3 (*reverse tetracycline transactivator 3*) zuständig. Der Transaktivator rtTA3 spielt eine wichtige Rolle für die induzierbare Expression der eingebrachten cDNA. Zusammen mit Doxycyclin als Koaktivator stimuliert er den Promotor TRE2 (*tetracyclin responsive element 2*), der der Genkassette mit der cDNA vorgeschaltet ist und sie somit aktiviert. Folglich kann über

Doxycyclin-Gabe die Genexpression kontrolliert werden. Dies ermöglicht Effekte zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen derselben Zelllinie zu vergleichen. In dieser Arbeit werden das pINDUCER-Rab7 T22N- und pINDUCER-Rab7Q67L-Plasmid durch lentivirale Transduktion stabil in HEK 293T-Zellen und AB8-Zellen (humane Podozyten) integriert. Die Puromycin-Resistenzkassette selektiert die erfolgreich transduzierten Zellen.

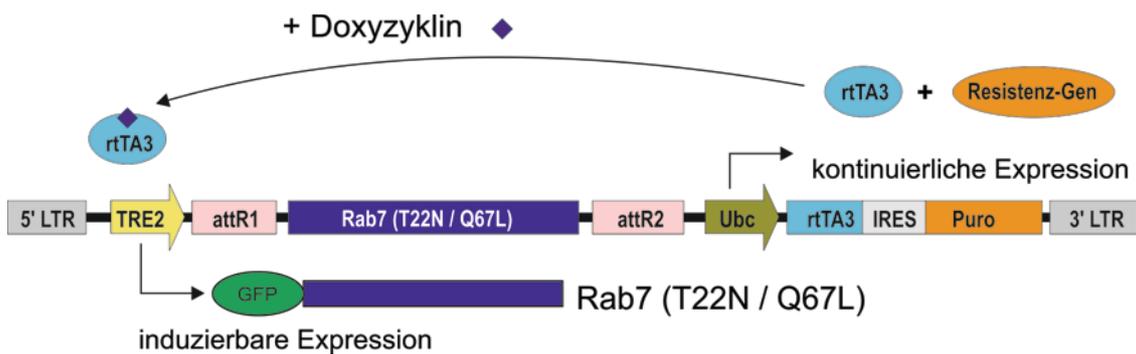


Abbildung 4: Der pINDUCER21-Puro-Vektor

Schematische Darstellung der funktionellen Einheiten des in der AG Pavenstädt geänderten pINDUCER21-Puro-Vektors, der Doxycyclin-abhängig die Expression eingebrachter cDNA (in dieser Arbeit von Rab7-Mutanten) ermöglicht. attR1/2 = recombination sites für Gateway Klonierungen; EF1- α = elongation factor 1 alpha; GFP = green fluorescent protein; IRES = interne ribosomale Eintrittsstelle; LTR = long terminal repeats; Puro = Puromycin-Resistenz Kassette; rTA3 = reverse tetracycline transactivator 3; TRE2 = Tetracyclin response element 2, Promoter; Ubc = Ubiquitin c Promotor (Abbildung geändert nach Meerbrey et al. 2011)

4 Ergebnisse

4.1 Generierung von Zelllinien zur induzierbaren Verschiebung der Rab7-Aktivität

Um die Bedeutung des Aktivitätslevels von Rab7 zu untersuchen, wurden Zelllinien erstellt, in denen die Überexpression von einer daueraktiven- oder dauerinaktiven Mutante von Rab7 induziert werden kann. Die Rab7 T22N-Mutante kann nur noch GDP binden und liegt damit permanent in der inaktiven Konformation vor. Die Rab7 Q67L-Mutante hingegen ist GTPase-defizient und damit nicht mehr in der Lage, GTP zu GDP zu hydrolysieren. Diese Mutante ist damit daueraktiv.

Mit Hilfe des pINDUCER21-Puro-Systems (3.5) wurden Zelllinien generiert, die die Doxyzyklin-abhängige Expression von eGFP-Rab7 T22N bzw. Q67L ermöglichen.

Die AB8-Zellen stellen das derzeit beste humane Zellsystem für eine podozytäre Umgebung dar. Die HEK 293T-Zellen wurden als zellbiologisch etablierte Standardzellen zur Kontrolle ebenfalls transduziert. Über die Gabe von Doxyzyklin wurde die Überexpression der zu untersuchenden Rab7-Mutanten induziert.

4.1.1 Herstellung von pINDUCER-Expressionsvektoren

Um Zelllinien zu generieren, die eine induzierbare Expression von eGFP markiertem Rab7 T22N bzw. Rab7 Q67L zulassen, mussten zunächst pINDUCER21-Puro-Rab7 T22N und pINDUCER21-Puro-Rab7 Q67L Expressionsvektoren hergestellt werden. Dazu wurden die in der AG Pavenstädt bereits vorhandenen cDNA Konstrukte der Mutanten in ein pENTR-eGFP-Plasmid kloniert.

Das pENTR-Plasmid ist ein *entry*-Vektor des Gateway®-Klonierungssystems (3.2.3). Es ermöglicht, die pENTR-eGFP-Rab7 Plasmide in den Zielvektor, pINDUCER21-Puro, zu übertragen. Darüber lässt sich später in den Zellkulturen die Genexpression über die Gabe von Doxyzyklin regulieren. Aus dem in der AG Pavenstädt vorhandenen pENTR-eGFP-Rab9 Plasmid wurde das Rab9 cDNA *insert* mit *Ascl*/*Pacl* ausgeschnitten und durch die Rab7-Mutanten ersetzt. Die pENTR-Rab7 Plasmide wurden in *E.coli* DH10B amplifiziert (3.1.1) und anschließend mittels Restriktionsenzymverdau analysiert (3.2.2.1).

Die Abbildung 5 zeigt den Verdau der Plasmide mit *Ascl* und *PstI*. Die *PstI*-Schnittstelle ist spezifisch für das Rab7, wodurch ein Verbleib des Rab9 aus dem ursprünglichen pENTR-Plasmid ausgeschlossen werden konnte. Die entstandenen DNA-Banden aller Klone passten zu den Längen der Genfragmente 624 bp (*Rab7*) und ca. 3300 bp (pENTR). Um sicher zu gehen, dass auch die Basenreihenfolge korrekt ist, wurden

beide Vektoren anschließend sequenziert. Die Sequenzierungen bestätigten die gewünschten Mutationen und wiesen auch keine unerwünschten Mutationen auf.

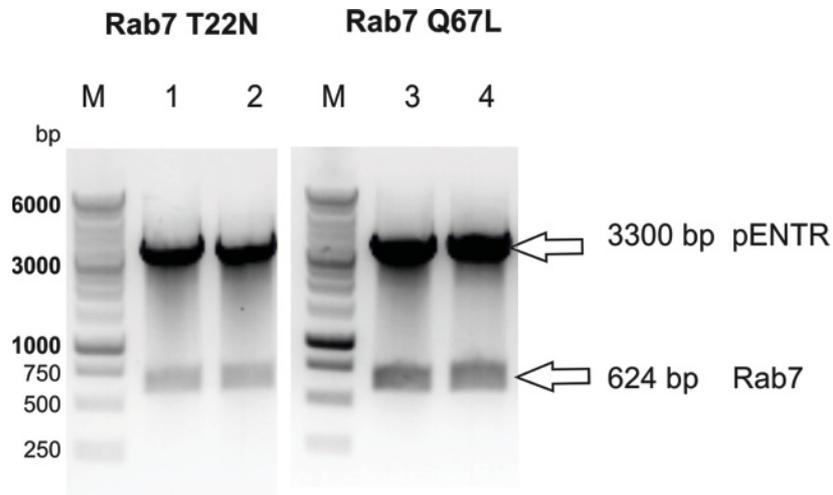


Abbildung 5: Restriktionsverdau des pENTR-eGFP Rab7 T22N und pENTR-eGFP Rab7 Q67L

Dargestellt ist die agarosegel-elektrophoretische Auftrennung von zwei Kolonien mit je 20 µl Restriktionsverdau von *AscI* und *PstI* geschnittenen pENTR-eGFP_Rab7 Plasmide. In der Spalte M sind jeweils 5 µl 1 kb DNA Größenstandard aufgetragen.

Die für eGFP-Rab7 T22N bzw. Rab7 Q67L kodierenden cDNA inserts der pENTR-eGFP-Rab7-Plasmide wurden daraufhin mit Hilfe des Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix in den pINDUCER21-Puromycin Vektor überführt- und durch Transformation in *E.coli* und anschließende Kultivierung vermehrt. Die Überprüfung der entsprechenden pINDUCER-Vektoren erfolgte mittels Restriktionsenzymverdau mit *HindIII* und *AscI/PacI*. Bei dem Verdau mit *HindIII* entstehen sieben Fragmente mit der Länge von 5092 bp, 3397 bp, 1055 bp, 819 bp, 556 bp, 577 bp und 397 bp, wobei die beiden Fragmente bei 556 bp und 577 bp in einer Bande zusammen erscheinen. Im Verdau mit *AscI/PacI* wird das Rab7 aus dem Plasmid geschnitten. Man erwartet eine Bande bei ca. 11 000 bp für das pINDUCER21-Konstrukt und eine bei 624 bp für die Rab7-Mutanten. Die Restriktionsansätze zeigen, dass die eGFP-Rab7-inserts jeweils korrekt in das pINDUCER21-Expressionsplasmid überführt wurden (Abb. 6).

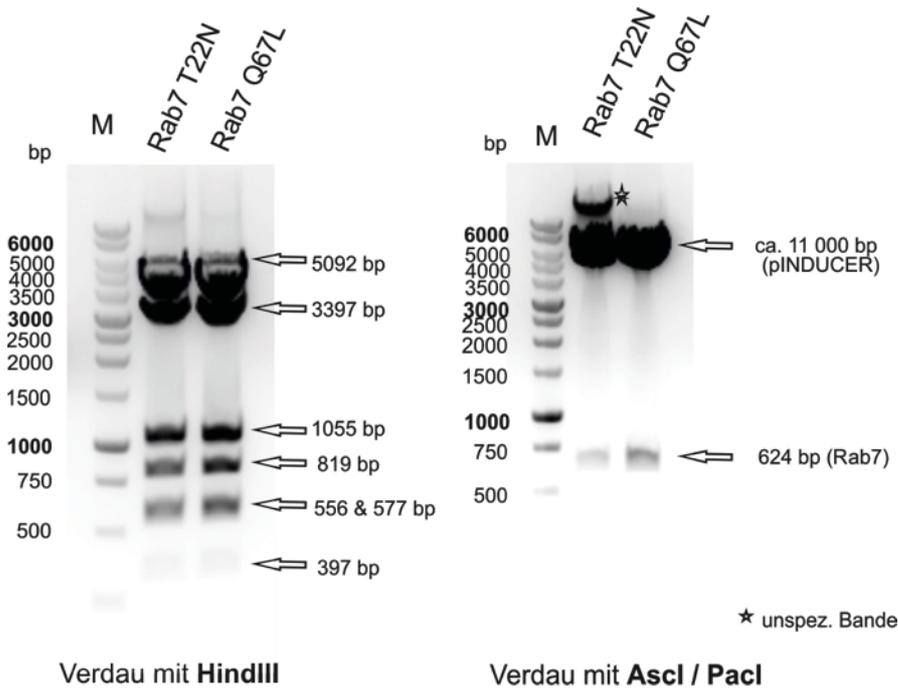


Abbildung 6: Restriktionsverdau des pINDUCER21-eGFP-Rab7 T22N und pINDUCER21-eGFP-Rab7 Q67L

Dargestellt ist die agarosegelelektrophoretische Auftrennung der pINDUCER21-Konstrukte mit je 20 μ l Restriktionsverdau. Links wurde mit HindIII geschnitten, rechts mit AscI und PacI. In der Spalte M sind jeweils 5 μ l 1 kB DNA Größenstandard aufgetragen. Bei der unspezifischen Bande handelt es sich vermutlich um nicht verdaute Plasmide.

4.1.2 Erstellung stabiler Zelllinien

Die generierten pINDUCER21-Konstrukte wurden mittels lentiviraler Transduktion in HEK 293T- und AB8-Zellen eingebracht (3.3.3). Die Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen erfolgte über kontinuierliche Puromycingabe.

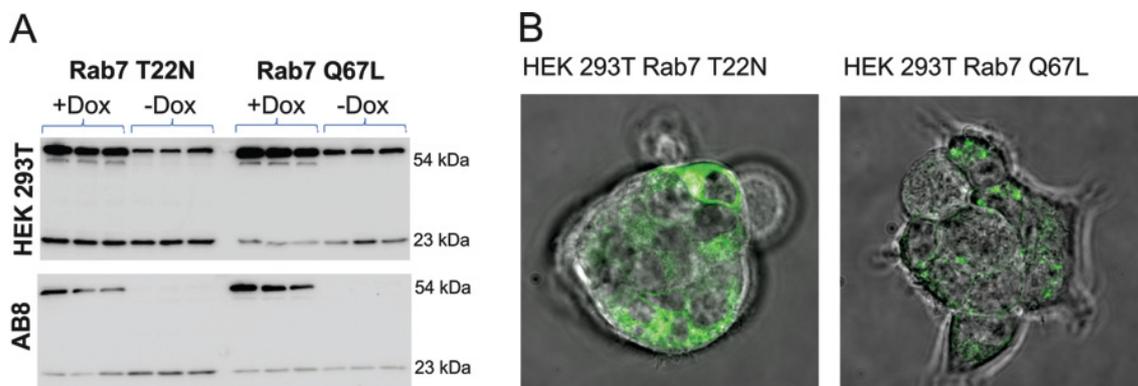


Abbildung 7: Die induzierte Überexpression von Rab7-Mutanten führt zu unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation

(A) Dargestellt sind Western Blot-Analysen aller vier Zelllinien (Rab7 T22N und Q67L jeweils in HEK 293T und AB8 Zellen). Es wurden jeweils 5 μ l der HEK- und 14 μ l der AB8-Zellysate aufgetragen. Der Rab7-Antikörper erkennt bei 54 kDa das eGFP-Rab7 Fusionsprotein und bei 23 kDa endogenes Rab7. (B) Mikroskop Bilder der HEK-Zelllinien. Gezeigt ist eine Überlagerung von eGFP (grün)- und Durchlichtaufnahmen (grau).

Nach Abschluss der Selektion und 24-stündiger Stimulation mit Doxyzyklin wurden die Zelllinien mit Western Blot-Analysen und unter dem Mikroskop untersucht. Im Western Blot waren sowohl in HEK 293T- als auch in AB8-Zellen *eGFP-Rab7* Banden nachweisbar. Unter dem Mikroskop zeigten die Rab7 T22N exprimierenden Zelllinien eher diffuse *eGFP* Signale im gesamten Zytosol, während die Signale in den Rab7 Q67L exprimierenden Zelllinien vor allem auf rundliche Strukturen begrenzt sind. Dies deutet darauf hin, dass Rab7 T22N und Rab7 Q67L unterschiedlich innerhalb der Zelle verteilt sind.

4.2 Daueraktives Rab7 Q67L vermindert die Zellviabilität

Bei der Kultivierung der stabilen Zelllinien fiel auf, dass Zellen, die die daueraktive Mutante Rab7 Q67L exprimieren, langsamer wachsen. Um zu analysieren, ob Rab7 Q67L einen proliferationshemmenden oder zytotoxischen Effekt auf die Zellen hat, wurden Zellviabilitätsassays durchgeführt (3.3.6).

Hierbei wuchsen sowohl die Rab7 Q67L als auch die Rab7 T22N Zellen bei Doxyzyklin-Zugabe langsamer als die Zellen in den nicht-induzierten Kontrollansätzen. Die genaue Auswertung der Messungen zeigte jedoch, dass der beobachtete Trend lediglich in den Rab7 Q67L exprimierenden Zellen signifikant ist.

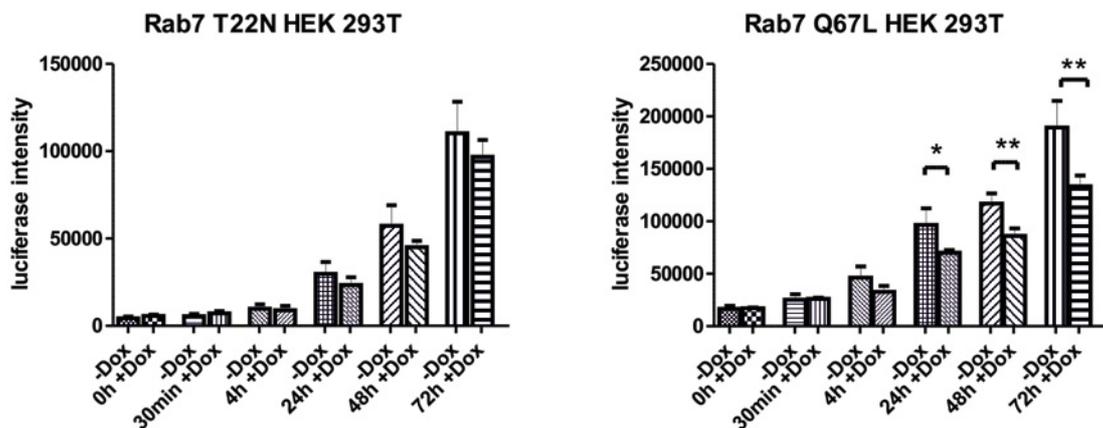


Abbildung 8: Daueraktives Rab7 Q67L vermindert die Zellviabilität

Dargestellt sind die Messwerte der Luciferase Intensität für Rab7 T22N und Q67L. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte ab Zugabe von Doxyzyklin und des Luciferase-Substrates angegeben. Der linke Balken stellt jeweils die Kontrolle dar. Es wurden Triplikate untersucht. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (SD) dar.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Zusammenfassend bestätigt das Assay die im Vorfeld gemachte Beobachtung, dass die Überexpression von Rab7 Q67L zu einer deutlichen Abnahme der Zellproliferation

führt. Dies weist auf einen zytotoxischen oder wachstumsinhibierenden Effekt der daueraktiven Rab7-Mutante hin.

4.3 Einfluss der Rab7-Mutanten auf den mTOR-Signalweg

Da bekannt ist, dass die mTOR-Kinase eine wichtige Rolle für den Podozyten spielt (1.5) und auf Rab7-positiven Kompartimenten aktiviert wird (1.4), lag die Vermutung nahe, dass sich unterschiedliche Rab7-Aktivitätslevel auf den mTOR-Signalweg im Podozyten auswirken. Da die Detektion der mTOR-Kinase eher anspruchsvoll ist, wurden phosphorylierte Formen ihrer *downstream targets* als Anzeigewerte genutzt. Starke Signale der phosphorylierten Form des Protein S6 bedeuten, dass die mTOR-Kinase aktiv ist, während schwächere Signale auf eine verringerte Aktivität hindeuten. Sowohl für Rab7 T22N als auch für Rab7 Q67L wurden keine Unterschiede der endogenen pS6 Expression nachgewiesen (Abb. 9).

Die Ergebnisse deuten somit an, dass der mTOR-Signalweg nicht von unterschiedlichen Rab7-Aktivitätslevel beeinflusst wird.

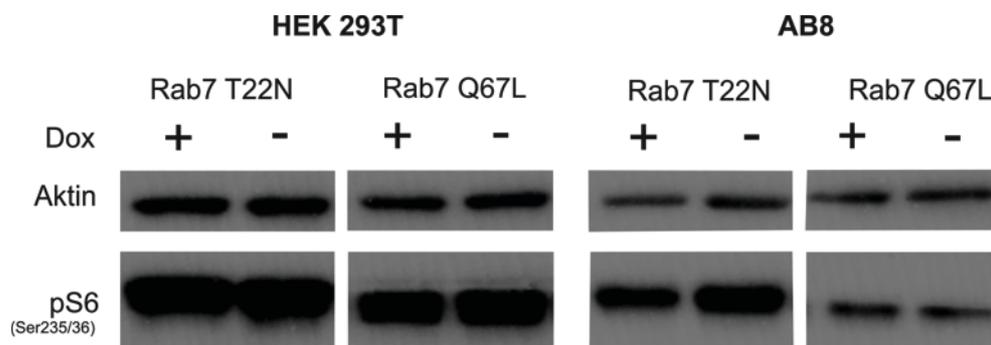


Abbildung 9: Die basale Aktivität der mTOR-Kinase wird durch die Rab7-Mutanten nicht beeinflusst

Dargestellt sind die Ergebnisse von Western Blot-Analysen mit primären Antikörpern für das mTOR *downstream target* phospho-S6 ribosomales Protein (Phosphorylierungsstelle am Serin 235/36) und Aktin als Ladungskontrolle. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit Doxyzyklin induziert.

Da die mTOR-Kinase Aktivität nicht durch die Überexpression von Rab7 GDP oder -GTP verändert wurde, stellte sich die Frage, ob mTOR in Podozyten eher bei der durch mTOR-Reaktivierung ausgelösten Reformierung von Lysosomen eine Rolle spielt (Cina et al. 2012). Um den Zeitpunkt der Reaktivierung zu untersuchen, wurde die mTOR-Kinase durch Hungern der Zellen in EBSS-Medium (serumfrei) zunächst inaktiviert. Durch ein anschließendes *refeeding* mit normalem Medium sollte die

mTOR-Kinase reaktiviert werden. Fehlende Aktivität der mTOR-Kinase nach dem *refeeding* spricht für eine gestörte Reaktivierung.

Die Versuche wurden an den AB8 Rab7 T22N und -Rab7 Q67L-Zelllinien durchgeführt. Zusätzlich wurde eine AB8-Zelllinie eingesetzt, in der das Gesamtlevel von Rab7 durch Doxyzyklin-Gabe herabgesetzt werden konnte (*knockdown*). Alle Zelllinien wurden zunächst vier Stunden in EBSS-Medium gehungert. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot der Zellen für zehn Minuten mit Standardmedium (DMEM plus 10%FCS) kultiviert (*refeed*).

Wie erwartet wurde unter Hungerbedingungen kaum mTOR-Aktivität festgestellt. Da Hungern ein starker Induktor von Autophagozytoseprozessen ist, geht die Aktivität von mTOR bei Hungern zurück. Für die Rab7 T22N überexprimierenden Zellen wurde gezeigt, dass sie genauso gut wie die jeweiligen Kontrollen auf das *refeeding* ansprechen. Auch die mit Doxyzyklin induzierten Rab7-*knockdown*-Zellen wiesen ähnliche Expressionslevel der mTOR *downstream targets* nach dem *refeeding* auf wie nicht induzierte Kontrollzellen. Die GTPase-defiziente Mutante Rab7 Q67L zeigte im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle jedoch keine Reaktivierung vom mTOR-Signalweg (Abb. 10).

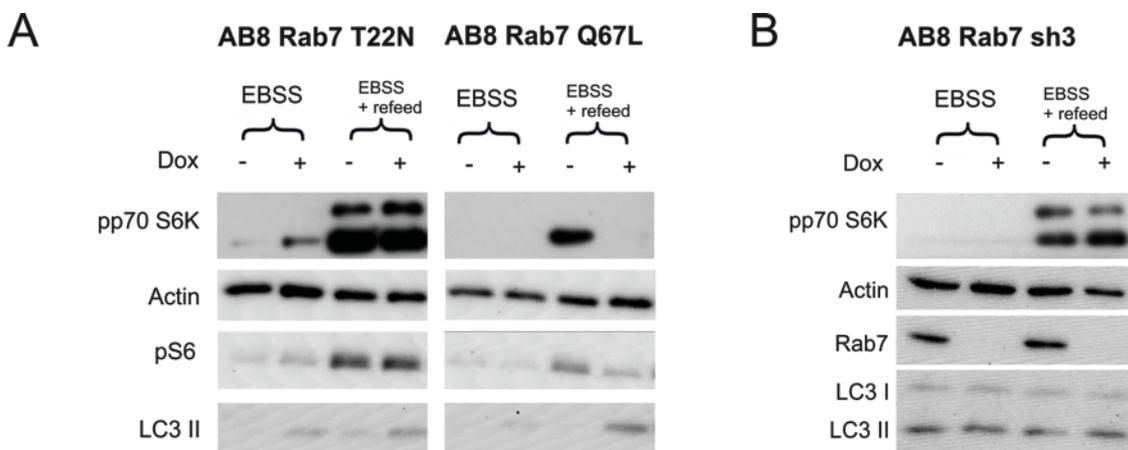


Abbildung 10: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante stört die mTOR-Reaktivierung nach Hungern

(A) Dargestellt ist das Ergebnis der Western Blot-Analysen von Lysaten aus proliferierenden, 33 °C AB8-Zellen. Die Zellen wurden vier Stunden in EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) Medium gehungert. Das *refeeding* erfolgte über 10 Minuten mit normalem AB8-Medium. Die Lysate wurden Western Blot-Analysen zugeführt. Primäre Antikörper gegen mTOR downstream targets pp70 S6K und das ribosomalen Protein pS6, gegen den Autophagozytose Marker LC3 und gegen Aktin als Ladungskontrolle wurden eingesetzt. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit Doxyzyklin induziert. (B) Eine induzierbare Rab7-*knockdown*-Zelllinie wurde wie in (A) beschrieben behandelt. Der Rab7-Antikörper wurde eingesetzt, um den knockdown zu bestätigen. Die Induktion mit Doxyzyklin erfolgte über sieben Tage.

Neben den mTOR *downstream targets* pp70 S6K und pS6 wurden auch die Expressionslevel des Autophagozytosemarkers LC3 analysiert. Hier fielen in den *knockdown* und Rab7 T22N-Zellen keine Unterschiede zwischen induzierten und nicht induzierten Zellen auf. Passend zu der inhibierten mTOR-Reaktivierung, konnte in Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen eine vermehrte Expression des Autophagozytosemarkers LC3 II nachgewiesen werden (siehe unten, 4.4).

Insgesamt kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass eine verminderte Rab7-Expression oder eine dauerinaktive Rab7 Variante keinen Einfluss auf die Reaktivierung von mTOR haben, während die daueraktive Rab7-Mutante die mTOR-Reaktivierung zu verhindern scheint und zu erhöhten Level des Autophagozytosemarkers LC3 führt.

Nachdem der Western Blot einen inhibierenden Einfluss von Rab7 Q67L auf die Reaktivierung von mTOR gezeigt hatte, wurde vermutet, dass auch in Immunfluoreszenzfärbungen ein Effekt von Rab7 Q67L auf die intrazelluläre mTOR-Lokalisation zu sehen sein könnte.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden die Zellen nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben (siehe Abb. 9) behandelt, fixiert und dann mit primären Antikörpern gegen mTOR und Lamp2 als lysosomalen Marker inkubiert.

Die Aufnahmen zeigten, dass mTOR unter Hungerbedingungen diffus im Zytosol verteilt ist. Nach dem *refeeding* kolokalisierte mTOR in der dauerinaktiven Rab7 T22N Mutante mit Lamp2-positiven Strukturen. In den Rab7 Q67L exprimierenden Zellen hingegen blieben die mTOR-Signale eher diffus und ließen sich nur vereinzelt auf Lamp2-positiven Strukturen nachweisen. Auch in nicht gehungerten Rab7 Q67L-Kontrollzellen wurde eine geringere Kolokalisation von Lamp2 und mTOR als in den Rab7 T22N-Zellen festgestellt (Abb. 11).

Die Immunfluoreszenzfärbungen deuten daher insgesamt an, dass Rab7 Q67L die Rekrutierung von mTOR auf Lamp2-positive Strukturen vermindert.

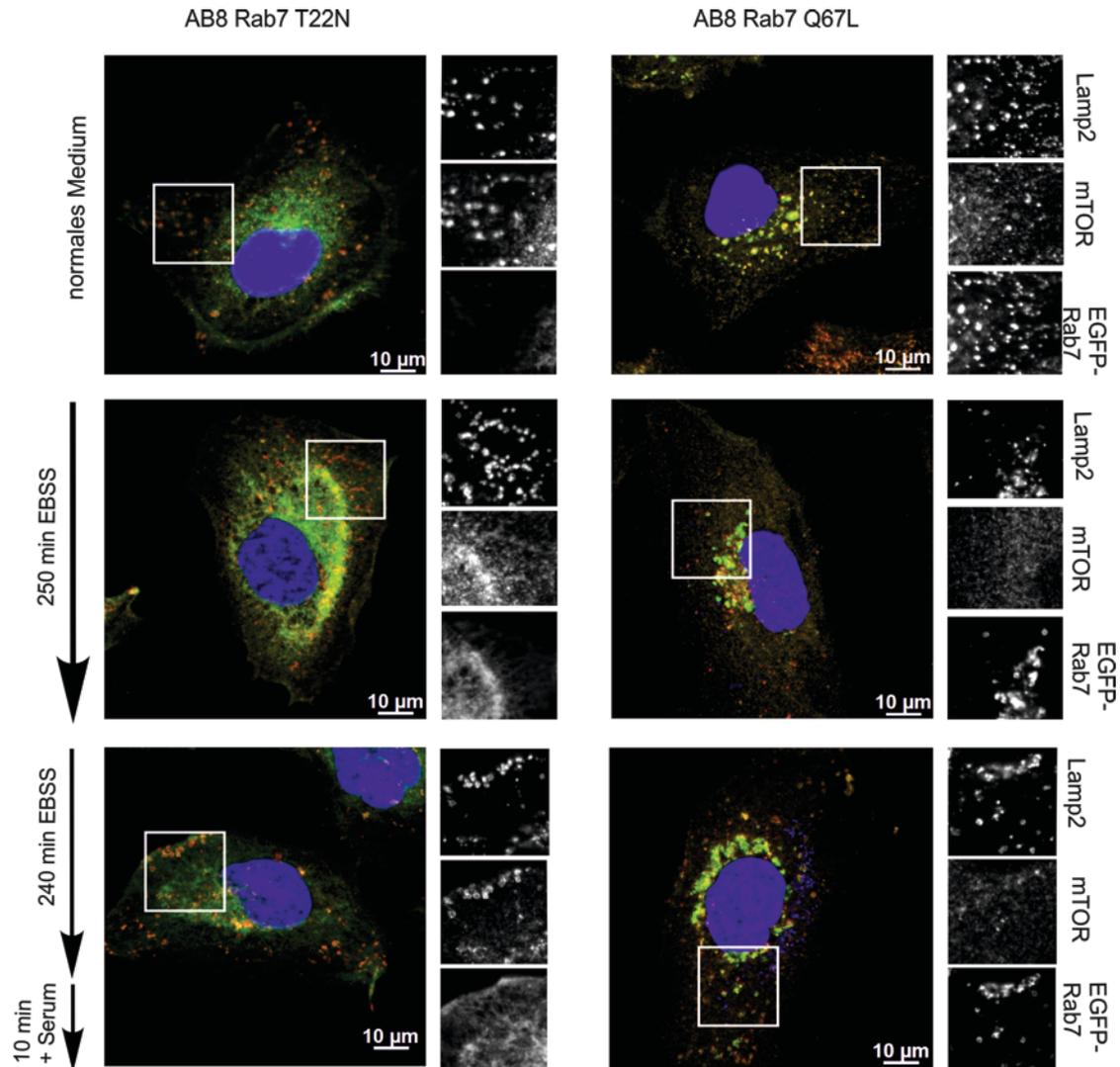


Abbildung 11: Die daueraktive Rab7 Q67L Mutante vermindert die mTOR Rekrutierung auf Lamp2-positive Strukturen

Dargestellt sind Immunfluoreszenzanalysen von Zellen, die wie in Abbildung 10 behandelt wurden. Die Zellen wurden fixiert und mit primären Antikörpern gegen mTOR und Lamp2 gefärbt. Die Induktion mit Doxyzyklin erfolgte über 48 Stunden.

4.4 Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu einer Akkumulation von LC3 II und unreifer von Cathepsin D

Da mTOR neben Zellwachstum und -proliferation auch die Autophagozytose reguliert, wurden Western Blot-Analysen mit primären Antikörpern gegen den Autophagozytose Marker LC3 und Cathepsin D durchgeführt.

Es wurde eine Akkumulation von LC3 II und Vorformen von Cathepsin D in den Rab7 Q67L exprimierenden Zellen festgestellt. Der Effekt war sowohl in den HEK 293T- als auch in den AB8-Zellen erkennbar (Abb. 12).

Das deutet darauf hin, dass die Überexpression von Rab7 Q67L mit einer gestörten Reifung oder Ansäuerung endolysosomaler Strukturen verbunden sein könnte, da die Prozessierung von Cathepsin D (von *pre* in *mature*) einen niedrigen pH-Wert erfordert.

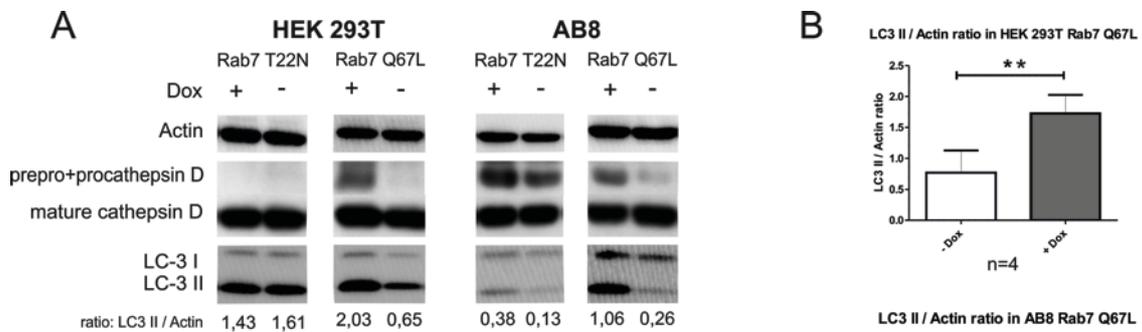


Abbildung 12: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu einer Akkumulation von LC3 II und Vorformen von Cathepsin D

(A) Lysate aus den stabilen Zelllinien wurden in Western Blot-Analysen untersucht. Verwendet wurden primäre Antikörper gegen Aktin, Cathepsin D und LC3. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit Doxzyklin behandelt. (B) Die Dichte der Western Blot-Balken wurde mit ImageJ bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die SD. *p<0,05, **p<0,01

4.5 Einfluss der Rab7-Mutanten auf mTOR in ausdifferenzierten AB8-Zellen

Da es sich bei den humanen Podozyten *in vivo* um postmitotische Zellen handelt, für die insbesondere in Bezug auf mTOR- und Autophagozytose-Aktivität Unterschiede zu proliferierenden Zellen beschrieben sind (Narita et al. 2011), wurden die Effekte von Rab7 Q67L auf mTOR auch in ausdifferenzierten Zellen untersucht. Die bisher in dieser Arbeit untersuchten 33 °C Zellen teilen sich und sind ein Modell für proliferierende Zellen. Der *shift* von 33 °C auf 37 °C bewirkt, dass die Zellen sich zunächst viel langsamer teilen und nach etwa 10-14 Tage nicht mehr proliferieren. Der Vergleich zwischen bei 33 °C und 37 °C kultivierten Zellen ist deshalb ein Ansatz, um mögliche Unterschiede zwischen postmitotischen und proliferierenden Podozyten herauszuarbeiten.

Damit Lysate von proliferierenden und ausdifferenzierten AB8-Zellen verglichen werden konnten, wurden die AB8-Zellen über 12 Tage bei 37 °C kultiviert. Zunächst wurde eine Expressionskontrolle durchgeführt, um zu überprüfen, ob auch in den nicht proliferierenden Zellen *eGFP*-Rab7 T22N bzw. Q67L nachweisbar ist. Die Überexpression der *eGFP*-gekoppelten Rab7-Mutanten konnte auch für die ausdifferenzierten Zellen bestätigt werden (Abb. 13).

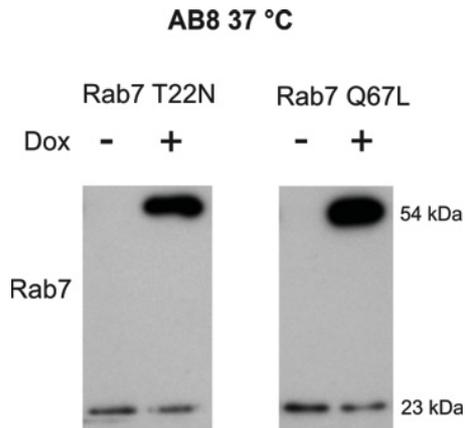


Abbildung 13: Die Überexpression der Rab7-Mutanten funktioniert auch in ausdifferenzierten AB8-Zellen

Dargestellt sind Western Blot-Analysen der AB8 Zelllysate, die bei 37 °C kultiviert wurden. Es wurden jeweils 14 µL der Lysate aufgetragen. Der Rab7-Antikörper erkennt bei 54 kDa das *eGFP-Rab7* und bei 23 kDa endogenes Rab7. Die Doxyzyklininduktion erfolgte über 48 Stunden.

Anschließend wurden Lysate von 33 °C und 37 °C AB8-Zellen nebeneinander aufgetragen, um die Expressionslevel der mTOR *downstream targets* pp70 und pS6 und dem Autophagozytosemarker LC3-II zu untersuchen. Um die Lysate vergleichen zu können, wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf die endogene Aktinexpression normiert.

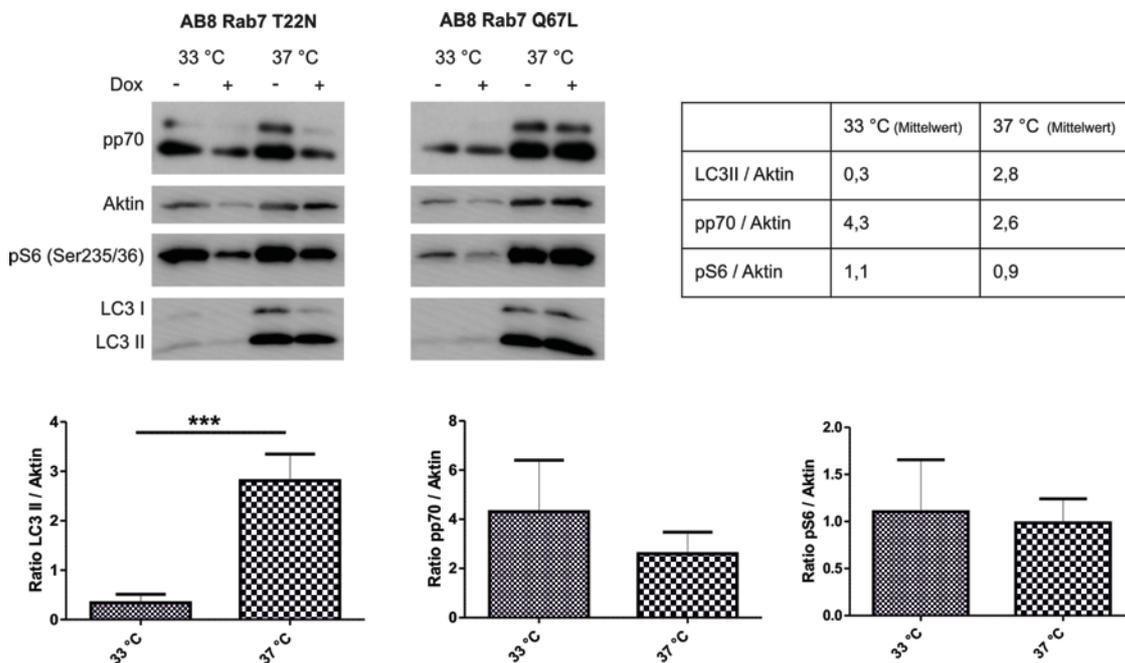


Abbildung 14: Ausdifferenzierte AB8-Zellen exprimieren signifikant mehr LC3-II als proliferierende AB8-Zellen

Lysate von 33 °C und 37 °C AB8 Zellen wurden Western Blot-Analysen mit primären Antikörpern gegen pp70, pS6, LC3 und Aktin zugeführt. Die Dichte der Western Blot-Banden wurde mit ImageJ bestimmt. Die Fehlerbalken stellen die SD dar. *** $p < 0,005$

Unterschiede im Niveau der basalen mTOR-Aktivität und Autophagozytose sind sehr spannend, da postmitotische Zellen deutlich stärker auf das Recycling eigener

Zellorganellen und Proteinkomplexe angewiesen sind als schnell wachsende Zellen. In postmitotischen Zellen findet deshalb oft deutlich mehr Autophagozytose statt (Weide und Huber 2011).

Auch in den in dieser Arbeit genutzten humanen Podozytenzelllinien konnten signifikant höhere Expressionslevel des Autophagozytosemarkers LC3-II in den ausdifferenzierten Zellen im Vergleich zu den proliferierenden Zellen nachgewiesen werden. Die Expressionslevel der mTOR *downstream targets* pp70 und pS6 waren in den proliferierenden Zellen etwas höher. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 14).

Die bereits mit proliferierenden Zellen durchgeführten Hungerversuche wurden mit den ausdifferenzierten AB8-Zellen wiederholt. Wie bereits für die proliferierenden Zellen beschrieben, ließ sich auch hier eine Störung in der Reaktivierung von mTOR nach Hungern bei Überexpression von Rab7 Q67L nachweisen (Abb. 15).

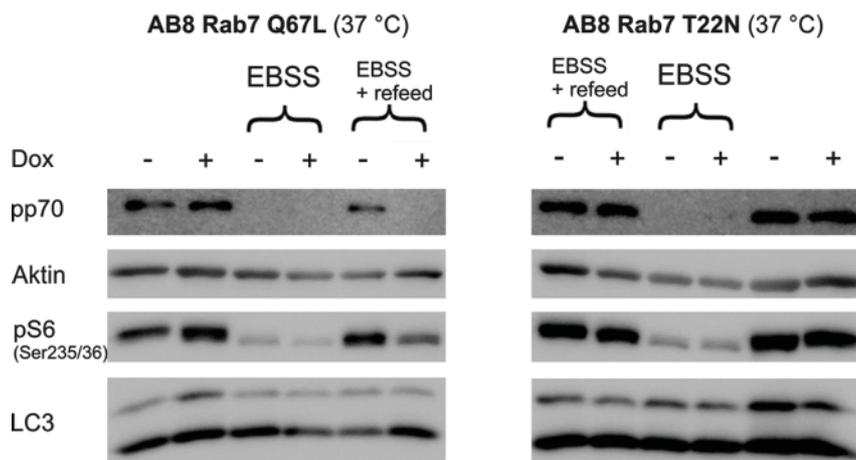


Abbildung 15: Rab7 Q67L stört die Reaktivierung von mTOR nach Hungern in ausdifferenzierten Podozyten

Dargestellt ist das Ergebnis der Western Blot-Analysen von Lysaten aus ausdifferenzierten, 37 °C AB8-Zellen. Die Zellen wurden vier Stunden in EBSS (Earle's-Balanced-Salt-Solution) Medium gehungert. Das *refeeding* erfolgte über 10 Minuten mit normalem AB8 Medium. Die Lysate wurden Western Blot-Analysen zugeführt. Primäre Antikörper gegen mTOR *downstream targets* pp70 S6K und das ribosomalen Protein pS6, gegen den Autophagozytose Marker LC3 und gegen Aktin als Ladungskontrolle wurden eingesetzt. Die Zellen wurden über 48 Stunden mit Doxyzyklin induziert.

Auch in den Immunfluoreszenzanalysen war die Kolokalisation von mTOR und dem lysosomalen Marker Lamp2 in den Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen nach *refeeding* vermindert (Abb. 16).

Insgesamt konnten die Effekte, die bereits in den proliferierenden Zellen beobachtet wurden, in den ausdifferenzierten AB8-Zellen bestätigt werden. Die mTOR Reaktivierung und Rekrutierung auf Lamp2-positive Strukturen wird nach Hungern durch die Überexpression von Rab7 Q67L auch in ausdifferenzierten AB8-Zellen inhibiert bzw. vermindert.

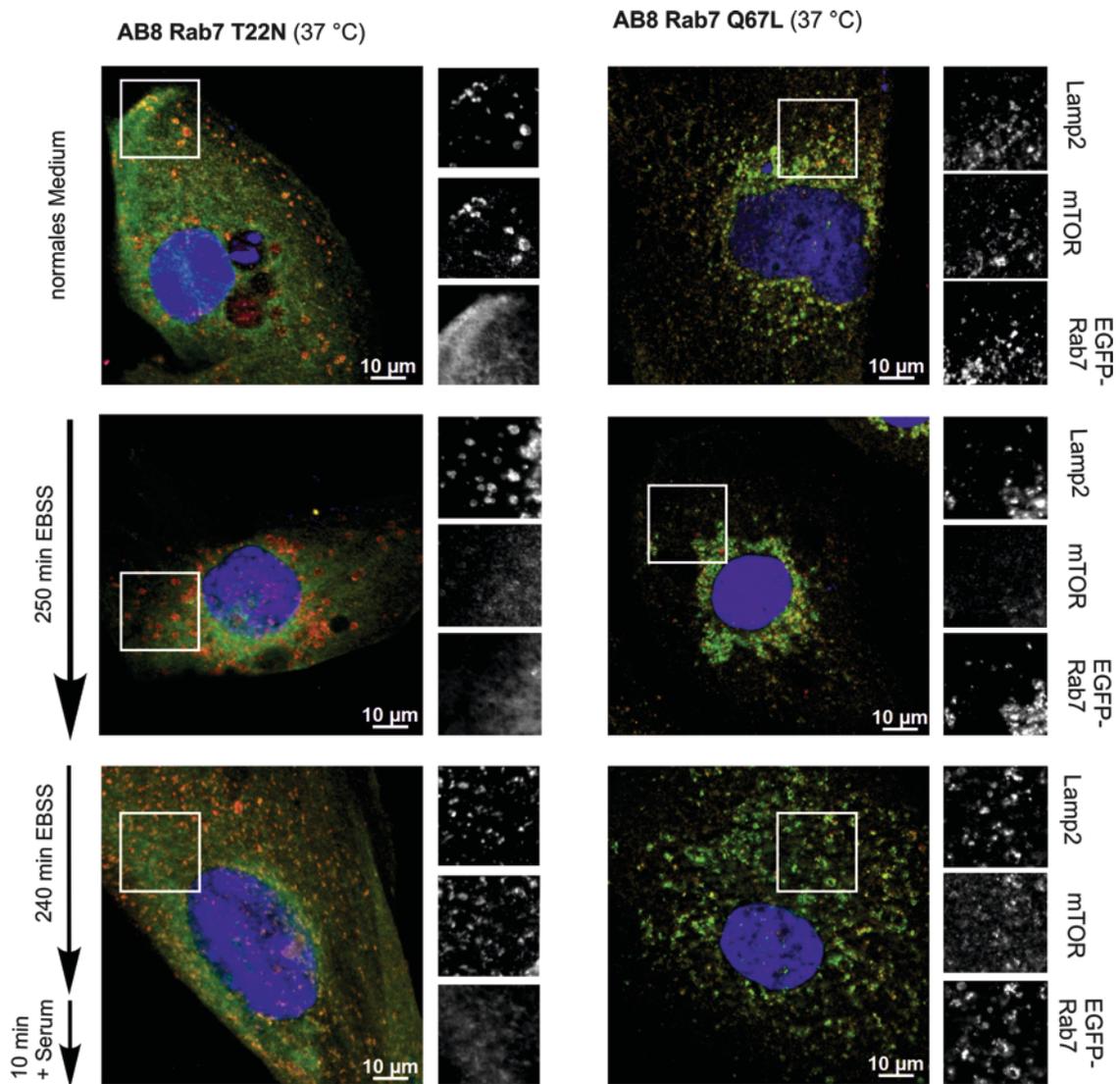


Abbildung 16: Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante vermindert die mTOR-Rekrutierung auf Lamp2-positive Strukturen in ausdifferenzierten AB8-Zellen

Dargestellt sind Immunfluoreszenzanalysen von 37° C AB8-Zellen, die wie in Abbildung 10 behandelt wurden. Die Zellen wurden fixiert und mit primären Antikörpern gegen mTOR und Lamp2 gefärbt. Die Induktion mit Doxyzyklin erfolgte über 48 Stunden.

5 Diskussion

5.1 Herstellung stabiler Zelllinien zur Überexpression von daueraktivem- und dauerinaktivem Rab7

Die pINDUCER21-Konstrukte beider Rab7-Mutanten wurden in dieser Arbeit erfolgreich in HEK 293T- und humane Podozytenzellen (AB8) transduziert. Das induzierbare System bringt einige Vorteile. So können die Zellen im gewünschten Umfang kultiviert werden und die Expression der Mutanten erst zum passenden Zeitpunkt durch die Zugabe von Doxzyklin stimuliert werden. Nicht-induzierte Zellen können als Kontrolle genutzt werden. Dadurch, dass die Kontrollzellen zuvor gleich behandelt wurden, hat der Vergleich der nicht-induzierten mit den induzierten Zellen eine hohe Aussagekraft. Festgestellte Unterschiede sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Überexpression der Rab7-Mutanten zurückzuführen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss jedoch beachtet werden, dass es weiterhin eine endogene Rab7-Expression gibt, die schwächere Effekte überdeckt oder sogar wieder aufheben kann. Durch die Überexpression der GTPase-defizienten- und dauerinaktiven Mutante werden zwei gegensätzliche Rab7-Aktivitätszustände untersucht, ohne die Expression des gesamten Proteins zu vermindern. Alternativ ließe sich die Verschiebung der Aktivitätslevel nur über GTPase-Inhibitoren untersuchen, die allerdings viele *off-target* Effekte aufweisen. Für Rab7 ist als Inhibitor zum Beispiel das *CID 1067700* bekannt (Agola et al. 2012), das aber vor allem bei höheren Konzentrationen auch andere kleine GTPasen inhibieren kann.

Die erstellten Zelllinien wurden zuerst getestet. Im Western Blot bestätigte die Detektion einer zusätzlichen Bande bei 54 kDa in den induzierten Zellen, dass *eGFP-Rab7*-Fusionsproteine exprimiert werden. Das endogene Rab7 wird bei 23 kDa detektiert. Zusätzlich stützten die Immunfluoreszenz Aufnahmen den Erfolg der Transduktion. Hier waren die *eGFP*-Signale des daueraktiven Rab7 auf rundlichen Strukturen, vermutlich Lysosomen, lokalisiert, während die Signale des dauerinaktiven Rab7 diffus im Zytosol verteilt waren. Wie bereits in der Einleitung (1.3) dargestellt, ist dies die Lokalisation, die man für diese Rab7-Mutanten erwarten würde. Auch für ausdifferenzierte AB8-Zellen wurde die Funktionalität des erstellten induzierbaren Zellsystems nachgewiesen.

Die Untersuchung von Zelllinien, die unterschiedliche Rab7-Aktivitätslevel stabil exprimieren, ist für die Podozytenforschung sehr interessant, da bereits mehrfach

gezeigt wurde, dass endolysosomale Prozesse für den Podozyten überlebenswichtig sind (Soda et al. 2012; Bechtel et al. 2013; Tagawa et al. 2016). Bisher unveröffentlichte Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pavenstädt stützen diese Befunde, da sie zeigen, dass ein *Rab7-knockout* in murinen Podozyten zu einer starken Proteinurie führt.

Interessanterweise sind Mutationen innerhalb der kodierenden Region des menschlichen RAB7-Gens bereits im Zusammenhang mit humanen Charcot-Marie-Tooth-Erkrankungen (CMT2B-Neuropathie) identifiziert worden (Zhang et al. 2013). Da Neuronen ähnlich wie Podozyten postmitotische Zellen sind, ist die Betrachtung neuronaler Krankheiten grundsätzlich von Relevanz für die Podozytenforschung. In der Tat wurde kürzlich gezeigt, dass Mutationen im INF2-Gen, das ursprünglich für CMT-Neuropathien identifiziert wurde, auch bei bestimmten Formen podozytärer Erkrankungen eine große Rolle spielen (Caridi et al. 2014).

Für die CMT2B-Neuropathie wurden Rab7-Mutationen identifiziert, die eine langsamere GTP-Hydrolyse als das Wildtyp-Protein aufweisen (Spinosa et al. 2008; Cherry et al. 2013), was in Richtung der in dieser Arbeit untersuchten Rab7 Q67L-Mutation geht. Der genaue Krankheitsmechanismus jedoch ist nicht geklärt und Bestandteil aktueller Forschung. Gentil und Cooper postulieren, dass über einen *Gain of Function* Mechanismus der *downstream* Regulator RILP (*Rab-interacting lysosomal protein*) von den mutierten Rab7-Proteinen gebunden wird. Die daraus resultierende mangelnde Verfügbarkeit von RILP für andere Funktionen, wie z.B. den endosomalen Transport, führe zu den Symptomen (Gentil und Cooper 2012). Cherry et al. halten hingegen einen *Loss of Function* Mechanismus für ursächlich (Cherry et al. 2013). Sie konnten zeigen, dass die Mutanten nur noch 10-50 % ihrer Funktionalität im Vergleich zum nicht mutierten Rab7-Protein behalten. Durch Überexpression der Mutanten konnten sie den Neuropathie-ähnlichen Phänotyp komplett aufheben (*rescue*).

5.2 Die Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen haben eine geringere Zellviabilität

Für die Rab7 Q67L-Mutante, die ähnlich wie die CMT2B-Mutanten eine verminderte GTP-Hydrolyse aufweist, zeigte das durchgeführte Zellviabilitätsassay eine signifikant geringere Zellviabilität im Vergleich zur nicht induzierten Kontrolle. Im Einklang mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen ist in der Literatur bereits beschrieben, dass die Überexpression von Rab7 Q67L Apoptose induziert (Romero et al. 2009).

Zusammengenommen stützen diese Daten die Hypothese, dass eine Fehlregulation der Rab7-Aktivität das Überleben von Zellen negativ beeinflusst. Besonders bei

postmitotischen Zellen wie den Podozyten, die nach ihrem Absterben vermutlich nicht ersetzt werden (Pavenstädt et al. 2003), könnte dies wichtig sein. Möglicherweise führen demnach neben dem vollständigen Verlust von Rab7 (vgl. noch nicht veröffentlichte Daten der Rab7-*knockout* Maus aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pavenstädt, 1.6) auch ein verändertes Rab7-Aktivitätslevel über eine erhöhte Zelltoxizität zu vermehrtem Podozytenverlust. Daraus könnte ein möglicher Einfluss der Rab7-Aktivitätslevel auf die Pathogenese oder Progression von chronischen Nierenerkrankungen resultieren.

Die genauen molekularen Mechanismen, die zu der erhöhten Zelltoxizität führen, bleiben jedoch zu klären. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Untersuchung der mTOR-Kinase gelegt, da sie bekanntermaßen eine wichtige Rolle für das Überleben von Podozyten spielt (Gödel et al. 2011; Narita et al. 2011; Cina et al. 2012). Außerdem wird die mTOR-Kinase auf endolysosmalen Kompartimenten aktiviert (Sancak et al. 2008), was wiederum eine Verbindung zu dem für endo- und autophagolysosomale Transportprozesse wichtigen Rab7 herstellt.

5.3 Rab7 Q67L beeinflusst die mTOR-Reaktivierung nach Hungern

In den ersten Analysen zum Einfluss der Rab7-Mutanten auf die mTOR-Kinase konnte zunächst keine Regulierung der basalen mTOR-Aktivität festgestellt werden. Erst durch zeitweises Hungern und anschließendes *refeeding* wiesen die Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen einen Unterschied in der mTOR-Reaktivierung im Vergleich zur Kontrolle auf. Vermutlich wurden die Zellen durch die Kultivierung in Standardmedium so gut mit Nährstoffen versorgt, dass der mTOR-Aktivitätsstatus keinen großen Schwankungen unterlag. Erst durch den Wechsel zwischen Hungern und ausreichendem Nahrungsangebot konnte ein Unterschied herausgearbeitet werden. Der Wechsel zwischen nährstoffreichen- und ärmeren Milieus ist *in vivo* vermutlich die Regel, sodass die hier gefundenen Unterschiede auch *in vivo* von Bedeutung sein könnten.

Die daueraktive Rab7-Mutante scheint erst in die mTOR-Aktivierung einzugreifen, wenn die mTOR-Kinase durch Hungern von den Lysosomen dissoziiert ist. Möglicherweise spielt in Podozyten also eher die Reaktivierung von mTOR eine Rolle, die zur autophagolysosomalen Reformierung und damit zur Komplettierung des Autophagozytose-Zyklus führt (Cina et al. 2012).

Untersuchungen zum Einfluss von Rab7 auf den mTOR-Signalweg existieren bereits in früheren Studien (Flinn et al. 2010; Li et al. 2010). Beide Studien haben sich hauptsächlich mit dem frühendosomal Rab5 beschäftigt, aber auch einzelne Ergebnisse zu anderen Rab Proteinen gezeigt. Einig waren sich die Gruppen in der Tatsache, dass daueraktives Rab5 die Aktivierung der mTOR-Kinase inhibiert. Die Aussagen über den Einfluss von daueraktivem Rab7 gehen jedoch auseinander.

Li et al. konnten durch Überexpression der daueraktiven Rab7-Mutante und Co-Transfektion des mTOR *downstream targets* pS6K eine Inhibition der mTOR-Aktivität bereits ohne vorgeschaltete Hungersituation nachweisen. Flinn et al. postulieren hingegen, dass die Überexpression von Rab7 Q67L oder Rab7 T22N zu keiner gestörten mTOR-Aktivierung führt. Diese Gruppe untersuchte den Einfluss einer Insulinstimulation. Es ist bekannt, dass mTOR durch eine aminosäureabhängige- und über eine insulinabhängige Kaskade (auch TSC/Rheb Achse) aktiviert wird (Laplane und Sabatini 2009). Für die Rekrutierung der mTOR-Kinase ist die aminosäureabhängige Kaskade zuständig (Sancak et al. 2008). Man weiß, dass sie unabhängig von der anderen Aktivierungskaskade ist, die durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, Sauerstoff und den Energiestatus reguliert wird. Die insulinabhängige Kaskade spielt bei der Aktivierung von Rheb eine Rolle. Die genaue Lokalisation von endogenem Rheb ist bisher nicht bekannt, man vermutet aber, dass es sich auf endolysosomalen Strukturen befindet (Sancak et al. 2010). Wenn die mTOR-Kinase nicht auf die Lysosomen rekrutiert wird, da nur eine Stimulation mit Insulin und nicht mit Aminosäuren erfolgte, kann Rheb nicht mit mTORC1 in Kontakt treten. Dies erklärt möglicherweise die abweichenden Ergebnisse.

In dieser Arbeit konnte durch Hungern und anschließende Aminosäurestimulation ein inhibierender Effekt der daueraktiven Rab7 Q67L-Mutante auf mTOR-Aktivität festgestellt werden. Außerdem zeigt diese Arbeit zum ersten Mal, dass dieser Effekt in postmitotischen Podozytenzellen nachweisbar ist.

In den Immunfluoreszenzen bewirkte Rab7 Q67L eine verminderte Rekrutierung von mTOR auf lysosomale Strukturen. Da mTOR auf lysosomalen Strukturen aktiviert wird, stützt diese Beobachtung die Ergebnisse aus dem Western Blot, die zeigen, dass Rab7 Q67L die mTOR-Reaktivierung nach Hungern inhibiert. Es ist also davon auszugehen, dass Rab7 entweder die lysosomale Membran verlassen oder GTP hydrolysiert werden muss, damit mTOR aktiviert werden kann. In zukünftigen Arbeiten

wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit die Rab7-GAPs oder ein Rab7/Rab9-*switch* für die mTOR-Aktivierung notwendig sind.

5.4 Die daueraktive Rab7 Q67L-Mutante führt zu gesteigerter Autophagozytose und lysosomalen Reifungsstörungen

Da die aktive mTOR-Kinase Autophagozytose unterdrückt, war die Beobachtung erhöhter Level des Autophagozytosemarkers LC3-II passend zu der zuvor festgestellten verminderten mTOR-Aktivität. Ähnliche Beobachtungen machten bereits Toyofuku et al. bei der Untersuchung von Mäusen, in denen ähnlich wie bei der Rab7 Q67L-Mutante eine geringere Rab7-GTPase-Aktivität vorhanden war. Diese Mäuse zeigten eine Akkumulation von LC3-II nach Hungern. Durch den Hungerreiz wird die Autophagozytose stimuliert und es wird mehr LC3 gebildet. Die Gruppe vermutet, dass die konjugierte Form des LC3, das LC3-II, akkumuliert, da die lysosomale Degradation während der Autophagozytose durch reduzierte GTPase-Aktivität nicht mehr ausreichend stattfindet. Die Effekte konnten Toyofuku et al. durch eine Rab7-GAP-Mutante mit erhöhter GTPase-Aktivität teilweise wieder aufheben (*rescue*) (Toyofuku et al. 2015).

Cathepsin D ist eine lysosomale Protease. Sie wird zunächst als *prepro*-Vorstufe exprimiert und anschließend in den Lysosomen aktiviert. Mit der Aktivierung geht eine Abspaltung des Propeptids einher. Die in dieser Arbeit festgestellte Akkumulation der Vorstufen vom Cathepsin D spricht für eine fehlgesteuerte Reifung spätendolysosomaler- in lysosomale Kompartimente. Toyofuku et al. vermuten, dass durch die fehlende Rab7-GTPase-Aktivität die Endosom-Lysosom Fusion nicht mehr stattfindet. Das könnte zu einer fehlenden Ansäuerung der Rab7-positiven Kompartimente führen.

Die fehlende Ansäuerung wiederum könnte die gestörte mTOR-Reaktivierung erklären. Wenn der pH-Wert in den Lysosomen zu weit ansteigt, werden Proteine nicht mehr zu Aminosäuren degradiert. Da Zoncu et al. gezeigt haben, dass die mTOR-Kinase über einen v-ATPase-abhängigen Mechanismus lysosomale Aminosäuren erkennt und dadurch aktiviert wird, könnte man vermuten, dass in Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen ein erhöhter pH-Wert zu verminderter Proteindegradation und folglich gestörter mTOR-Reaktivierung führt.

Stransky und Forgac machten zudem die Beobachtung, dass bei Neutralisation der lysosomalen Kompartimente durch Gabe des v-ATPase Inhibitors Chloroquine das mTOR-*signaling* zunächst aufrechterhalten wurde, nach einer Hungerperiode jedoch

keine mTOR-Reaktivierung stattfand (Stransky und Forgac 2015). In dieser Arbeit wurde auch für die Rab7 Q67L überexprimierenden Zellen festgestellt, dass sie erst nach einer Hungerperiode Einfluss auf den mTOR-Signalweg ausüben. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass eine Überexpression der daueraktiven Rab7-Mutante zu einer Erhöhung des lysosomalen pH-Werts führen könnte.

5.5 Rab7 Q67L führt zu einer verminderten mTOR-Kinase Aktivierung nach Hungern

Die Untersuchung des Einflusses der Rab7-Mutanten auf mTOR in ausdifferenzierten AB8-Zellen ist insofern interessant, als dass für humane Podozyten, bei denen es sich *in vivo* um postmitotische Zellen handelt, Unterschiede in Bezug auf mTOR und Autophagozytose im Vergleich zu proliferierenden Zellen beschrieben sind. Narita et al. beschreiben Kompartimente, in denen anabole und katabole Vorgänge parallel ablaufen können (Narita et al. 2011). Diese Strukturen bezeichnen sie als TASC-Komplex (engl.: *TOR-autophagy spatial coupling compartment*). Außerdem ist bekannt, dass postmitotische Zellen stärker auf Regenerationsprozesse angewiesen sind und deshalb in diesen Zellen auch sehr viel mehr Autophagozytose stattfindet (Weide und Huber 2011). Dies konnte auch für die humane Podozytenzelllinie, die in dieser Arbeit genutzt wurde, bestätigt werden (Abb. 14). Möglicherweise hat die vermehrte Autophagozytose zur Folge, dass mTOR in postmitotischen Zellen eine abgewandelte Funktion als z.B. in Tumorzellen hat, in denen es vor allem die Proliferation kontrolliert. Man kann vermuten, dass mTOR im Podozyten besonders für die stetige Neubildung von autophagosomalen- und lysosomalen Kompartimenten wichtig ist.

Abgesehen von dem erhöhten Basallevel an Autophagozytose wurden keine Unterschiede zu den zuvor an proliferierenden Zellen gewonnenen Ergebnissen festgestellt. Dies bedeutet, dass auch in ausdifferenzierten AB8 Zellen die Überexpression der daueraktiven Rab7-Mutante die mTOR-Reaktivierung nach Hungern inhibiert.

Da bereits bekannt ist, dass mTOR eine wichtige Rolle für den Podozyten spielt und dass eine Podozyten-Dysfunktion die Entstehung und Progression chronischer Nierenerkrankungen bewirken können (Gödel et al. 2011; Cina et al. 2012), kann man vermuten, dass die verminderte Rab7-GTPase-Aktivität im Prozess der Krankheitsentstehung eine Rolle spielt. In weiteren Studien wäre es interessant zu klären, ob Rab7-GAPs (engl.: *GTPase-Activating-Proteins*) mit erhöhter GTPase-Aktivität oder andere Agenzien, die die endogene Rab7-GTPase-Aktivität stimulieren,

ein therapeutischer Ansatzpunkt für die Therapie von chronischen Nierenerkrankungen darstellen können.

5.6 Ausblick

Um eine detailliertere Kenntnis über die Ursachen des Viabilitätsmindernden Effekts der Rab7 Q67L-Mutante im Podozyten zu erlangen, wäre zunächst die Untersuchung des lysosomalen pH-Werts der mutierten Zellen von Interesse. Zeigte sich dort tatsächlich eine verminderte Ansäuerung, könnte dies die defekte mTOR-Reaktivierung erklären. Neutralisierte Lysosomen wären nämlich nicht in der Lage, endozytotisch oder autophagosomal aufgenommene Proteine zu Aminosäuren zu degradieren. Die aminosäuresensitive Rekrutierung der mTOR-Kinase, die über die v-ATPase vermittelt wird (Zoncu et al. 2011), würde vermindert oder überhaupt nicht mehr stattfinden.

Neben der pH-Wert Messungen wäre es interessant den Einfluss der daueraktiven und dauerinaktiven Rab7-Mutationen auf weitere für den Podozyten wichtige Signalwege, wie z.B. den Hippo- oder den MAPK/ERK-Signalweg zu untersuchen. Möglicherweise sind auch Veränderungen in diesen Signalwegen für die verminderte Zellviabilität der Rab7-Mutanten von Bedeutung.

6 Literaturverzeichnis

1. Agola JO, Hong L, Surviladze Z, Ursu O, Waller A, Strouse JJ, Simpson DS, Schroeder CE, Oprea TI, Golden JE, Aube J, Buranda T, Sklar LA, Wandinger-Ness A (2012) A competitive nucleotide binding inhibitor: in vitro characterization of Rab7 GTPase inhibition. *ACS chemical biology* 7(6):1095–1108
2. Bechtel W, Helmstadter M, Balica J, Hartleben B, Kiefer B, Hrnjic F, Schell C, Kretz O, Liu S, Geist F, Kerjaschki D, Walz G, Huber TB (2013) Vps34 deficiency reveals the importance of endocytosis for podocyte homeostasis. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 24(5):727–743
3. Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S (2012) *Duale Reihe Physiologie*. Thieme, S. 290-310
4. Bruck K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Volzke H, Arnlov J, Kastarinen M, Guessous I, Vinhas J, Stengel B, Brenner H, Chudek J, Romundstad S, Tomson C, Gonzalez AO, Bello AK, Ferrieres J, Palmieri L, Browne G, Capuano V, van Biesen W, Zoccali C, Gansevoort R, Navis G, Rothenbacher D, Ferraro PM, Nitsch D, Wanner C, Jager KJ (2016) CKD Prevalence Varies across the European General Population. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 27(7):2135–2147
5. Bucci C (2000) Rab7: A Key to Lysosome Biogenesis. *Molecular biology of the cell* (Vol. 11):467–480
6. Bucci C, Bakke O, Progida C (2012) Charcot-Marie-Tooth disease and intracellular traffic. *Progress in neurobiology* 99(3):191–225
7. Caridi G, Lugani F, Dagnino M, Gigante M, Iolascon A, Falco M, Graziano C, Benetti E, Dugo M, Del Prete D, Granata A, Borracelli D, Moggia E, Quaglia M, Rinaldi R, Gesualdo L, Ghiggeri GM (2014) Novel INF2 mutations in an Italian cohort of patients with focal segmental glomerulosclerosis, renal failure and Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nephrology, dialysis, transplantation official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 29 Suppl 4: iv80-6
8. Cherry S, Jin EJ, Ozel MN, Lu Z, Agi E, Wang D, Jung W-H, Epstein D, Meinertzhagen IA, Chan C-C, Hiesinger PR (2013) Charcot-Marie-Tooth 2B mutations in rab7 cause dosage-dependent neurodegeneration due to partial loss of function. *eLife* 2:e01064
9. Chua CEL, Tang BL (2015) Role of Rab GTPases and their interacting proteins in mediating metabolic signalling and regulation. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 72(12):2289–2304

10. Cina DP, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, Arteaga J de, Jurisicova A, Quaggin SE (2012) Inhibition of mTOR disrupts autophagic flux in podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 23(3):412–420
11. Estacio RO, Schrier RW (2001) Diabetic nephropathy: pathogenesis, diagnosis, and prevention of progression. *Advances in internal medicine* 46:359–408
12. Flinn RJ, Yan Y, Goswami S, Parker PJ, Backer JM (2010) The late endosome is essential for mTORC1 signaling. *Molecular biology of the cell* 21(5):833–841
13. Gentil BJ, Cooper L (2012) Molecular basis of axonal dysfunction and traffic impairments in CMT. *Brain research bulletin* 88(5):444–453
14. Gödel M, Hartleben B, Herbach N, Liu S, Zschiedrich S, Lu S, Debreczeni-Mór A, Lindenmeyer MT, Rastaldi M-P, Hartleben G, Wiech T, Fornoni A, Nelson RG, Kretzler M, Wanke R, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Cohen CD, Hall MN, Rüegg MA, Inoki K, Walz G, Huber TB (2011) Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice. *J Clin Invest* 121(6):2197–2209
15. Greka A, Mundel P (2012) Calcium regulates podocyte actin dynamics. *Seminars in nephrology* 32(4):319–326
16. Hansen TE, Johansen T (2011) Following autophagy step by step. *BMC biology* 9:39
17. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Ruegg MA, Hall A, Hall MN (2004) Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology* 6(11):1122–1128
18. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, Janssen H, Wubbolts R, Neefjes J (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current Biology* 11(21):1680–1685
19. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV (2013) The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 304(4):F333-F347
20. Laplante M, Sabatini DM (2009) mTOR signaling at a glance. *Journal of cell science* 122(Pt 20):3589–3594
21. Li L, Kim E, Yuan H, Inoki K, Goraksha-Hicks P, Schiesher RL, Neufeld TP, Guan KL (2010) Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. *The Journal of biological chemistry* 285(26):19705–19709

22. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccio A, Sun T, Schmitt EM, Bernardi RJ, Fu X, Bland CS, Cooper TA, Schiff R, Rosen JM, Westbrook TF, Elledge SJ (2011) The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(9):3665–3670
23. Mundel P, Reiser J (2010) Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international* 77(7):571–580
24. Narita M, Young ARJ, Arakawa S, Samarajiwa SA, Nakashima T, Yoshida S, Hong S, Berry LS, Reichelt S, Ferreira M, Tavares S, Inoki K, Shimizu S, Narita M (2011) Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science (New York, N.Y.)* 332(6032):966–970
25. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M (2003) Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological Reviews* 83(1):253–307
26. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab Conversion as a Mechanism of Progression from Early to Late Endosomes. *Cell* 122(5):735–749
27. Robida-Stubbs S, Glover-Cutter K, Lamming DW, Mizunuma M, Narasimhan SD, Neumann-Haefelin E, Sabatini DM, Blackwell TK (2012) TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell metabolism* 15(5):713–724
28. Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas AL, Mohammed S, Heck AJR, Raposo G, van der Sluijs P, Bonifacino JS (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *The Journal of cell biology* 183(3):513–526
29. Romero RK, Peralta ER, Guenther GG, Wong SY, Edinger AL (2009) Rab7 activation by growth factor withdrawal contributes to the induction of apoptosis. *Molecular biology of the cell* 20(12):2831–2840
30. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)* 320(5882):1496–1501
31. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141(2):290–303
32. Schulze U, Vollenbroeker B, Braun DA, van Le T, Granado D, Kremerskothen J, Franzel B, Klosowski R, Barth J, Fufezan C, Wolters DA, Pavenstadt H, Weide T (2014) The Vac14-interaction network is linked to regulators of the endolysosomal and autophagic pathway. *Molecular & cellular proteomics MCP* 13(6):1397–1411

33. Scott RP, Quaggin SE (2015) Review series: The cell biology of renal filtration. *The Journal of cell biology* 209(2):199–210
34. Soda K, Balkin DM, Ferguson SM, Paradise S, Milosevic I, Giovedi S, Volpicelli-Daley L, Tian X, Wu Y, Ma H, Son SH, Zheng R, Moeckel G, Cremona O, Holzman LB, Camilli P de, Ishibe S (2012) Role of dynamin, synaptojanin, and endophilin in podocyte foot processes. *The Journal of clinical investigation* 122(12):4401–4411
35. Spinosa MR, Progida C, Luca A de, Colucci AMR, Alifano P, Bucci C (2008) Functional characterization of Rab7 mutant proteins associated with Charcot-Marie-Tooth type 2B disease. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 28(7):1640–1648
36. Stenvinkel P (2010) Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *Journal of internal medicine* 268(5):456–467
37. Stransky LA, Forgac M (2015) Amino Acid Availability Modulates Vacuolar H⁺-ATPase Assembly. *The Journal of biological chemistry* 290(45):27360–27369
38. Tagawa A, Yasuda M, Kume S, Yamahara K, Nakazawa J, Chin-Kanasaki M, Araki H, Araki S-I, Koya D, Asanuma K, Kim E-H, Haneda M, Kajiwara N, Hayashi K, Ohashi H, Ugi S, Maegawa H, Uzu T (2016) Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy. *Diabetes* 65(3):755–767
39. Toyofuku T, Morimoto K, Sasawatari S, Kumanogoh A (2015) Leucine-Rich Repeat Kinase 1 Regulates Autophagy through Turning On TBC1D2-Dependent Rab7 Inactivation. *Molecular and cellular biology* 35(17):3044–3058
40. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J (2006) Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *The New England journal of medicine* 354(13):1387–1401
41. Weide T, Huber TB (2011) Implications of autophagy for glomerular aging and disease. *Cell and tissue research* 343(3):467–473
42. Wiggins RC (2007) The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney international* 71(12):1205–1214
43. Yadav RB, Burgos P, Parker AW, Iadevaia V, Proud CG, Allen RA, O'Connell JP, Jeshtadi A, Stubbs CD, Botchway SW (2013) mTOR direct interactions with Rheb-GTPase and raptor: sub-cellular localization using fluorescence lifetime imaging. *BMC cell biology* 14:3

44. Zeeuw D de, Remuzzi G, Parving H-H, Keane WF, Zhang Z, Shahinfar S, Snapinn S, Cooper ME, Mitch WE, Brenner BM (2004) Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kidney international* 65(6):2309–2320
45. Zhang K, Fishel BKR, Osakada Y, Xu W, Sinit RS, Chen L, Zhao X, Chen JY, Cui B, Wu C (2013) Defective axonal transport of Rab7 GTPase results in dysregulated trophic signaling. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 33(17):7451–7462
46. Zhang M, Chen L, Wang S, Wang T (2009) Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Bioscience reports* 29(3):193–209
47. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM (2011) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, N.Y.)* 334(6056):678–683

7 Lebenslauf

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen meinen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Weide für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit. Vielen Dank für die vielen Erklärungen und Anregungen und die sehr zuverlässige und geduldige Unterstützung bei Fragen und Problemen während der gesamten Arbeit.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. Ulf Schulze für die Hilfe bei der Planung und Beurteilung von Versuchen- und Versuchsergebnissen.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. Hermann Pavenstädt für die initiale Vermittlung der Doktorarbeit.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Ursula Rescher, für die Zeit und den Aufwand mich als Zweitprüferin zu betreuen.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an die gesamte Molekulare Nephrologie, die durch ihre freundliche Arbeitsatmosphäre und die vielen Anleitungen und Tipps einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch danke ich meiner Familie für die Unterstützung und Anregungen während der Doktorarbeitszeit und für das Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich für die Förderung durch die Medizinische Fakultät Münster im Rahmen des MedK-Programmes bedanken.