Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II
Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Cyclin I und p35 bestimmen die subzelluläre Lokalisation der atypischen Cyclin-abhängigen Kinase 5

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Hans-Michael Kauerz
aus Köln

promoviert am 9. November 2018

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2018

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. P. T. Brinkkötter
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. rer. nat. M. Plomann

Erklärung:
Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Professor Dr. med. P. T. Brinkkötter
Herrn Dr. med. H. Hagmann

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 24/2011) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 24.04.2018

Die Versuche an stabilen HSMP-Zellinien sind von mir mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. H. Hagmann durchgeführt worden. Die übrigen in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. P. T. Brinkkötter und Herrn Dr. med. H. Hagmann von mir selbst ausgeführt worden.

Die Aufarbeitung der DNA-Fragmente im Rahmen der Sequenzierung von DNA-Abschnitten wurden als Dienstleistung für das Nephrologische Forschungslabor durch das Cologne Center for Genomics (CCG) durchgeführt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Professor Paul Thomas Brinkkötter für die Überlassung des Themas dieser Arbeit danken, sowie für die beharrliche Unterstützung in zahllosen Meetings zur Besprechen von Ergebnissen und Fortschritten sowie Planung der weiteren Experimente.

Meinem Betreuer Herrn Dr. Henning Hagmann gilt ebenso mein Dank für die engmaschige Begleitung und Unterstützung während meiner Zeit im Labor und auch danach in der Aufarbeitung der Ergebnisse sowie das Lektorieren dieser Dissertationsschrift.

Ich danke auch Herrn Universitätsprofessor Thomas Benzing und Herrn Professor Bernhard Schermer für die freundliche Aufnahme in das Nephrologische Forschungslabor, die mir so ermöglichten meine Versuche dort in angenehm kollegialer Atmosphäre durchzuführen.

Für die Beantwortung von unzähligen Fragen im Laboralltag sowie das Demonstrieren diverser Kniffe für Experimente danke ich meiner Arbeitsgruppe und besonders Dr. Christina Ising, Dr. Sebastian Brähler und Bettina Maar.

Meinen Mitdoktoranden Ricarda Schwarz, Johanna Janku und Alexander Kuczkowski danke ich für das gemeinsame Durchstehen auch von frustrierenden Zeiten mit negativen Ergebnissen.

Grundsätzlich gilt mein Dank dem gesamten Team des Nephrologischen Forschungslabors, das mich freundlich aufnahm und wo auch zu später Stunde stets bei Problemen ein offenes Ohr zu finden war und mit konstruktiven Ratschlägen zu einer Lösung beigetragen wurde.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie danken, die mich nicht nur während der Jahre im Studium und während der Promotionsarbeit umfänglich unterstützt hat und die mir immer mit besonnenem Rat zur Seite steht.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS **6**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **8**

1. EINLEITUNG **10**

1.1. DAS NEPHRON UND DER GLOMERULÄRE FILTER 11
1.2. PODOZYTEN UND IHR ANTEIL AN DER GLOMERULÄREN FILTRATIONSBARRIERE 14
1.3. DIE SCHLITZMEMBRAN 14
1.4. TRPC6 UND SEINE ROLLE IN PODOZYTEN 15
1.5. DIE ROLLE VON CDK5–P35 IM PODOZYTEN 18

2. ZIELE **20**

3. MATERIALIEN **21**

3.1. CHEMIKALIEN UND LABORBEDARF 21
3.2. PUFFER UND LÖSUNGEN 23
3.2.1. ENHANCED CHEMILUMINESCENCE (ECL) 25
3.3. MEDIEN 25
3.3.1. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN 25
3.3.1.1. LB-Medium und Agar-Platten 25
3.3.1.2. SOC-Medium 25
3.3.2. MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG EUKARYOTER ZELLEN 26
3.3.3. SELEKTIONSANTIBIOTIKA 26
3.4. ENZYME 27
3.5. VERBRAUCHSMATERIALIEN UND KITS 27
3.6. ANTIKÖRPER 28
3.7. PLASMIDE UND VEKTOREN 29
3.8. OLIGONUKLEOTIDE 30
3.9. EUKARYOTE ZELLEN 31
3.10. BAKTERIEN 32
3.11. SOFTWARE UND INTERNETBASIERTE PROGRAMME 32

4. METHODIK **33**

4.1. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN 33
4.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) 33
4.1.2. Restriktionsanalyse 34
4.1.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA 35
4.1.4. Elektrophorese im Agarosegel 35
4.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten 35
4.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten 36
4.1.7. Plasmidpräparation 36
4.1.8. Plasmidpräparation mit STET-Puffer 36
4.1.9. Sequenzierung 37
4.1.10. RNA-Isolierung aus eukaryoten Zellen 38
4.1.11. Reverse Transkription 38
4.1.12. Quantitative PCR 38
4.2. PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN 40
4.2.1. Immunpräzipitation 40
4.2.2. Lipid-Raft-Präparation 41
4.2.3. Zellfraktionierung 41
4.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 42
4.2.5. Western Blot 42
4.2.6. Immunologische Protein-Nachweise 42

4.2.7. Indirekte Immunfluoreszenz ... 43
4.3. ZELLBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN ... 44
4.3.1. Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Bakterien und eukaryoten Zellen ... 44
4.3.2. Transformation von Bakterien ... 45
4.3.3. Transfektion eukaryoter Zellen ... 45
4.3.4. Viraler Gentransfer zur Erstellung stabiler Zellinen ... 45
4.3.5. Herstellung von Lentiviren ... 46
4.3.6. Herstellung von Retroviren ... 46
4.3.7. Transduktion eukyrioter Zellen ... 46

5. ERGEBNISSE ... 48

5.1. DER MYRISTOL-ANKER VON P35 IST VERANTWORTLICH FÜR DIE LOKALISATION VON CDK5 IN DETERGENZ-RESISTENTE MEMBRANDOMÄNEN ... 48
5.2. IN ABWESENHEIT VON P35 REKRUTIERT MEMBRANASSOZIIERTES CYCLIN I ENDOGENES CDK5 IN DIE PLASMAMEMBRAN ... 50
5.3. CDK5 INTERAGIERT MIT TRPC6 UND PODOCIN ... 53
5.4. CDK5 MODULIERT DIE PROTEINSTABILITÄT VON TRPC6 ... 54

6. DISKUSSION ... 57

6.1. DER EINFLUSS VON CYCLIN I UND P35/P25 AUF DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON CDK5 57
6.2. CDK5 INTERAGIERT MIT SCHLITZMEMBRANPROTEINEN ... 58
6.3. BEEINFLUSST CDK5-P35 DIE STABILITÄT ODER DIE EXPRESSION VON TRPC6? ... 59
6.4. AUSBLICK ... 60

7. ZUSAMMENFASSUNG ... 61

8. LITERATURVERZEICHNIS ... 62

9. VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN ... 70

10. ANHANG ... 71

10.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS ... 71
10.2. TABELLENVERZEICHNIS ... 71

11. LEBENSLAUF ... 72

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTN 4	Actinin alpha 4
Ank	Ankyrin
b.Bd.	bei Bedarf
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bzw.	Beziehungsweise
CBD	Caveolin-Bindende-Domäne
CC	Coiled-Coil-Domäne
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CIRB	Calmodulin/IP3R-Bindende Domäne
CD16.7	Extrazelluläre Domäne von CD16 gefolgt von der Transmembrandomäne von CD7
CD2AP	cluster of differentiation 2-associated protein
Cdk5	Cyclin-dependent kinase 5 (Cyclin-abhängige Kinase 5)
cDNA	Complementary desoxyribo-nucleic-acid
CECAD	Cologne Cluster of Excellence in Cellular Stress Responses in Aging-associated Diseases
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAG	1,2-Diacylglycerine
DAPI	4’,6-diamidino-2-phenylindol
DEG	degenerin
dn	dominant negativ
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxyribonucleosid-5´-triphosphate
DRM	Detergenzienresistente Membrandomäne
ECL	Enhanced chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EnaC	epithelialer Natriumkanal
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EZ	Endothelzellen
FBS	Fetal Bovine Serum
FP	*foot processes* = Fußfortsätze von Podozyten
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
fsp	forward sequenzing primer
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	human
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat)-Säure
HRP	Horse Raddish Peroxidase
HSMP	Heat-sensitive mouse podocytes
IF	Immunfluoreszenz

INF2	Inverted formin 2
IP	Immunpräzipitation
IP3R	Inositol triphosphate receptor
KAP	Kapillarraum
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LR	Lipid Raft
m	mouse
M.	Morbus
MAP	mitogen-activated protein
MEC-2	mechanosensory protein 2
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
NDS	Normal Donkey Serum
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
OAG	1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol
PAA	Polyacrylamidacid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
pcDNA	plasmid cytomegalovirus promoter deoxyribonucleic acid
PCR	*Polymerase chain reaction,* Polymerasekettenreaktion
PKC	Protein kinase C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PWP	Proteinwaschpuffer
qc	quickchange
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleic Acid
RT	Raumtemperatur
rtPCR	reverse transkriptase-PCR
rsp	reverse sequenzing primer
s.	siehe
SD	*slit diaphragm* = Schlitzdiaphragma
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TRP	Transient receptor potential
TRPC	Transient receptor potential cation channel, subfamily C
TRPC6	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Die Niere ist im menschlichen Körper in viele unterschiedliche Funktionen involviert. Neben ihrer zentralen Rolle als essentielles Ausscheidungsorgan [93] beeinflusst sie auch den Wasser- und Elektrolythaushalt, den Mineralhaushalt von Phosphat und Kalzium, die Säure-Basen-Regulation und wirkt des Weiteren als endokrines Organ [101]. Für die Erfüllung ihrer Rolle als Ausscheidungsorgan hält die gesunde Niere ein steter Regulation unterworfenes Gleichgewicht zwischen Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Giftstoffen auf der einen Seite und Rückresorption bzw. Retention für den Körper essentieller Substanzen auf der anderen Seite aufrecht.

Weltweit sind etwa 5 % aller Menschen von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen. Im Endstadium entwickeln viele Patienten eine terminale Niereninsuffizienz, für die als häufigste Ursache Defekte in der glomerulären Filtrationsbarriere ausgemacht werden können [6]. Typisch für das Erscheinungsbild einer glomerulären Erkrankung und für Ärzte diagnostisch wegweisend, ist der Verlust von im Glomerulum nicht mehr zurückgehaltenen Plasmaproteinen über den Urin. Man spricht von Mikroalbuminurie und Proteinurie [61].

Eine Vielzahl von Erkrankungen kann entweder akut oder chronisch zu einer Abnahme der Ausscheidungsfunktion der Niere und somit einem Konzentrationsanstieg harnpflichtiger Substanzen im Blut führen, einer Urämie. Die hierfür typischen Symptome sind u.a. Hautjuckreiz, metabolische Azidose und urämische Enzephalopathie [36].

Je nach Lokalisation der Schädigung am Glomerulum kommt es zu unterschiedlichen klinischen Symptomausprägungen. Sind die Endothelzellen oder die glomeruläre Basalmembran (GBM) betroffen, so können große Blutbestandteile wie Erythrozyten ebenso wie Proteine in das Ultrafiltrat gelangen. Es kommt in diesem Fall zu einem nephritischen Syndrom bestend aus Proteinurie (<3,5 g/d), Hämaturie, Ödemen und Hypertonie. Sind primär die Podozyten geschädigt kommt es hingegen zu einem nephrotischen Syndrom bestehend aus den Symptomen Proteinurie (>3,5 g/d), Hypoproteinämie, Ödeme und Hyperlipoproteinämie.

Hauptursache für die Einleitung einer Dialyse in Deutschland war im Jahr 2013 für fast einem Viertel aller Patienten die diabetische Nephropathie. Einen ebenfalls großen Anteil an den zur Dialysepflicht führenden Grunderkrankungen stellt die Gruppe der Glomerulonephritiden sowie die Nephropathie als Folge einer arteriellen Hypertonie dar (Siehe Abbildung 1) [69].

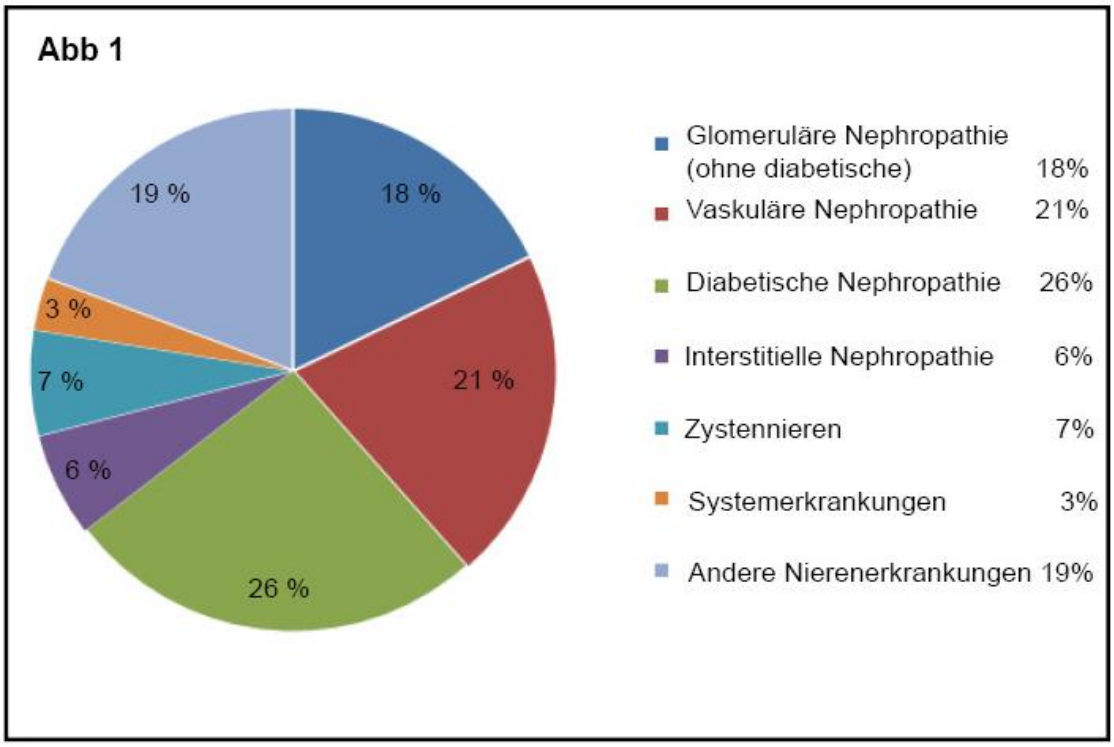

Abbildung 1: Renale Grunderkrankungen bei ständig dialysepflichtigen Patienten 2013 in Deutschland Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den Gemeinsamen Bundesausschuss **[69]**.

1.1. Das Nephron und der glomeruläre Filter

Der Grundbaustein des Filtrationsapparates der Niere ist das Nephron, bestehend aus Glomerulum und Tubulus. Rund 30 Kapillarschlingen bilden im Glomerulum ein Konvolut, in welchem das Blut durch einen dreischichtigen Filter ultrafiltriert und anschließend über den Tubulus abgeleitet wird. Hier wird der Primärharn nicht nur auf etwa 1 % seines ursprünglichen Volumens aufkonzentriert, sondern hier finden auch die meisten regulatorischen Vorgänge von Rückresorption essentieller Bestandteile und die Exkretion von Stoffwechselprodukten statt.

Jeden Tag werden in der Niere durch Filtration des Blutes im Glomerulum über 180 l Primärharn als Ultrafiltrat gebildet. Hierzu werden etwa 20% des Herzminutenvolumens durch die Kapillarschlingen des Glomerulums an dem dort lokalisierten glomerulären Filter vorbei geleitet. Dies entspricht einem Blutfluss von etwas über einem Liter Blut pro Minute. Es gibt Daten, die vermuten lassen, dass Mesangiumzellen einen Einfluss auf auf die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) haben, indem diese Zellen den hydrostatischen Druck innerhalb der afferenten Kapillaren regulieren [25, 32].

Ähnlich einem Sieb ist der Filter zwischen Blut und Urin nur durchlässig für Wasser und kleine, niedermolekulare Blutbestandteile. Moleküle mit einem Durchmesser > 4,4 nm, zu denen u. a. auch Albumin zählt, werden physiologisch hingegen kaum filtriert

[65]. Für den Gesunden ist die ordnungsgemäße Funktion dieses Filters überlebenswichtig [77].

Die Glomeruläre Filtrationsbarriere besteht aus mehreren Komponenten, von der jede Einzelne einen entscheidenden Einfluss auf die Ultrafiltration des Blutes hat. Auf Kapillarseite findet sich das fenestrierte Kapillarendothel, gefolgt von der, das Endothel bedeckenden glomerulären Basalmembran (GBM). Beide Schichten sind stark negativ geladen, das Endothel auf Grund einer negativ geladenen Glykokalix und die GBM durch ihre Zusammensetzung aus Laminin, Kollagen IV und Heparansulfat-Proteoglykanen. Schließlich sind auf Seiten des Bowman'schen Raumes hochspezialisierte Zellen anzutreffen, die Podozyten. Diese bilden mit ihren direkten Nachbarzellen interdigitierende Fußfortsätze aus, zwischen denen sich die sogenannte Schlitzmembran aufspannt (vgl. 1.3) [65]. Abbildung 2 zeigt zum einen schematisch den Aufbau der Schlitzmembran und dem gegenübergestellt nochmals ein elektronenmikroskopisches Bild.

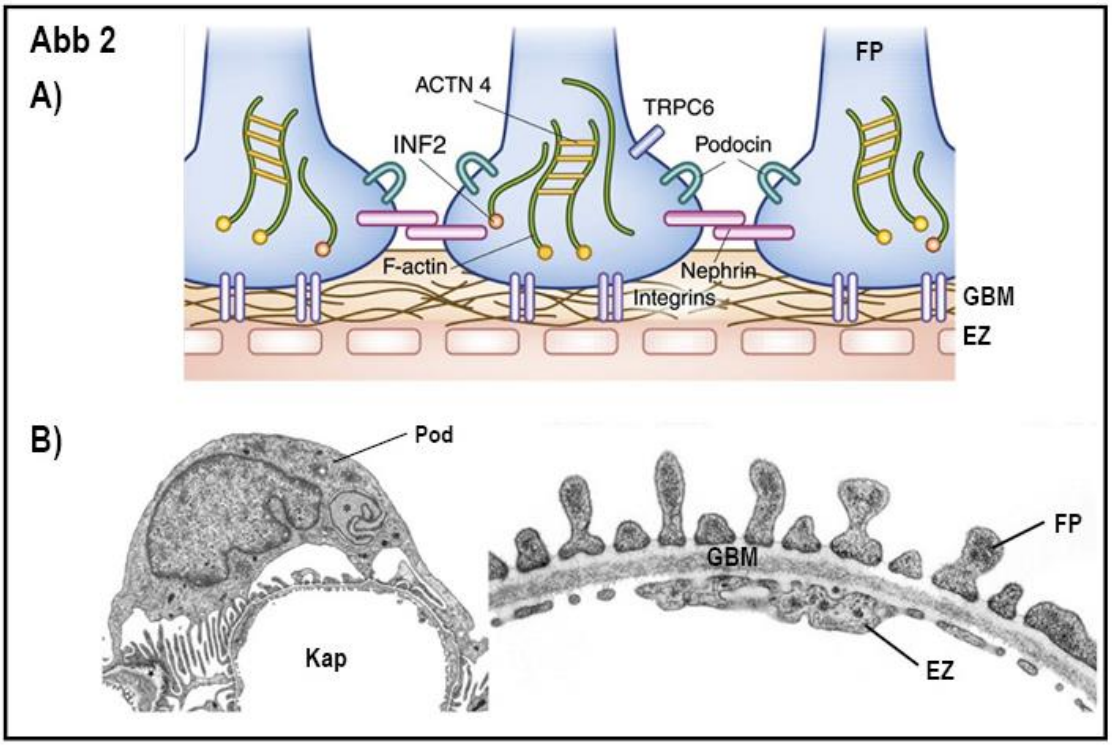

Abbildung 2: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere A) Schematischer Aufbau (Modifiziert nach Pollak et al. [83]) **B)** Elektronenmikroskopisches Bild des glomerulären Filters (Modifiziert nach Pavenstädt et al. [81]) EZ = Endothelzellen, fenestriert; GBM = Glomeruläre Basalmembran; FP = Fußfortsätze von Podozyten; Pod = Podozyt; Kap = Kapillarraum; ACTN 4 = Actinin alpha 4; INF2 = Inverted formin 2.

Obwohl in den vergangenen Jahren viele neue Erkenntnisse bezüglich des Aufbaues der Filtrationsbarriere erlangt werden konnten, ist die genaue Funktionsweise noch immer nicht vollständig geklärt. Daher bedient man sich verschiedener Modelle, mit Hilfe derer man versucht, die verschiedenen Prozesse besser zu verstehen.

Die zur Zeit meistgeteilte Schlitzmembran-Hypothese beschreibt eine größenselektive Filtration, die von endothelialer Seite über die GBM bis zu den Fußfortsätzen der Podozyten zunimmt. Demzufolge weist das fenestrierte Endothel die größten Durchlässe auf, die GBM bereits feinere Poren und schlussendlich die Fußfortsätze der Podozyten mit ihren interzellulären Zellverbindungen, dem Schlitzdiaphragma (SD), die feinsten Öffnungen (vgl. 1.2). Der Größenfilter wird in diesem Modell zudem durch eine Ladungsselekivität ergänzt, die über die negativen Ladungen der Glykokalix und GBM erzeugt wird. Dies führt zu einem zusätzlichen Rückhalt von negativ geladenen Molekülen [49, 65]. Ein rein auf diese Weise funktionierender Filter steht jedoch auf Grund der zunehmenden Gefahr des Verstopfens als eher unwahrscheinlich in der Kritik.

Eine weiteres Modell, das (Zwei-)Poren-Modell, beschreibt unterschiedlich ausgebildete Formen von Poren, von denen die eine Form größenselektiv nur für Wasser und Ionen passierbar ist und eine zweite Porenfom darüber hinaus auch für Proteine und sonstige Makromoleküle. Eine Störung der größeren Poren könnte ensprechend dieses Modelles eine Ursache für Proteinurie und Eiweißverlust liefern. [19, 71]. Eine Modifikation des Zwei-Poren-Modells wurde 2001 von Ohlson et al. veröffentlicht. Diese Modifikation besagt, dass eine Art Gelschicht in Form einer Glykokalix endothelseitig einem größenselektiven Membranfilter vorgelagert ist. Diese Glykokalix würde auf Grund einer Ladungsselektivität bereits > 90% des Plasmaalbumins zurückhalten und hierdurch einer Verstopfung der Poren entgegenwirken [74].

Die Gel-Hypothese wurde von Smithies aufgegriffen und nochmals modifiziert [98]. Er gibt eine Antwort auf die Frage, warum der glomuerläre Filter *in vivo* nicht verstopft. In allen vorigen Theorien würde eine Anreicherung von u.a. Albumin in den Poren des glomerulären Filters über kurz oder lang zu dessen Verstopfen führen. Die Gel-Diffusionshypothese besagt, dass die glomeruläre Basalmembran als Gel zu verstehen ist, welches die essentielle Größenselektivität des glomerulären Filters auf Grund von Diffusions- und Permeationseigenschaften bedingt. Die negative Ladung sei hier nachrangig, da große Moleküle wie z.B. Albumin durch größenselektive Poren entsprechend dem Zwei-Poren-Modell bereits zurückgehalten werden und anschließend das Gel wieder durch Diffusion zurück in den Kapillarraum verlassen.

1.2. Podozyten und ihr Anteil an der glomerulären Filtrationsbarriere

Bereits in den 1990er Jahren wurde die große Bedeutung der Podozyten an der normalen Nierenfunktion deutlich [57] und sie rückten den Fokus der Forschung.

Podozyten sind terminal differenzierte Zellen, die zahlreiche primäre und sekundäre Zellfortsätze ausbilden. Mit diesen bedecken sie als viszerale Epithelzellen fast vollständig die GBM der Kapillarschlingen. Diese einzelnen, auch Fußfortsätze (*foot processes, FP*) genannten Zellausläufer, verzahnen sich mit denjenigen der benachbarten Podozyten und bilden über die schmalen Schlitze zwischen den Zellen besondere Zell-Zell-Verbindungen aus. Diese Struktur aus Fußfortsätzen und spezialisierten Zellverbindungen wird Schlitzdiaphragma (*slit diaphragm, SD*) oder auch Schlitzmembran genannt und ist in ihrer Konfiguration die Grundlage für eine normale glomeruläre Filtration [82, 86, 88, 112].

In der Ausbildung der Fußfortsätze gleichen sich Podozyten und Neuronen in vielerlei Hinsicht. Sowohl im Aufbau des Actin-Zytoskelettes wie auch den an der Ausbildung der Zellfortsätze und Zell-Zell-Kontakten beteiligten Proteinen gleichen sich Neuronen und Podozyten [52, 53, 102]. Gleichzeitig ist für eine ordnungsgemäße Funktion der Podozyten nicht nur die initiale Ausbildung der Fußfortsätze und Zell-Zell-Kontakte essentiell, sondern zudem die stete Möglichkeit einer Modifikation des Zytoskeletts durch Anpassung der Actin- und Mikrotubili-Filamente [114] .

1.3. Die Schlitzmembran

Zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen der benachbarten Podozyten befindet sich ein komplexer, etwa 30-40 nm breiter Spalt, der von einem spezialisierten Zell-Zell-Kontakt überbrückt wird, welcher zentraler Bestandteil des Filters im Glomerulum ist. Verschiedene Proteine bilden dort die Schlitzmembran aus, von denen den größten Anteil Nephrin stellt. Nephrin ist ein Protein aus der Familie der Immunglobuline [6, 112] und bildet über seinen etwa 35nm langen extrazellulären Anteil vermutlich in Assoziation mit u.a. den Proteinen Neph1 und Neph3 Zell-Zell-Kontakte zu benachbarten Podozyten aus [35]. Hierdurch entstehen rechteckige Poren, deren geringer Durchmesser die Passage von Albumin aus den Kapillaren in den Bowman'schen Raum verhindert. Wartiovaara et al. konnten zeigen, dass eine Mutation in dem für Nephrin kodierenden Gen *NPHS1* einen Anteil an der Entstehung des nephrotischen Syndromes vom Finnischen Typ hat. Hier kommt es bereits *in utero* zu einer massiven Proteinurie auf Grund des Fehlens der Schlitzmembran [112].

Neben der Funktion als größen- und ladungsselektiver Filter regulieren Schlitzmembranproteine über Signaltransduktion auch intrazelluläre Vorgänge. Es konnte gezeigt werden, dass ohne funktionsfähiges Nephrin verstärkt Apoptose bei Podozyten auftritt [26]. Diese anti-apoptotische Wirkung erfolgt über eine Nephrin-vermittelte Aktivierung der regulatorischen Phosphoinositid-3-Kinase p85, eine konsekutiv gesteigerte Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und darüber eine Aktivierung der Serin-Threonin-Kinase AKT. Diese Kinase erhöht u.a. die Widerstandsfähigkeit von Podozyten auf apoptotische Stimuli und bedingt somit eine niedrigere Apoptoserate [38].

Durch Interaktion der an der Schlitzmembran vorliegenden Proteine wird zugleich eine Wirkungsverstärkung erzielt. So kann Nephrin in Gegenwart von Podocin, einem weiteren Schlitzmembranprotein, eine vierzigfach verstärkte Aktivierung des AP-1-Komplexes bewirken. Dies wird am ehesten über eine Erleichterung der Nephrin-vermittelten Signaltransduktion erreicht [39], sodass auf diese Weise ebenfalls eine Beeinflussung von Differenzierung, Proliferation und zuletzt auch Apoptose von Podozyten erfolgt.

Es ist bekannt, dass Mutationen in dem für Podocin kodierenden Gen NPHS2 die häufigste Ursache eines angeborenen nephrotischen Syndromes im Kindesalter darstellen [6, 40]. Die genauen molekularen Mechanismen sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass Podocin über eine Prohibitin (PHB)–homologe Domäne verfügt und in Podozyten zu jeder Zeit vorkommt. Die intrazelluläre Lokalisation in den Bereich der Schlitzmembran wird über eine zentral im Podocin gelegene, hydrophobe Region erreicht [41]. Durch die Bildung von Podocinmultimeren, welche ihrerseits große Mengen von Cholesterol an die Membran rekrutieren [91], und die Bindung von Podocin an die Schlitzmembranproteine CD2AP, Neph1 und Nephrin kommt es zur Bildung von Superkomplexen aus Proteinen und Lipiden, in sogenannten Lipid-Raft Mikrodomänen. Solche Mikrodomänen sind für die eine ordnungsgemäße Signaltransduktion zwischen Zellen u.a. an der Schlitzmemban aber auch an Neuronen von großer Bedeutung [91, 97].

1.4. TRPC6 und seine Rolle in Podozyten

Die Familie der TRP-Kanäle (*transient receptor potential channels*) stellt eine evolutionär konservierte Gruppe von Kationen-Kanälen dar, die sich sowohl in Zellen von Wirbeltieren als auch in Zellen klassischer Modellorganismen wie der Fliege *Drosophila melanogaster* (Drosophila), dem Wurm *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) oder auch dem Fisch *Danio rerio* (Zebrafisch) findet [110]. TRP-Kanäle sind unter anderem im Bereich der Reizwahrnehmung in Nervenzellen involviert, Beispiele

hierfür sind bei Drosophila die Lichtwahrnehmung [33] und die Geruchswahrnehmung [111] oder bei C. elegans in die Mechanosensation [51]. Auch in die Temperaturwahrnehmung [20] und Nociception [106] sind TRP-Kanäle involviert. In Zellen, die nicht direkt dem Nervensystem zuzuordnen sind, erfüllen TRP-Kanäle ebenfalls sehr vielfältige Aufgaben und haben unter anderem einen Einfluss auf Proliferation, Angiogenese, Migration oder auch Apoptose.

Ein Beispiel für einen sowohl in Nervenzellen wie auch in der Niere vorkommenden TRP-Kanal ist TRPC6 (*transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6*). Ein funktioneller Kanal ist aus vier Untereinheiten zusammengesetzt. Jede Untereinheit besitzt sechs Transmembrandomänen und sowohl der Carboxyl- wie auch der Amino-Terminus liegen intrazellulär [17]. Ähnlich anderer TRPC-Kanäle vermittelt TRPC6 als unselektiver Kationenkanal einen Calciumioneneinstrom in die Zelle. Die eigentliche Kanalpore wird zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne gebildet (s. Abbildung 3). Im Bereich des N-Terminus finden sich drei Ankyrin-Wiederholungen, eine Coiled-Coil-Domäne sowie eine Caveolin-Bindende Domäne. Das C-Terminale Ende beinhaltet das typische TRP-Motiv (EWKFAR), eine Calmodulin/IP3R-Bindende Domäne sowie eine weitere Coiled-Coil-Domäne.

In den vergangenen Jahrzehnten konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden, dass die Kanalaktivität von TRPC6 im Podozyten einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung einer Fokalsegmentalen Glomerulosklerose (FSGS) hat. So konnten bei Patienten mit einer hereditären Form der FSGS bisher rund 21 unterschiedliche Mutationen im TRPC6-Gen nachgewiesen werden [83, 115]. Es handelt sich hierbei sowohl um Loss-of-funktion-Mutationen [84] , wie auch um Gain-of-funktion Mutationen [24, 115]. Erstere führen durch eine verminderte Kanalaktivität zu einem verringerten Ca^{2+}- Ioneneinstrom, letztere erhöhen die Kanalaktivität.

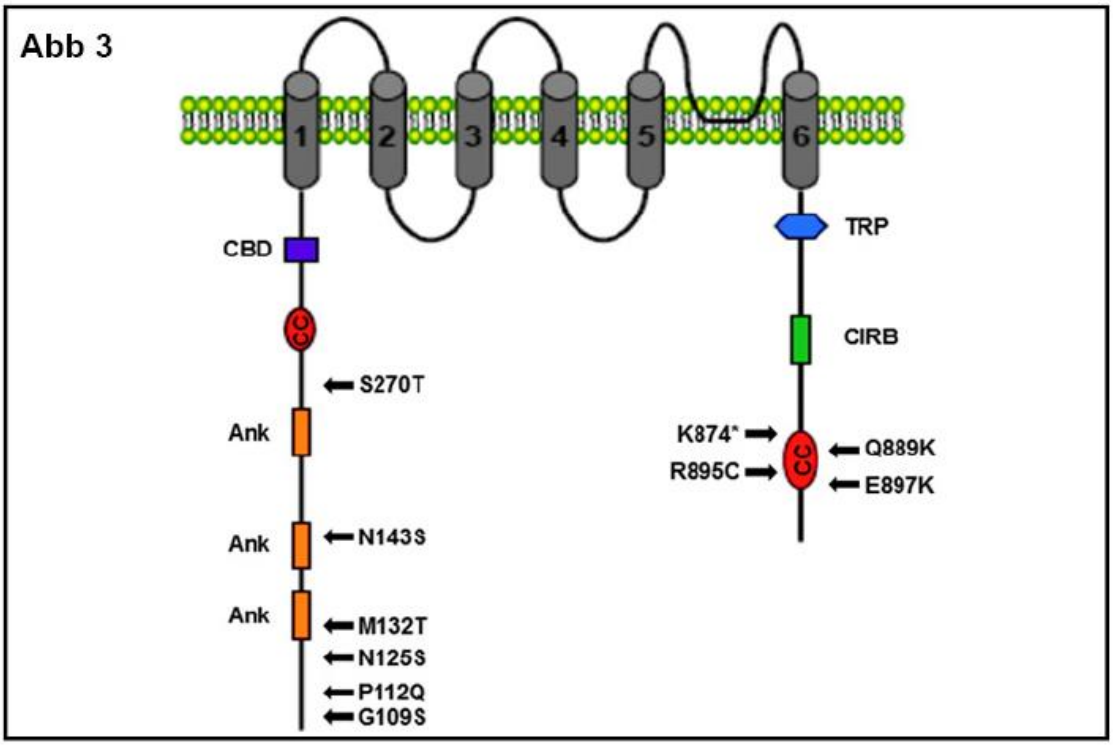

Abbildung 3: Schematische Darstellung der TRPC6-Kanalstruktur Sowohl N-Terminus wie auch C-Terminus von TRPC6 befinden sind intrazellulär. 1-6 = Transmembrandomänen, Ank = Ankyrin, CC = Coiled-Coil-Domäne, CBD = Caveolin-Bindende-Domäne, TRP = TRP-Motiv, CIRB = Calmodulin/IP3R-Bindende Domäne, nach Ma et al. **[66]**

Interessanterweise wurde bereits beobachtet, dass TRPC6 auch an der Regulation der Vasokonstriktion von Arterien beteiligt ist [113]. Dass es sich bei TRPC6 ähnlich wie bei MEC-4 und MEC-10 aus C. elegans um einen mechanosensitiven Ionenkanal handelt, der zudem auch über Second Messenger-Aktivierung wie z.B. nach DAG-Freisetzung aktiviert werden kann, wurde in den letzten Jahren gezeigt [8]. In Verbindung mit den Erkenntnissen über die kontraktilen Elemente im Zytoskelett von Podozyten in Form von Aktin, Myosin-II, α-Aktin, Vincullin und Paxillin [23, 42] wurde von Spassova et al. [100] postuliert, dass der Podozyt über TRPC6 Änderungen des Druckverhältnisses in der Bowman-Kapsel detektieren und aktiv hierauf reagieren kann. Dies würde den Podozyten über zytoskelettale Veränderungen eine Aufrechterhaltung konstanter Filtrationsbedingungen ermöglichen.

Im Bereich der Schlitzmembran scheint TRPC6 eng mit u.a. Nephrin und Podocin assoziiert zu sein. So konnte durch Vordaten des Nephrologischen Forschungslabores gezeigt werden, dass Podocin einen direkten Einfluss auf die TRPC6-Kanalaktivität hat [55] und u.a. auch Nephrin für die Phosphorylierung von TRPC6 mit verantwortlich ist [48].

1.5. Die Rolle von Cdk5–p35 im Podozyten

Podozyten und Neuronen gleichen sich in vielerlei Hinsicht. Beide sind terminal differenzierte, postmitotische Zellen und bilden mikrotubuli- und actin-basierte stark verzweigte Zellfortsätze aus. Außerdem weisen sie für viele, in die Signaltransduktion bzw. den transmembranären Transport involvierte Proteine ein vergleichbares Expressionsmuster auf [102].

Die Zyclin-abhängige Kinase 5 (*Cyclin dependant kinase 5*, Cdk5) gehört als Prolin-gerichtete Serin/Threonin Kinase zur Familie der vor allem in den Zellzyklus involvierten Zyklin-abhängigen Kinasen [21]. Entgegen jedoch den anderen Mitgliedern dieser Familie, wie z.B. Cdk1 und Cdk2, ist Cdk5 kaum in der Vorbereitungsphase der Mitose aktiv, sondern insbesondere in postmitotischen Zellen.

Aus Forschungsergebnissen an Neuronen ist bekannt, dass Cdk5 unter anderem an der Regulation von Synapsenbildung, Transmitterfreisetzung Veränderungen des Zytoskelettes, dem Wachstum von Zellfortsätzen sowie Zellmigration und Zellorganisation beteiligt ist [15, 29, 50, 70, 79, 81, 107]. Eine fehlerhafte Funktion von Cdk5 oder dessen Aktivatoren sorgt nachweislich zu einer fehlerhaften Architektur von Neuronen im Gehirn und Störung in der Ausbildung sowie dem Längenwachstum von Axonen [37, 58, 67, 78]. Dies ist mit neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer [96], M. Parkinson [7], M. Huntington [75] und auch Amyotropher Lateralsklerose [73] assoziiert, sodass Cdk5 bereits für diese Erkrankungen als mögliches Ziel einer medikamentösen Therapie im Rahmen der künftigen Forschung diskutiert wird [89].

Neben der vornehmlich postmitotischen Aktivität von Cdk5 ist dessen Aktivität nicht von den klassischen Zyklinen abhängig, die entgegen anderer Cdk an Cdk5 zwar eine Bindung, jedoch keine Aktivierung vermitteln [62]. Das zu den Zyklinen G und E homologe Zyklin I aktiviert Cdk5, ist jedoch selbst auch nicht direkt in den Zellzyklus regulatorisch involviert [9, 45, 72]. Weitere Aktivatoren von Cdk5 sind p35, p39 und p67. Diese unterscheiden sich zwar stark von den klassischen Zyklinen, sind jedoch in der Lage Cdk5 spezifisch zu aktivieren. Auf Grund eines N-terminal angelagerten Myristoyl-Ankers erfolgt die subzellulare Lokalisation von p35 und p39 an die Zellmembran [21, 22], wohingegen p67 ohne diese Myristoylierung im Zytoplasma verteilt vorliegt [95]. In Podozyten wird p39 im Gegensatz zu Neuronen nicht exprimiert [2, 27] Ebenfalls wird die Aktivität von Cdk5 durch hohe Glukosekonzentrationen über eine Vermittlung von Wachstumsfaktoren mittels des ERK1/2/PPARγ-Signalweges in Podozyten gesteigert und verursacht darüber hinaus Tubulointestinale Fibrose [5, 119].

Dass die Ergebnisse von Neuronen auf Podozyten übertragbar sind und Cdk5 eine regulatorische Rolle in Proliferation, Differenzierung und Zellmorphologie spielt, konnte von Griffin et al. [27] gezeigt werden. Der essentielle Einfluss von Cdk5 auf Reparaturmechanismen und Apoptose wurde in mehreren Arbeiten nachgewiesen. Sowohl eine Aktivierung von Cdk5 durch Cyclin I wie auch durch p35 steuert das Überleben von Podozyten [10, 11, 103], gleichzeitig steigt die Apoptoserate bei Knock-down von Cdk5 oder p35 an [120]. Diese Effekte treten durch Beeinflussung der Signaltransduktion von MEK/ERK-MAP-Kinasen mit konsekutiver Regulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL. Es erfolgt eine Phosphorylierung des Serins an Postion 70 von Bcl-2 durch Cdk5-p35 mit nachfolgender Stabilisierung des Proteins und Steigerung der Wiederstandsfähigkeit der Zelle gegen extrazelluläre apoptotische Stimuli [9, 11, 28]. Im Rahmen dieser Studien wurde auch festgestellt, dass Cyclin I sowohl die mRNA-Konzentrationen von Bcl-2 wie auch Bcl-xL beeinflusst, wohingegen für p35 ein Einfluss nur für Bcl-2 beobachtet wurde [9].

In Neuronen konnte ein enger Zusammenhang zwischen der Cdk5-p35-Aktivität und Actin beobachtet werden. So scheint z.B. F-actin die Aktivität von Cdk5-p35 zu inhibieren wohingegen G-actin hier keinen Einfluss aufweist [34, 116] . Dies konnte ebenfalls auf Podozyten übertragen werden, wobei beobachtet wurde, dass hier auch TRPC6 einen direkten Einfluss auf dynamische Veränderungen am Actin-Zytoskelett im Rahmen der Differenzierung von Podozyten hat [64].

Eine verminderte Aktivität von Cdk5 resultierte in Podozyten morphologisch in einer deutlich reduzierten Ausbildung von Zellfortsätzen sowie einer allgemeinen Formveränderung der Zellen [27]. In Tierstudien konnte an p35(-/-)- und Cyclin I(-/-)-Mäusen gezeigt werden, dass dies klinisch mit einer Abnahme der Podozytenzahl im Glomerulum, einer Zunahme an Proteinurie sowie Glomerulosklerose einherging [103]. Ein vollständiger knock-down von CDK5 führt zu Apoptose von Podozyten [120].

Das typische, Prolin-vermittelte Phosphorylierungsmotiv von Cdk5, (S/T)PX(K/H/R), findet sich im Podozyten bei mehreren Proeinen der Schlitzmembran. Hierzu gehören neben TRPC6 auch Podocin und Nephrin. Interessanterweise gehört dieses Motiv zu den häufigsten Prolin-vermittelten Phosphorylierungsmotiven in Podozyten [85].

2. Ziele

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von Cdk5 in Abhängigkeit von seinen Aktivatoren p35 und Cyclin I mit den folgenden Schwerpunkten untersucht:

1. Analysen zur subzellulären Lokalisation von Cdk5
2. Die Charakterisierung der Interaktion von Cdk5 mit Schlitzmembranproteinen wie TRPC6 und Podocin
3. Einfluss der Cdk5-Aktivität auf die Expression von TRPC6

3. Materialien

3.1. Chemikalien und Laborbedarf

Tabelle 2: Chemikalien und Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Leiter	Peqlab
100 bp DNA Leiter	Peqlab
2-Propanol	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat)-Säure (HEPES)	Sigma
6x DNA Loading Dye Solution	Peqlab
Agarose	Peqlab
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumper(oxodi)sulfat	Merck
Bovines Serum Albumin	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich
Dextrose	Roth
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
Dithio-1,4-threitol	Sigma-Aldrich
dNTP	Novagen
Doxorubicin	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid 1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Promega
Glycin	Roth
Interferon-γ	Thermo Fisher Scientific
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
KOD-Puffer	Novagen
Kollagen A	1 mg/ml, 4°C, Merck
Kollagen I	1 mg/ml, 4°C, Invitrogen
LB-Medium	Roth
L-Glutamin	GIBCO

Luminol	Fluka
M2-Beads (anti-FLAG)	1:2 in Sepharose, Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Natriumbicarbonat-Lösung 7,5 %	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat	Sigma
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Nonylphenyl-polyethylen-glycol (NP-40)	Sigma-Aldrich
Normal donkey serum	Jackson
NEB Restriktionsenzym Puffer 1-4 & EcoRV	NEB
Page Ruler Plus Prestrained Protein Ladder	Fermentas
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Prolong DAPI) 4',6-diamidino-2-phenylindol	Invitrogen
Sucrose	Sigma
Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich
Tetranatriumdiphosphat	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Triton X-100	Merck
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck

3.2. Puffer und Lösungen

Die für diese Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser (doppelt-destilliertem Wasser) angesetzt. Darüber hinaus wurden die für die molekularbiologischen Arbeiten sowie für die Zellkultur verwendeten Puffer und Lösungen sterilfiltriert oder bei 121 °C autoklaviert. Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	**Hersteller / Zusammensetzung**
HEBS 2x-Lösung *4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat)*	50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10mM KCl, 1,5 mM Na_2HPO_4; 12 mM Dextrose, Gebrauchslösung: 4°C, Lagerung: -20 °C
Acrylamid-Lösung	Rotiphorese Gel 40, Bisacrylamid (37, 5:1), Roth, 4°C
Calciumchloridlösung	0,25 M
Colloidal Coomassie Gebrauchslösung	Colloidal Coomassie Stammlösung + 20 % Methanol
Colloidal Coomassie Stammlösung	1 g Coomassie brilliant blue (G-250), 100 g $(NH_4)_2SO_4$, 30 ml H_3PO_4, ad 1 l ddH_2O
Dulbecco's PBS	PBS + 1 mM Ca^{2+} und 0,5 mM Mg^{2+}
IP-Puffer Gebrauchslösung	IP-Puffer Stammlösung + 0,25 mM PMSF + 2 mM Na_3VO_4, 4°C
IP-Puffer Stammlösung	1 % Triton X-100; 50 mM NaCl, 50 mM NaF; 20 mM Tris/HCl ph 7,5; 15 mM $Na_4P_2O_7$, 4 °C
Lämmli-Probenpuffer 2x	0,1 M Tris pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20 % (v/v) Glycerol; 0,2 % Bromphenolblau; 0,1 M DTT
Lipid-Raft-Puffer Gebrauchslösung	Lipid-Raft-Puffer Stammlösung + 1 % Triton X-100 + 5 mM Na_3VO_4 + 0,25 mM PMSF, 4°C
Lipid-Raft-Puffer Stammlösung	150 mM NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,1 mM EDTA, in ddH_2O, 4 °C
Natriumbikarbonat-Lösung	0,1M Na_2CO_3 in ddH_2O, Lagerung 4 °C
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	100 mM Stammlösung, Sigma-Aldrich, -20 °C

PAA-Sammelgel-Puffer	500 mM Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS
PAA-Trenngel-Puffer	1,5 mM Tris/HCl; 0,4 % (w/v) SDS
PAGE-Laufpuffer	2 M Glycin, 1,0% (w/v) SDS, 250 mM Trizma Base
PBST	Dulbecco's PBS + 0,1 % Triton X-100
Phosphate Buffered Saline (PBS)	136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,25 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4
PMSF	10 mg/ml in 100 % EtOH, -20 °C
Protein-Laufpuffer	2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, 250 mM Trizma Base
Protein-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
RNAse Wasser	10 mg/ml RNAse in H_2O; 4 °C
STET-1-Lösung	40 g Sucrose; 5 ml Triton X-100; 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 25 ml 1M Tris pH 8,0; 380 ml H_2O
STET-2-Lösung	10 mg/ml Lysozym in STET-1-Lösung; -20 °C
Sucrose 5 %	5 % (w/v) Sucrose in Lipid Raft Ansatzlösung, Lagerung bei 4°C
Sucrose 30 %	45 % (w/v) Sucrose in Lipid Raft Ansatzlösung, Lagerung bei 4°C
Sucrose 90 %	90 % (w/v) Sucrose in Lipid Raft Ansatzlösung, Lagerung bei 4°C
TAE-Puffer Gebrauchslösung	80 ml TAE-Puffer Stammlösung, 200 µl Ethidiumbromid-Lösung 1 %; mit H_2O auf 3,6 Liter auffüllen
TAE-Puffer Stammlösung	121g Trizma Base; 28,5 ml Eisessig; 18,6 g Na_2EDTA $2xH_2O$; mit H_2O auf 1 Liter auffüllen
Transferpuffer	25 mM Tris pH 8,3; 0,1 % SDS; 192 mM Glycin; 20 % Methanol, 4°C
Zellfraktionierungspuffer (hypoton)	10mM HEPES, 1.5mM MgCl2, 10mM KCL, 0,5 mM DTT, 0.05% NP-40, pH 7.9

3.2.1. Enhanced chemiluminescence (ECL)

Wir stellten die für die Peroxidasereaktion der verstärkten Chemilumineszenz (ECL, enhanced chemiluminescence) benötigten Lösungen selber im Labor her. Die genauen Pipettiervolumina sowie die Konzentrationen in der finalen ECL-Lösung können Tabelle 1 entnommen werden. Die Lagerung der Lösungen A und B erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C für maximal zwei Tage. Die Coumarinsäure und das lichtempfindliche Luminol wurden bei -20 °C gelagert.

Zur vollständigen Benetzung einer PVDF-Membran ist ein Gesamtvolumen von 2 ml ausreichend, hierzu vermischt man die beiden Lösungen im Verhältnis 1:1.

Tabelle 4: Pipettiervolumina für ECL

Ausgangs-komponenten	**Pipettiervolumen**		**Endkonzentration**
	Lösung A	**Lösung B**	
H2O	17,7 ml	18 ml	
30% H2O2	---	12 µl	1,5 %
1M Tris/HCl pH 8,5	2 ml	2ml	100 mM
Coumarinsäure	88 µl	---	0,4 mM
Luminol	200 µl	---	2,5 mM

3.3. Medien

Alle verwendeten Medien wurden, sofern nicht anders vermerkt, sterilfiltriert oder autoklaviert. Die Lagerung von LB-Medium und Agar-Platten erfolgte bei 4 °C.

3.3.1. Medien zur Kultivierung von Bakterien

3.3.1.1. LB-Medium und Agar-Platten

20g Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) wurden in einem Liter H_2O zur Herstellung einer Flüssigkultur gelöst. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand des verwendeten Plasmides entsprechend ausgewählt (s. Abschnitt 3.3.3). Analog zum LB-Medium wurden LB-Agarplatten unter Verwendung von 20 g/l Agar hergestellt.

3.3.1.2. SOC-Medium

2 % (w/v) BactoTM-Trypton (Difco), 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt und 10 mM NaCl wurden mit 2,5 mM KCl vermischt. Der pH wurde auf 7,0 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlen auf ungefähr 60 °C wurde unter der Sterilwerkbank 10 mM $MgCl_2$ sowie 20 mM Glucose hinzugefügt, aliquotiert und das Medium anschließend bei -20 °C gelagert.

3.3.2. Medien zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Tabelle 5: Medien zur Kultivierung eukaryoter Zellen

Bezeichnung	Hersteller / Zusammenstellung
HEK 293T Zellkulturmedium	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma) + 10% FBS
Podozyten Zellkulturmedium (HSMP++++-Medium)	RPMI 1640 (Sigma) + 10% FBS + 10 mM HEPES (Sigma) + 0,075 % $C_3H_3NaO_3$ (Sigma) + 1 mM $NaHCO_3$ (Sigma)
FBS (Kälberserum)	BioChrom AG
Trypsin-Lösung	0,5 g/L porcines Trypsin und 0,2 g/L EDTA•4Na in Hank's Balanced Salt-Solution mit Phenolrot, 1X (Sigma)

3.3.3. Selektionsantibiotika

Zur Selektion transduzierter bzw. tranfektierter Zellen wurden die entsprechenden Flüssig- bzw. Festmedien mit den in Tabelle 5 genannten Antibiotika entsprechend des verwendeten Grundvektors versetzt.

Tabelle 6: Selektionsantibiotika

Plasmid	Selektionsantibiotikum	
	Eukariote Zellen	Bakterien
pcDNA6	Blasticidin	Ampicillin
plenti 6.3	Blasticidin	Blasticidin
pbabe	Puromycin	Ampicillin
pENTR	---	Kanamycin

3.4. Enzyme

Alle Enzyme wurden entsprechend der Herstellerangaben verdünnt und bei -20 °C gelagert. Die Ausführung der Experimente erfolgte auf Eis.

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Hersteller
KOD Hot Start Polymerase	Novagen
Lysozym	Roth
Proteinkinase K	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Promega
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs,
RNAse	Fermentas
Pfu Ultra Polymerase	Stratagene
SYBR® Green MIX	Thermo Fisher Scientific

3.5. Verbrauchsmaterialien und Kits

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Proteinkonzentrationsbestimmungs Kit	Pierce
Blottingpapier	Whatman
Deckgläser (rund, 9mm Ø)	Roth
ECL-Filme	FUJIFILM Super RX
GeneJet ™ Gelextraktions-Kit	Fermentas
GeneJet ™ PCR-Aufreinigungs-Kit	Fermentas
GeneJet ™ Plasmid Miniprep-Kit	Fermentas
GeneJuice	Novagen
MidiPrep Kit	Machery & Nagel
Petrischalen für die Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt, Sorensen
Plastikschalen für die Podozyten-Zellkultur, 33 °C	BD Falcon
Plastikschalen für die Zellkultur 37 °C	Corning
Power SYBR Green–Mix	Applied Biosystems
PVDF-Immobilion Membran (0,45 µm)	Millipore
Quiazol Lysis Reagent	Qiagen

Reaktionsgefäße	Eppendorf sowie Sarstedt
RNeasy Mini Kit	Quiagen
Objektträger	VWR
OneStep RT-PCR Kit	Quiagen
Spritzen	BD
Spritzenfilter für Virusmedium (steril, 0,45 µm Porengröße)	Roth
Sterilfilter	Millipore
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon

3.6. Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper wurden entsprechend der Herstellerangaben gelöst und gelagert sowie entsprechend der Herstellerangaben für die Versuche verdünnt.

Tabelle 9: Primärantikörper

Antigen	Klonalität	Spezies	Hersteller
14-3-3 β	Polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz
CD71 (Transferrinrezeptor)	Monoklonal	Maus	Molecular Probes
Cdk5	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling
Cyclin I	Polyklonal	Kaninchen	GeneTex
Fibrillarin	Polyklonal	Kaninchen	Abcam
Flag	Polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich
Flag (M2)	Monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich
Flotillin-2	Monoklonal	Maus	St. Cruz
Myc (9B11)	Monoklonal	Maus	Cell Signalling
Phospho-Ser CDK Substrate	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signalling
Phospho-Thr CDK Substrate	Monoklonal	Maus	Cell Signalling
TRPC6	Polyklonal	Kaninchen	Millipore
V5	Monoklonal	Maus	Serotec
V5	Polyklonal	Kaninchen	Millipore
β-Actin	Monoklonal	Maus	Cell Signalling
β-Tubullin	Polyklonal	Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle 10: Sekundärantikörper

Antigen	Markierung	Spezies	Hersteller
Anti-Kaninchen-Fc	HRP	Ziege	DAKO
Anti-Maus-Fc	HRP	Ziege	DAKO
Anti-Maus-Fc (Leichtketten-spezifisch)	HRP	Ziege	Jackson
Anti-Kaninchen-Fc	Cy™3	Ziege	Jackson

3.7. Plasmide und Vektoren

Tabelle 11: Plasmide und Vektoren

Name	Vektor	Referenz
CD16.7	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
CD16.7.myc.Cyclin I	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
CDK5.FLAG	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
FLAG.GFP	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
FLAG.pcDNA6	pcDNA6	Invitrogen
hCDK5	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
hCDK5 dn (D144N)	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
hCDK5.FLAG	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
hCDK5.FLAG D144N	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
hCdk5-WT.2A.p25.myc	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
hCdk5-WT.2A.p35.myc	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
hp35.myc	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
mCyclinI.myc	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
myc.mCyclinI	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
p25.myc	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
p35.V5	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
pcDNA6.FLAG	pcDNA6	Invitrogen
pDest	pDest	Invitrogen
pLenti 6.3_p35.V5/GW	pLenti6.3	Nephrologisches Forschungslabor
pLenti6.3/ V5 DEST	pLenti6.3	Invitrogen
pMD2 VSV-G		Nephrologisches Forschungslabor
pMDL g/p		Nephrologisches Forschungslabor
pRSV rev		Nephrologisches Forschungslabor
V5.GFP pcDNA6	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
V5.EPS (EPS15L1)	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
V5.hPodocin	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
V5.hTRPC6	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor

V5.hTRPC6 S282A	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
V5.hTRPC6 S4A	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
V5.hTRPC6 S769A	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
V5.hTRPC6 T221A	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit
V5.mPodocin	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
V5.pcDNA6	pcDNA6	Invitrogen
V5.TRPC6 wt	pcDNA6	Nephrologisches Forschungslabor
V5.TRPC6-S14A	pcDNA6	Kloniert i.R. dieser Arbeit

3.8. Oligonukleotide

Für die PCR-Ansätze wurden die nachfolgend aufgeführten Primer verwendet. Der Hersteller war die biomers.net GmbH. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C in 10 mM Tris-Puffer entsprechend der Herstellerangabe.

Tabelle 12: Übersicht PCR-Primer

Name	Sequenz (5‘ → 3‘)	Verwendung
hTRPC6 1079 fsp	gcc caa atc tca gcc g	Sequenzierung
hTRPC6 1102 fsp	ctt gcc att aaa tat g	Sequenzierung
hTRPC6 1502 fsp	ctt gcc att aaa tat g	Sequenzierung
hTRPC6 1902 fsp	ctt caa gtt cat gg	Sequenzierung
hTRPC6 201 fsp	gcg gca gac agt tct cc	Sequenzierung
hTRPC6 2302 fsp	ccg agt cca aag tcc	Sequenzierung
hTRPC6 601 fsp	ctc cag caa gat g	Sequenzierung
hTRPC6 Mlu Kozak 1	cgc ggg acg cgt acc atg agc cag agc ccg gcg ttc gg	Clonierung
hTRPC6 mlul kozak fp	ata att acg cgt gcc acc atg agc cag agc ccg gcg ttc ggg	Clonierung
mTRPC6 mlu 1 fp	cgc tta acg cgt atg agc cag agc ccg agg	Clonierung
mTRPC6 qPCR fp	agc tcc cgc tgc cac cgt at	qPCR
mTRPC6 qPCR rp	gaa tcg tct gcc gcc ggt ga	qPCR
pBabe-puro fsp	ctt tat cca gcc ctc ac	Sequenzierung
		Abw. Hersteller: Addgene
pBabe-puro rsp	cct aac tga cac aca ttc	Sequenzierung
		Abw. Hersteller: Addgene
pcDNA6 (-mlu) fsp1	cgt gta cgg tgg gag gtc ta	Sequenzierung
pcDNA6 (-mlu) rsp 1	agg aaa gga cag tgg gag tg	Sequenzierung
pLenti6 CMV fsp	cac caa aat caa cgg gac tt	Sequenzierung
pLenti6 rsp	CGG GAC TAT GGT TGC TGA CT	Sequenzierung
V5.TRPC6 S14A qc fp	cgg gcc ccg gag ggg cag tgc tcc gcg ggg cgc tgc cgg agc cgc tgc gc	Quickchange

V5.TRPC6 S14A qc rp	gcg cag cgg ctc cgg cag cgc ccc gcg gag aac tgc ccc tcc ggg gcc cg	Quickchange
V5.TRPC6 S282A qc fp	cct ata aag gcc tgg ccg ctc cgg ctt acc tgt cat tg	Quickchange
V5.TRPC6 S282A qc rp	caa tga cag gta agc cgg agc ggc cag gcc ttt ata gg	Quickchange
V5.TRPC6 S4A qc fp	cgc gta tga gcc agg ccc cgg cgt tcg ggc cgc gg	Quickchange
V5.TRPC6 S4A qc rp	ccg cgg ccc gaa cgc cgg ggc ctg gct cat acg cg	Quickchange
V5.TRPC6 S769A qc fp	gta ccc ttc aat ctg gta ccg gct cca aag tcc ctg ttt tat ctc	Quickchange
V5.TRPC6 S769A qc rp	gag ata aaa cag gga ctt tgg agc cgg tac cag att gaa ggg tac	Quickchange
V5.TRPC6 T221A qc fp	cgg ttc tcc cac gat gtg gct cca atc att ctg gct gcc	Quickchange
V5.TRPC6 T221A qc rp	ggc agc cag aat gat tgg agc cac atc gtg gga gaa ccg	Quickchange

3.9. Eukaryote Zellen

Tabelle 13: Eukaryote Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen (human embryonic kidney) Kultivierung: 37 °C	Prof. Dr. B. Seed (Harvard Medical School, Boston)
HEK 293T „Phoenix“	Humane embryonale Nierenepithelzellen (human embryonic kidney) Kultivierung: 37 °C	Nolan Lab (Stanford, Kalifornien)
Podozyten-Zelllinie	Hitze sensitive Mauspodozyten (HSMP) Proliferation: 33 °C Differenzierung: 37 °C	Prof. Dr. Stuart Shankland (University of Washington, Seattle)
Podozyten-Zelllinie p35-Knockout	Hitze sensitive Mauspodozyten (HSMP) Proliferation: 33 °C Differenzierung: 37 °C	Prof. Dr. Stuart Shankland (University of Washington, Seattle)
Podozyten-Zelllinie Cyclin I- + p35 Knockout	Hitze sensitive Mauspodozyten (HSMP) Proliferation: 33 °C Differenzierung: 37 °C	Prof. Dr. Stuart Shankland (University of Washington, Seattle)

3.10. Bakterien

Tabelle 14: Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz
DH10 B T1	F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL _lacX74 Φ80lacZ_M15 araD139_(ara,leu)7697 mcrA _(mrrhsdRMS-mcrBC) λ-	Invitrogen

3.11. Software und Internetbasierte Programme

Tabelle 15: Software und Internetbasierte Programme

Name	Anbieter	URL
BlastN	NCBI	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov
Finch TV	Geospiza	---
GDS 3.1	Intas	---
GraphPad Prism version 4.00c (Macintosh)	Graph-Pad Software, San Diego, CA	---
NanoDrop 3.7.1	ThermoFischer	---
Watcut	University of Waterloo	http://watcut.uwaterloo.ca
SDS RQ Manager	BioRad	---
TM Calculator	Agilent Technologies	http://www.genomics.agilent.com
Image J	NIH, Bethesda	http://imagej.nih.gov/ij
ZEN 2009 Software	Carl Zeiss, Jena	---

4. Methodik

4.1. Molekularbiologische Methoden

4.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*) dient der in vitro Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäuren (DNS). Hierzu binden für die Matrizen-DNS-Sequenz spezifische Oligonukeotid-Fragmente (sog. Primer) an denaturierte DNS-Einzelstränge und ermöglichen es einer hitzestabilen DNS-Polymerase diese Einzelstränge sequenzerhaltend zu vervielfältigen. Während eines Zyklus wird so die Anzahl der vorhandenen DNS-Matritzen-Doppelstränge verdoppelt. Die Reaktion wird in einem Thermocycler unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Die für die in dieser Arbeit verwendeten Einstellungen des Thermocyclers sind Tabelle 16, sowie der verwendete Reaktionsansatze Tabelle 17 zu entnehmen.

Die ortsspezifische Mutagenese (*site directed mutagenesis,* oder *Quickchange*) dient der Veränderung einer oder mehrerer Nukleotide innerhalb einer DNS-Sequenz und wird ebenfalls mittels PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer werden homolog zu dem Abschnitt des Ziel-Nukleotides bestellt und müssen bereits die gewünschte Mutation enthalten. Für das Design dieser Primer ist zu beachten, dass sie einen möglichst hohen Anteil an Guanin, bzw. Cytosin sowie die Sequenz für eine neue, bisher noch nicht an dieser Stelle in der DNS-Sequenz vorhandene Restriktionsschnittstelle enthalten sollen. Je höher der Guanin-/Cytosin-Anteil der Primer ist, desto besser binden diese an ihre Zielsequenz. Der Einbau der neuen Restriktionsschnittstelle ermöglicht es, im Rahmen einer Restriktionsanalyse mutierte von nicht-mutierten Versuchsproben anhand der entstehenden DNA-Fragmente zu unterscheiden.

Nach Durchlaufen von mindestens 16 Zyklen dieser Kettenreaktion kann die exponentiell vervielfältigte DNS in einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert werden. Sie steht so einer anschließenden Aufreinigung für Klonierungen oder Restriktionsanalysen zur Verfügung.

Tabelle 16: Standard PCR-Thermocycler-Einstellungen

Schritt	Temperatur	Dauer	Kommentar
Initiale Denaturierung	95 °C	2:00 min	
Denaturierung der DNS-Stränge	95 °C	0:30 min	Wiederholung dieser Schritte mindestens 16x
Anlagerung der Primer	55 °C	1:00 min	
Elongation	68 °C	0:30 min / kb des Templates	
Kühlung	8 °C	∞	

Tabelle 17: Standard PCR-Ansatz

Reagenz	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Reaktionsvolumen
H_2O			ad 50 µl
10x KOD-Puffer	10x	1x	5 µl
Betaine	100%	5%	2,5 µl
dNTPs	10 mM	1 mM	5 µl
$MgSO_4$	25 mM	2,25 mM	4,5 µl
5‘-Primer	100 µM	0,6 µM	3 µl
3‘-Primer	100 µM	0,6 µM	3 µl
KOD Hot Start Polymerase	5 U/µl	0,1 U/µl	1 µl
DNA Matrize			150 ng

4.1.2. Restriktionsanalyse

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen können sowohl Ziel-Vektoren und PCR-Produkte für eine spätere Ligation verdaut werden, als auch bereits erstellte Plasmide analysiert werden. Man bedient sich hierbei unterschiedlicher Enzyme, die DNA an spezifischen Sequenzen schneiden. Tabelle 18 enthält die Angaben zu dem in unserem Labor verwendeten Protokoll. Idealerweise werden 0,1 bis 1 µg DNA verwendet und der Reaktionsansatz für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es können gleichzeitig mehrere Enzyme in einem Ansatz unter Beachtung des idealen Puffers verwendet werden. Nach erfolgtem Restriktionsverdau muss die Probe elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend aufgereinigt werden (4.1.5).

Tabelle 18: DNA-Restriktionsverdau

	Verdau zur Analyse	**Verdau von PCR-Produkten**
H_2O	ad 15 µl	Ad 30 µl
DNA	1 µg	23 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
Enzyme (5 U/µl)	0,5 µl (2,5 U)	0,5 µl (2,5 U)
10x Puffer	1,5 µl	3 µl
BSA (1 mg/ml)	1,5 µl *	3 µl *

* Falls von einem verwendeten Restriktionsenzym benötigt

4.1.3. Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Im Anschluss an einen Restriktionsverdau führten wir eine Dephosphorylierung der aufgeschnittenen Vektor-DNA am 5‘-Ende der linearisierten DNA durch. Wir inkubierten den Restriktionsverdau unter Zugabe von 1 U Antarctic Phosphatase für weitere 30 Min. bei 37 °C und inaktivierten die Phosphatase anschließend bei 65 °C für 10 Min.

4.1.4. Elektrophorese im Agarosegel

Um DNS-Fragmente oder ganze DNS-Plasmide entsprechend ihrer Größe aufzutragen, wird eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt. Die negativ geladenen DNS-Fragmente verteilen sich entsprechend Ihrer Größe in Richtung Anode. Ein mitlaufender Marker ermöglicht die Größen-Diskrimination. Ausgangspunkt können PCR-Ansätze oder auch Restriktionsverdaue sein, die mit einem speziellen, farbigen Ladepuffer versetzt werden. Dieser Ladepuffer bewirkt, dass die Probe an Dichte gewinnt und damit leichter in die Ladetaschen des Gels gefüllt werden kann. Anhand des Farbstoffes, der sich auf Grund der negativen Ladung in die gleiche Richtung wie die DNS bewegt, ist der Lauffortschritt innerhalb des Gels zu beobachten.

Die Auftrennung erfolgte in 0,5 - 2 % Agarosegelen in TAE-Puffer mit 0,005 % Ethidiumbromidlösung bei 75 - 100 Volt [68].

4.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Sobald die Probe einer PCR oder eines Restriktionsverdaus in einem Agarosegel aufgetrennt ist, kann sie unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten und mit Hilfe eines fertig gelieferten Kits aufgereinigt werden. Die Aufreinigung erfolgte anhand der im Kit enthaltenen Angaben des Herstellers.

4.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Tabelle 19 enthält das Protokoll für die Erstellung einer Ligationsreaktion, bei der ein DNA-Fragment unter Zuhilfenahme einer T4-DNA-Ligase in einen passend aufgeschnittenen DNA-Vektor eingesetzt werden kann. Nach Inkubation für 2 Stunden bei RT erfolgt die Transformation in Bakterien.

Tabelle 19: Ligation

	Kontrolle	**Ligation**
H_2O	15 µl	11 µl
Insert	4 µl	---
Vektor	2 µl	2 µl
10x-Ligationspuffer	2 µl	2 µl
T4-Ligase	2,5 U	2,5 U

4.1.7. Plasmidpräparation

Zur Kontrolle der klonierten Plasmide und insbesondere zur Plasmid-Vervielfältigung werden die transformierten Bakterien auf Agarplatten, welche das Antibiotikum enthalten für das auf dem gewünschten Plasmid eine Resistenz kodiert ist (s. Tabelle 6), ausgestrichen. Anschließend werden einzelne Klone in entsprechende Flüssigkulturen (LB-Medium mit Antibiotikum) überführt und über Nacht bei 37 °C und 900 rpm inkubiert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt mit Hilfe eines Kits nach Angaben des Herstellers (GeneJet Plasmid Miniprepkit, Fermentas sowie MegaPrep Kit bzw. MidiPrep Kit, Qiagen). Zur Kontrolle des Plasmides wurde eine erneute Restriktionsanalyse mittels STET-Preparation durchgeführt und beim Vorliegen der zu erwartenden DNA-Fragmente eine Sequenzierung des entsprechenden Plasmides angeschlossen.

4.1.8. Plasmidpräparation mit STET-Puffer

Auf Grund der hohen Kosten der kommerziell erhältlichen DNA-Präparations-Kits führten wir vor allem im Rahmen der Erstellung von Mutationen mittels Quickchange die Plasmidpräparation mit einem laboreigenen Verfahrens durch. Der hierbei zu berücksichtigende geringere Reinheitsgrad der aufgereinigten DNA stellte für den weiteren Versuchsablauf kein Problem dar.

Ähnlich dem Verfahren der kommerziellen Kits werden die Bakterien zunächst lysiert , die Plasmid-DNA anschließend alkoholisch gefällt, die gewonnene DNA in einem basischen Puffer resuspendiert und mittels Restriktionsverdau anschließend kontrolliert.

Von den zu kontrollierenden Flüssigkulturen wurden je 1,5 ml in einem Reaktionsgefäß für 1 min. mit 8000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 300 µl STET-1-Lösung auf einem Vortexmischer resuspendiert. Nach Zugabe von 25 µl STET-2-Lösung wurde die Suspension für 3 Min. bei 95 °C erhitzt. Das bei der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation mit 13.200 rpm bei 4 °C entstandene Pellet konnte entfernt und der Überstand mit 300 µl Isopropanol vermischt werden. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 13.200 rpm bei 4 °C für 8 Min. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in 30 µl RNAse-Wasser resuspendiert. Die Kontrolle der Plasmid-DNA erfolgte auch hier mittels eines Restriktionsverdaus und anschließender Auftragung der DNA in einem Agarose-Gel.

4.1.9. Sequenzierung

Wir führten die DNA-Sequenzierung mittels Kettenabbruchmethode nach Sanger unter Verwendung von Didesoxynukleotiden durch [90]. Das Protokoll für die PCR sowie die Einstellungen für den Thermocycler sind in Tabelle 20 und Tabelle 21 aufgeführt. Die Proben wurden vor und nach der Reaktion lichtgeschützt bei 8°C aufbewahrt. Die anschließende Kapillarelektrophorese der entstandenen DNA-Fragmente wurde durch das Cologne Center for Genomics durchgeführt. Eine Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Finch TV bzw. internetbasiert mit NCBI BlastN.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für DNA-Sequenzierung

	Ausgangskonzentration	**Pipetier-Volumen**	**Zielkonzentration im Reaktionsansatz**
Template (DNA-Matrize)	100-150 ng/µl	1 µl	
5‘-Primer (Vorwärts-Primer)	1 µM	2 µl	0,2 µM
3‘-Primer (Rückwärts-Primer)	1 µM	2 µl	0,2 µM
5x BigDye® Sequencing Buffer		2,25 µl	1,125 x
BigDye® Terminator V3.1 Ready Reaction Mix		0,25 µl	
ddH_2O		ad 10 µl	

Tabelle 21: Thermocycler-Einstellungen für DNA-Sequenzierung

	Temperatur [°C]	Dauer [Sek]	
Denaturierung	96	10	Wiederholung dieser Schritte 32x
DNA-Hybridisierung	55	5	
Elongation	60	240	

4.1.10. RNA-Isolierung aus eukaryoten Zellen

Zur Präzipitation von RNA aus kultivierten Zellen wurde zunächst das Nährmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach möglichst vollständiger Entfernung der Waschlösung erfolgte die Zugabe von 700 µl QIAzol Lysis Reagent und die Zellen wurden mittels Zellschaber aus der Schale in ein kleineres Reaktionsgefäß gegeben. Die weitere RNA-Gewinnung erfolgte mittels des RNeasy-Mini-Kits von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben. Grundlage hierfür ist die von Chomczynski und Sacchi beschriebene single-step Methode [16]. Nach Lyse der Zellen werden im Lysat die Proteine denaturiert sowie RNAsen inaktiviert. Die RNA-Stränge können reversibel an Silikat-basierten Matrix-Membranen gebunden werden und in mehreren Waschschritten DNA und Proteine ausgewaschen werden. Ein DNA-Kontamination kann durch Zusetzen von DNAse verringert werden. Nach Elution der RNA erfolgte die Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA, wobei die Darstellung einer 18S sowie einer 28S-Bande für eine erfolgtreiche RNA-Präparation sprechen. Die Lagerung der gewonnenen RNA erfolgte bei -80 °C, alternativ die direkte Weiterverarbeitung mittels reverser Transkription.

4.1.11. Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Isolierung erfolgte die Umschreibung der gewonnenen RNA in cDNA auf Grund deren höherer Stabilität und somit einfacher Handhabung. Es wurde hierzu das OneStep RT-PCR Kit von Quiagen nach Herstellerangaben verwendet.

4.1.12. Quantitative PCR

Zur genaueren Quantifizierung der Expression eines bestimmten Genes wird die Menge der spezifischen mRNA gemessen und mit derjenigen mRNA-Kontentration eines nicht mit dem zu untersuchenden Genes in Relation gebracht. Hierfür dienen nach Möglichkeit sogenannte „Haushaltsproteine“, die in allen Zellen in gleichen Mengen exprimiert werden. Für unsere Untersuchungen wurde Actin-β gewählt.

Die in den vorigen Schritten gewonnen Proben wurden zur weiteren Quantifizierung in zwei Ansätzen einer PCR zugeführt, wobei in der einen Reaktion ein für Actin-β

spezifischer Primer und in der anderen Reaktion ein für TRPC6 spezifischer Primer verwendet wurde. Der PCR-Ansatz erfolgte mittels des von Applied Biosystems angebotenen Power SYBR Green-Mixes, bei dem außer Primern und Template-DNA bereits alle zentralen Bestandteile enthalten sind. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System Cycler von BioRad. Auf Grund der Eigenschaft des DNA-Farbstoffes SYBR-Green sich in DNA-Doppelstrangmoleküle einzulagern und nur nach Einlagerung zu fluoreszieren kann nach jedem Elongationszyklus die Fluoreszenzintensität gemessen werden.

Es erfolgte eine Normierung der Fluoreszenzintensität der TRPC6-Primerproben auf diejenige der Actin-β-Primerproben.

4.2. Proteinbiochemische Methoden

4.2.1. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient der Aufreinigung eines in eukaryoten Zellen exprimierten Proteins und aller an dieses gebundenen weiteren Proteine. Man bedient sich hierfür kleiner Agarose-Kügelchen, an die entweder direkt ein Antikörper gebunden ist, oder die auf Grund ihrer Beschichtung Fc-Ketten von Antikörpern spezieller Spezies binden können (s. Tabelle 22).

Für die IP wurden pro Ansatz ein bis zwei 10-cm-Schalen eukaryoter Zellen in 4 °C PBS-Puffer geerntet und anschließend für 15 Min. bei 4 °C in IP-Puffer lysiert. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 10 Min.) wurde der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und hiervon 25 µl als Lysatprobe mit 25 µl 2x Laemmli für 5 Min. bei 95 °C erhitzt und anschließend auf -20 °C aufbewahrt. Wir hatten nun die Möglichkeit entweder direkt 30 µl mit dem FLAG-Tag gekoppelte M2-Beads zu den Überständen hinzuzugeben oder alternativ zunächst 1 µg eines primären Antikörpers zu verwenden.

Nach diesem Schritt wurden die Reaktionsgefäße für mindestens 1 Stunde oder auch über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopf-Schwenker inkubiert. Wurde ein ungebundener Antikörper verwendet, wurden anschließend in Abhängigkeit der Spezies welcher dieser Primärantikörper entstammte, 30 µl Protein A- bzw. G-Beads hinzugegeben, und wieder für mindestens 1 Stunde bzw. über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschwenker inkubiert.

Durch Zentrifugation (5000 rpm, 4 °C, 3 Min.) lässt sich ein Pellet bestehend aus Bead, Antikörper, präzipitiertem sowie kopräzipitierten Proteinen isolieren. Dieses wurde dreimal in IP-Puffer gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschritt wurde das Pellet in 30 µl 2x Lämmli-Puffer mit DTT gelöst und 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Zuletzt konnten die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt werden.

Tabelle 22: Für die IP verwendete Beads

Bezeichnung	Verwendet für Bindestelle
M2-Beads	FLAG-Tag
Protein A-Beads	Fc-Kette IgG rabbit
Protein G-Beads	Fc-Kette IgG mouse

4.2.2. Lipid-Raft-Präparation

Pro Versuchsansatz werden vier 10-cm-Schalen eukaryoter Zellen in 4 °C PBS-Puffer geerntet und anschließend in 1 ml Lipid-Raft-Gebrauchspuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird vorsichtig auf Eis in einem 2 ml Wheaton Glas/Glas-Homogenisator durch 20-fache Aspiration lysiert und anschließend auf Eis für 30 Minuten inkubiert. Nach anschließender Zentrifgation (3.000 rpm, 10 min, 4 °C) werden 800µl des Überstandes in einem Beckmann Ultrazentrifugen-Röhrchen (4,5 ml) mit 800µl 90%iger Sucrose-Lösung vermischt. Anschließend werden auf die Lysat-Sucrose-Suspension vorsichtig je 1,6 ml 30% Sucrose-Lösung sowie 800 µl 5% Sucrose-Lösung aufpipettiert, sodass eine dreiphasige Füllung der Zentrifugenröhrchen zu erkennen ist. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation mit 16.000 rpm für 16 Stunden bei 4 °C. Nach vorsichtiger Entnahme aus der Zentrifuge können insgesamt sieben Fraktionen zu je 550 µl pro Röhrchen gesammelt und der Western Blot-Analyse zugeführt werden. Als Marker für die Raft-Fraktionen diente das Protein Flotillin, für die non-Raft-Fraktionen der Transferrin-Rezeptor.

4.2.3. Zellfraktionierung

Die Zellfraktionierung dient der Aufreinigung und nachfolgend getrennten Analyse von Proteinen unterschiedlicher Zellkompartimente. Dabei werden aus Zelllysaten die einzelnen zellulären Kompartimente durch sequentielle Zentrifugation aufgetrennt. Es entstehen hierbei beispielsweise drei grobe Fraktionen: Die Erste bestehend aus Zellkernen und Mitochondrien, eine weitere bestehend aus Membranbestandteilen sowohl des endoplasamtischen Retikulums wie auch der Plasmamembran, und eine dritte Zytosol-Fraktion.

Für jeden Versuchsansatz wird eine konfluente 10-cm-Schale HEK293T-Zellen bzw. immortalisierter Mauspodozyten in 6ml 4°C PBS-Puffer geerntet, und bei 4°C mit 600 rpm abzentrifugiert. Die Resuspension des Zellpellets erfolgt mit 100µl hypotonem Zellfraktionierungspuffer mit anschließender Inkubation auf Eis für 15 Minuten. In Folge der durch die hypotone Suspensionslösung erfolgte Volumenzunahme der einzelnen Zellen ist eine anschließende Homogenisierung der Zellen in einem 2 ml Wheaton Glas/Glas-Homogenisator mittels 15maliger gleichmäßiger Stößel-Aspiration möglich. Mittels Zentrifugation bei 10.000g können die Zellkerne und Mitochondrien von der Suspension getrennt werden. Diese werden nach erneutem Waschen in PBS-Puffer für die spätere Analyse asserviert.

Der Überstand, bestehend aus den übrigen Zellorganellen und Plasmamembrananteilen, wird mittels Ultrazentrifugation bei 100.000g für 30 Minuten in einer gekühlten Ultrazentrifuge in einem Beckman TLS-55-Rotor weiter prozessiert

[43, 92], wobei als Pellet in diesem Schritt die Membranfraktion mit Anteilen des endoplasmatischen Retikulums sowie der Plasmamembran aufgereinigt werden. Der Überstand wird als Zytosol-Fraktion abgenommen und das Pellet nach PBS-Waschung mit den darin enthaltenen o.g. Membran-Fraktionen nun ebenfalls der weiteren SDS-PAGE-Analyse zugeführt.

4.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine in einem Polyacrylamid-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt werden [60]. Diese Proteine können anschließend aus dem Gel durch des Western Blot-Verfahren auf eine Membran überführt [105], dort fixiert und können durch spezifische Antikörper im Immunoblot nachgewiesen werden.

4.2.5. Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden nun auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen, um sie für immunologische Nachweisverfahren zugänglich zu machen. Hierbei kommt das semi-dry-Verfahren zwischen einer unten liegenden Graphit-Anode und einer von oben aufgepressten Kathode zur Anwendung. Auf ein in Transferpuffer getränktes Whatmanpapier wird die in Methanol aktivierte PVDF-Membran aufgebracht, auf die wiederum das SDS-PAA-Gel gelegt wird. Bedeckt wird das Gel mit einem weiteren, getränkten Whatmanpapier und zwischen den beiden Elektroden eingespannt. Ein blasenfreies Aufbringen der Schichten ermöglicht einen optimalen Transfer der Proteine aus dem Gel in Richtung der Anode auf die Membran. Der Transfer erfolgt bei 12 V für 53 Minuten.

4.2.6. Immunologische Protein-Nachweise

Der Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern auf der PVDF-Membran hat als Voraussetzung die Blockade aller unspezifischen Bindungsstellen durch eine Blockierlösung. Dies erfolgt durch das Waschen der Membran in einer BSA-Lösung (5 % in Protein-Waschpuffer, PWP) bei Raumtemperatur (RT) für 1 Stunde oder bei 4 °C über Nacht. Die Membran wird anschließend dreimal in PWP gewaschen.

Alle Antikörper wurden in PWP gelöst und die Inkubation der Primärantikörper erfolgte entweder für mindestens 30 Min. bei RT oder alternativ bei 4 °C über Nacht. Durch erneutes, dreimaliges Waschen wurde überschüssige Antikörper von der Membran entfernt und diese für weitere 30 Min. bei RT in Sekundärantikörper inkubiert. Der Sekundärantikörper ist gegen die Fc-Kette des entsprechenden Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion mittels Enhanced chemiluminescence (ECL) an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt [56]. Das in der ECL-Lösung vorhandene Luminol

wurde durch die Meerrettich-Peroxidase unter Lichtfreisetzung umgesetzt. Dieses Licht kann mittels Röntgenfilm in der Dunkelkammer oder direkter digitaler Bilderfassung detektiert werden. Die Röntgenfilme wurden nach Entwicklung eingescannt und digital ausgewertet. Für die Densitometrische Analyse und den Vergleich der Bandenintensitäten verwendeten wir die Software Image J wie auch die Software GraphPad Prism version 4.00c mittels Varianzanalyse anhand des Tukey-Testes. Ein p-Wert <0,05 wurde als signifikant gesetzt.

4.2.7. Indirekte Immunfluoreszenz

Neben der Analyse von Zelllysaten und einem anschließend quantitativen Vergleich von Proteinmustern vieler tausend Zellen ist die Visualisierung von Proteinverteilungsmustern in einzlenen lebenden Zellen unter dem Mikroskop für das Verständnis der Lokalisationsvorgänge in Zellen essentiell. Seit den ersten Anwendungen von mit fluoreszierenden Markern gekoppelten Antikörpern zur Darstellung dieser Lokalisierungsvorgänge durch Coons in den 1960er Jahren [18] konnte die Technik stetig weiterentwickelt werden, sodass viele verschiedene Techniken und Protokolle exisiteren. Die Grundsätzliche Idee zunächst mittels eines Primärantikörpers die gewünschten Epitope von Proteinen zu binden und anschließend an die Fc-Ketten dieser Primärantikörper mit Spezies-spezifischen Sekundärantikörpern zu binden entspricht dem Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen. Hierbei ist für die Mikroskopie von Zellen jedoch nicht mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sondern mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Unter Verwendung von Primärantikörpern verschiedener Spezies (z.B. Kaninchen, Maus, Ziege, etc.) können unter Verwendung ebenfalls unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe in einer Zelle mehrere Proteine nachgewiesen sowie deren spezifische subzelluläre Lokalisation dargestellt werden.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir immortalisierte Podozyten aus Cyclin-I und p35-Knockout Mäusen [28, 94]. Jeweils eine 10-cm Schale der Podozyten wurden nach Trypsin-Behandlung auf Deckgläser in einem 12-Well passagiert. Zwischen allen nachfolgend aufgeführten Schritten dieses Protokolls erfolgte stets ein vorsichtiges Waschen der Zellen in 4°C PBS-Puffer. Die Fixation der Zellen erfolgte nach Abnahme des Mediums mittels einer Lösung aus 2% Formaldehyd und 4% Sucrose für 10 Minuten. Anschließend erfolgt die Permeabilisierung der Zellmembran mittels 0,3% Triton X-100 in PBS für erneute 10 Minuten.

Ab hier erfolgen die Waschschritte mit PBST-Puffer. Zur Blockierung aller unspezifischen Protein-Bindungsstellen auf den Deckgläsern erfolgt die einstündige Inkubation mit 5%igem NDS gelöst in Dulbecco’s PBS. Die anschließende Inkubation

mit Primärantikörpern erfolgte lichtgeschützt nach Verdünnung der Antikörper in PBST-Puffer gemäß der Herstellerangabe für eine Stunde unter Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht. Ebenfalls lichtgeschützt erfolgte die Inkubation der ebenfalls in PBST gemäß der Herstellerangabe verdünnten Sekundärantikörper für 45 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach einem letzten Waschschritt in ddH_2O werden die Deckgläser mit 15 µl Prolong DAPI auf Objektträgern fixiert und können bei 4°C aushärten.

Für die mikroskopische Betrachtung der Zellen wurde eine LSM 710/Axiobserver Z1 Konfocales Mikroskop verwendet unter Nutzung der ZEN 2009 Software (Carl Zeiss, Jena).

4.3. Zellbiologische und mikrobiologische Methoden

4.3.1. Anzucht, Kultivierung und Lagerung von Bakterien und eukaryoten Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zellkultur-Experimente wurden an HEK293T sowie HSMP-Zelllinien durchgeführt. Die Kultivierung der HEK293T Zellen sowie der differenzierten bzw. zu differenzierenden HSMP-Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen erfolgte bei 37°C in befeuchteten Brutschränken unter 5% CO_2. Die Kultivierung noch nicht differenzierte Podozyten erfolgte bei 33°C. Die Passagierung der Zellen erfolgte unter einer sterilen Werkbank. Zur Durchführung einer Passage wurden das Medium aus den Zellkulturschalen abgenommen, die Zellen unter Zugabe von 10 ml sterilfiltriertem, angewärmten PBS gewaschen und konnten unter Zugabe von Trypsin-Lösung nach kurzer Inkubationszeit auf neue Zellkulturschalen ausgesät werden.

Grundlage für die von uns genutzte Zellkultur mit der Möglichkeit der Untersuchung von differenzierten und nicht-differenzierten HSMP-Zellen ist die Arbeit von Jat et al. [44]. Die Kultivierung der aus der Immortomaus® gewonnen Podozyten erfolgte bei 33°C zur Wahrung des temperaturabhängigen SV40-Antigenes. Zugleich wird das Antigen durch einen Interferon-γ-Induzierbaren Promotor kontrolliert, sodass unter Proliferationsbedingungen die Zugabe von 50 U/ml Interferon-γ zum Kulturmedium erfolgt. Dies steigert die Aktivität des dem SV40-Antigen vorgeschalteten Promotors H-$2K^b$. Nach Wechsel auf 37°C führt die Hitzeinaktivierung des SV40-Antigenes sowie das Weglassen der Interferon-γ-Beigabe zum Medium zur Reduktion der Promotor-H-$2K^b$-Aktivität und schließlich zur Differenzierung der Podozyten innerhalb von ca. 14 Tagen [94].

4.3.2. Transformation von Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA verwendeten wir in dieser Arbeit DH10 Bakterienkulturen. Die Transformation von 20 µl chemokompetenter Bakterien erfolgte nach Auftauen auf Eis der bei -80°C gelagerten Bakterien entweder mit 5 µl der bei einer Ligation gewonnen Lösung oder, zur Amplifizierung bereits vorhandener Konstrukte, mit 0,1 µg Plasmid-DNA. Anschließend erfolgt eine Hitzeaktivierung der Bakterien für 45 Sekunden bei 42 °C, bei der die Plasmid-DNA von den Bakterien aufgenommen wird. Es folgt nun die einstündige Inkubation mit 100µl SOC-Medium auf einem 37°C-Rüttler. Zur Selektion der Bakterien, die die gewünschte Plasmid-DNA aufgenommen haben, werden die Bakterien auf einer Antibiotikahaltigen Agar-Platte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Sie werden entsprechend Abschnitt 4.1.7 weiterverarbeitet.

4.3.3. Transfektion eukaryoter Zellen

Die transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen wurde mittels Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitaten durchgeführt [14]. Mittels Phagozytose wird die an Calcium-Phosphat Kristalle gebundene Plasmid-DNA von den Zellen aufgenommen. Unter einer sterilen Werkbank werden zunächst 10 µg der Plasmid-DNA in 500 µl 0,25 M Calciumchlorid verdünnt. Anschließend kann unter starkem Schütteln mittels Vortex tropfenweise weitere 500 µl HEBS 2x zugegeben werden. Von dieser Lösung werden nun 950 µl auf einer mit Medium befüllte 10cm Schale von 40-50% konfluenten Zellen tropfenweise verteilt. Das Medium wird nach 6-8 Stunden Inkubationszeit gewechselt.

4.3.4. Viraler Gentransfer zur Erstellung stabiler Zellinen

Mittels der nachfolgend beschriebenen Methoden ist es uns möglich, in das Genom eukaryoter Zellen von uns gewünschte Erbinformation stabil einzubringen. Die Zellkultur-Arbeiten fanden in Laborräumen der Schutzstufe 2 nach Biostoffverordnung (S2) statt. Wir verwendeten sowohl Lenti- wie auch Retroviren zur Transduktion. Bei der initialen Erstellung der Viren werden sowohl die für die eigentliche Transduktion gewünschten Erbinformationen gemeinsam mit sogenannten Helferkonstrukten für die Viruserstellung in HEK293-T-Zellen kotransfiziert. Die Helferkonstrukte beinhalten Strukturproteine, die die Virusproduktion in den transfizierten Zellen sowie deren anschließende Freisetzung ermöglichen. Da die Erbinformation der Helferkonstrukte nicht in die Erbinformation des Virions integriert wird, sind die Viren nur einmalig der Infektion eukarioter Zellen befähigt und eine anschließende Vermehrung des Virus in den nachfolgend transduzierten Zellen ist somit ausgeschlossen.

4.3.5. Herstellung von Lentiviren

Die Transduktion von sich teilenden, wie auch post-mitotischen Zellen erfolgte mit Lentiviren der dritten Generation [104]. Zur Herstellung eines solchen Virus verwendeten wir die in Tabelle 23 genannten Plasmide. Insgesamt wurden vier 10cm-Schalen von 293T-Zellen mit einem gemeinsamen Ansatz aller Plasmide transfiziert. Nach rund zwölf Stunden findet ein Wechsel des Nährmediums auf eines für die zu transduzierenden Zellen passendes statt. Die in den nachfolgenden Tagen in das Zellmedium abgegebenen Viren werden nach dreitägiger Inkubationszeit auf 37°C geerntet. Das Medium wird hierfür abgenommen, die evtl. mitabgenommene Zellen ab zentrifugiert und das Medium anschließend durch einen 0,45 µm Filter filtriert.

Tabelle 23: Transfektionsansatz zur Lentivirus-Herstellung

Konstrukt	Benötigte Menge pro 10cm-Schale	Beschreibung
pLenti 6.3 Konstrukt	10 µg	Gewünschtes Gen für die Transduktion
pMD2 VSV-G	4,5 µg	Hüllproteine
pMDL g/p	2,5 µg	Gruppenspezifische Antigene und Polymerasen
pRSV rev	2,5 µg	Akzessorische Proteine

4.3.6. Herstellung von Retroviren

Entsprechend zu der im vorigen Abschnitt beschrieben Herstellung von Lentiviren wurden für Teile dieser Arbeit auch Retroviren verwendet. Zur Herstellung von Retroviren der zweiten Generation mittels pBabe-Konstrukt war die Transfektion der Helferkonstrukte jedoch nicht notwendig, da letztere bereits in der HEK 293T Zellinie „Phoenix“ fest in das Genom integriert sind.

4.3.7. Transduktion eukyrioter Zellen

Die Grundsätze der Transduktion wurden 1951 bereits von Zinder und Lederberg beschrieben [121]. Nach Infektion einer eukarioten Zelle durch die von uns erstellten Viren erfolgt mittes einer Reversen Transkriptase die Umschreibung der viralen RNA in DNA. Anschließend erfolgt mittels des ebenfalls durch das Virus in die Zielzelle eingebrachten viralen Proteins Integrase die ungerichtete Einbindung des Transgens in die Erbinformation der Zelle. Dies wird durch Flankierung der gewünschten Transgen-RNA im viralen Erbgut durch lange, terminale Wiederholungen (LTR) sichergestellt. Zur Ermöglichung einer anschließenden Selektion des transduzierten Zellen wird entsprechend des Virustypes das Gen für eine Antibiotikaresistenz mit eingebracht.

Für die Transduktion von Podozyten versetzten wir eine 10-cm-Schale unserer Ziel-Podozyten auf 33° mit 5 ml HSMP++++-Medium sowie 5 ml HSMP-Virusmedium zweimalig für je 24 Stunden. Anschließend erfolgte die Selektion mittels Blasticidin bzw. Puromycin (s. Abschnitt 3.3.3). Nach viermaliger Passage der Zellen wurde für die weitere Arbeit die Sicherheitsstufe S1 erreicht.

5. Ergebnisse

5.1. Der Myristol-Anker von p35 ist verantwortlich für die Lokalisation von Cdk5 in Detergenz-resistente Membrandomänen

Der Aufbau von neuronalen Synapsen und der podozytären Schlitzmembran ähnelt sich in vielerlei Hinsicht. Für die Signalübertragung zwischen den Zellen formieren sich bei beiden Zellarten Proteine und Lipide zu speziellen Signal-Plattformen. Diese Membrandomänen sind gekennzeichnet durch einen sehr hohen Anteil an Cholesterin, welches für eine effektive Signalübertragung unabdingbar ist und die Domänen besonders widerstandsfähig gegenüber Detergenzien macht. Sie werden daher als Detergenz-resistente Membrandomänen (DRM), oder Lipid rafts, bezeichnet. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass p35-Cdk5 in diesen Domänen lokalisierte Rezeptoren wie ErbB4 und den Dopamin-D2-Rezeptor beeinflusst [46, 80]. Cdk5 besitzt jedoch kein Signalpeptid, welches das Trafficking in eines der subzellulären Kompartimente bedingen würde. Wir erstellten daher die Hypothese, dass Cdk5 in Abhängigkeit seines Aktivators in die entsprechenden Zellkompartimente rekrutiert wird.

In einem ersten Schritt untersuchten wir die Lokalisation von Cdk5 in DRMs.

Abbildung 4 A-C zeigt die Ergebnisse einer Lipid-Raft-Präparation, in dem eine Ko-Transfektion von Cdk5 mit seinen vorbeschriebenen Interaktionspartnern p25, p35 sowie Cyclin I erfolgte. Es ist zu erkennen, dass Cdk5 lediglich in Anwesenheit von p35 und nicht in Anwesenheit von Cyclin I oder p25, einem Spaltprodukt von p35, in DRMs lokalisiert.

Dem Protein p25 fehlen die N-terminalen 97 Aminosäuren, die die Myristol-Anker-Sequenz von p35 beinhalten. Für die Bindung von Myristinsäure an das an Position 2 liegende Glycin von p35, wie es bei allen myristoylierten Proteinen erfolgt, ist die Abspaltung des initialen Methionins essentiell [108]. Um diese Abspaltung zu verhindern und zu untersuchen, ob die Myristoylierung von Cdk5 auch für die Rekrutierung von p35-Cdk5 in DRM essentiell ist, fügten wir ein Prolin an den N-Terminus von p35 an. Dies gelang mittels Erstellung eines kombinierten cDNA-Konstruktes aus Cdk5.FLAG sowie p35.myc, wobei beide Konstrukte durch ein virales 2A-Peptid getrennt werden. Dieses multicistronische Konstrukt vermittelt über die 2A-Sequenz die Spaltung des Proteins während der Translation [59]. Auf Grund der spezifischen Aminosäuresequenz kann keine reguläre Peptid-Bindung entstehen und das Ribosom überspringt diesen Abschnitt zum nächsten Codon und es erfolgt eine

Spaltung zwischen dem Glycin und Prolin, welches dem nachfolgenden Protein am N-Terminus vorgestellt verbleibt.

Nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem o.g. Konstrukt und Durchführung einer Lipid-Raft-Präparation konnte weder Cdk5.Flag noch Prolin.p35.myc in den DRM-Fraktionen nachgewiesen werden.

Dies führt zu dem Schluss, dass die Myristoylierung von p35 für die Lokalisation von Cdk5 in DRM verantwortlich ist und diese Funktion weder von un-myristoyliertem p35 noch von p25 oder Cyclin I übernommen werden kann.

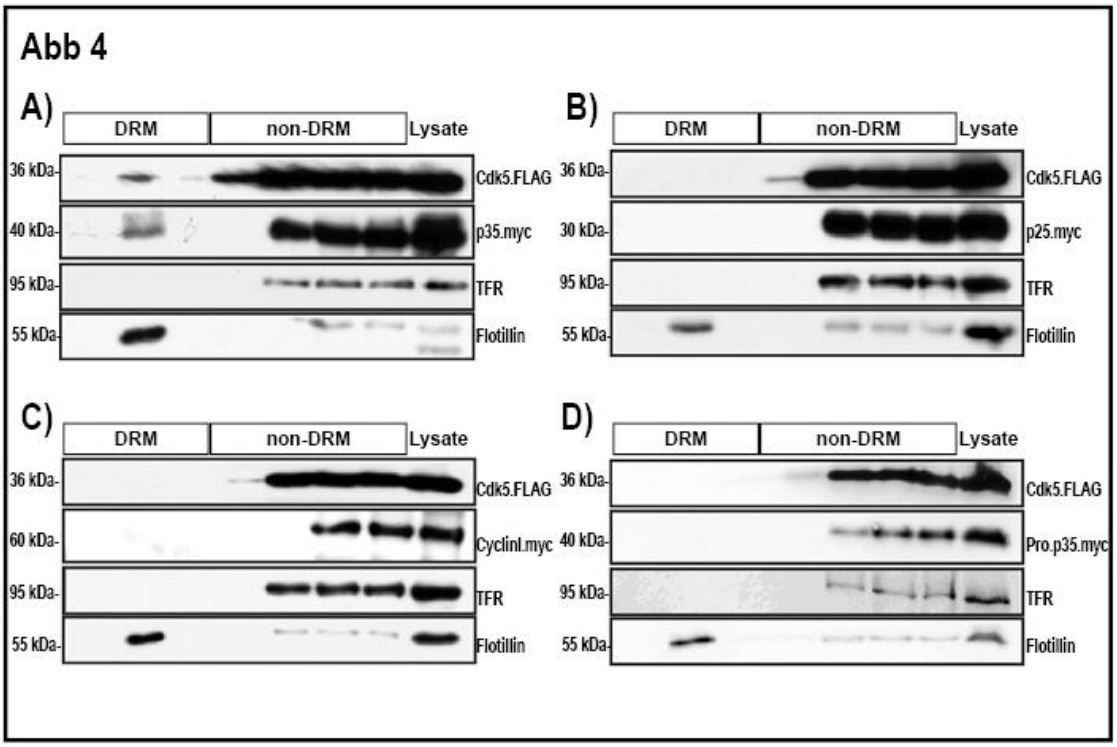

Abbildung 4: Lipid-Raft-Präparationen aus HEK-293T-Zellen. . **A)** In Gegenwart von p35.myc ist in den DRM-Fraktionen Cdk5.Flag nachweisbar. **B+C)** In Gegenwart von p25.myc oder Cyclin I.myc sind weder diese Proteine, noch Cdk5.Flag in den DRM-Fraktionen nachweisbar. **D)** Nach Inaktivierung der Myristoylierung von p35 durch Anhängen eines Prolins an den N-Terminus ist auch hier kein Nachweis von Pro.p35.myc oder Cdk5.Flag in DRM möglich. Nach Durchführung der Lipid-Raft-Präparation dienen Flotillin und der Transferrinrezeptor (TFR) als Qualitätsindikatoren. Der TFR ist nicht in den DRM nachweisbar, Flotillin hingegen deutlich in Fraktion 2.

5.2. In Abwesenheit von p35 rekrutiert membranassoziiertes Cyclin I endogenes Cdk5 in die Plasmamembran

Im nächsten Schritt interessierte uns, ob es möglich ist endogenes Cdk5 auch ohne die Gegenwart von p35 in die Plasmamembran zu lokalisieren. Wir adressierten dies in einer immortalisierten, stabilen p35-/Cyclin I-knockout Podozytenlinie in welcher wir mittels retroviraler Transduktion N-Terminal mit CD16.7- und myc-getaggtes Cyclin I reexprimierten. Bei diesem Konstrukt führt die Fusion der extrazellulären Domäne von CD16 und der Transmembrandomäne von CD7 mit dem eigentlich nukleär lokalisierten Cyclin I zur Membranlokalisierung von Cyclin I [47, 54, 108]. Die Expressionskontrolle von CD16.7.myc.Cyclin I exprimierenden p35/CyclinI knockout Podozyten im Vergleich mit Wildtyp Podozyten zeigt eine deutliche Expression des Transgens, wobei weiterhin kein endogenes Cyclin I nachweisbar ist (Abbildung 5). Die Expressionslevel von Wildtyp Cyclin I sowie CD16.7.myc.Cyclin I erscheinen in etwa gleich stark.

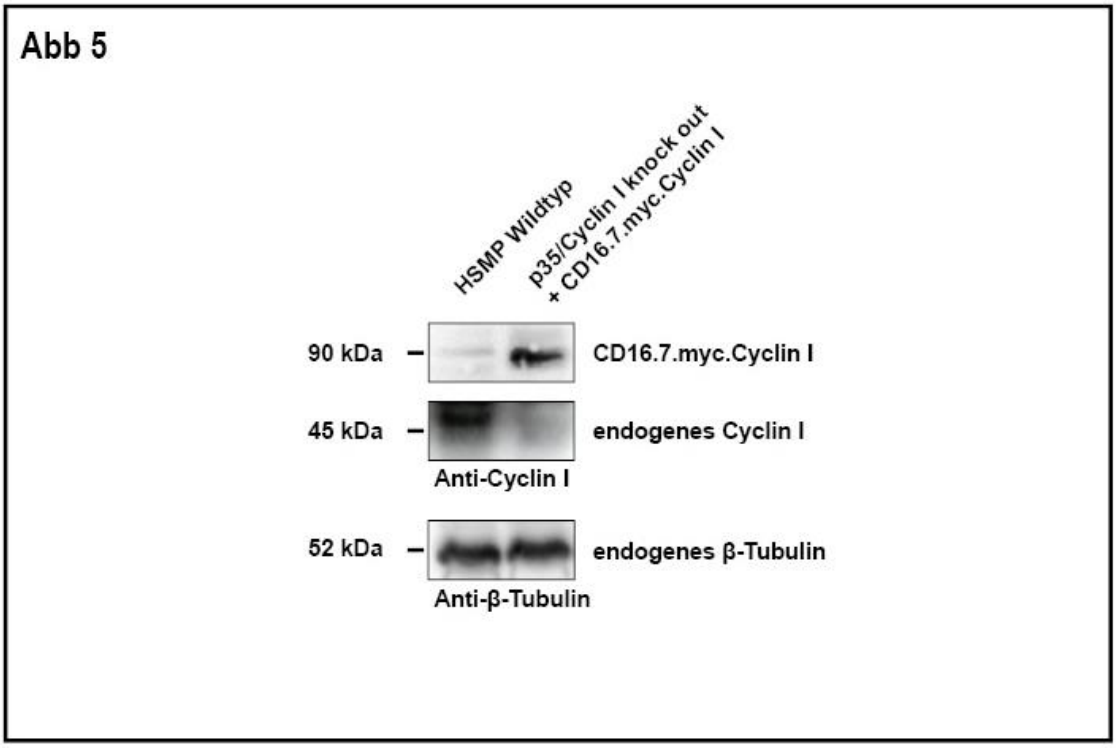

Abbildung 5: Expressionskontrolle CD16.7.myc.Cyclin I in p35/Cyclin I knockout Podozyten. . Der Vergleich von endogenem Cyclin I in Wildtyp-Podozyten gegenüber den CD16.7.myc.Cyclin I reexprimierenden p35/Cyclin I-Knockout Podozyten. β-Tubulin dient dem Vergleich der aufgetragenen Gesamt-Proteinmengen in den Lysaten

Um die Lokalisation von Cdk5 zu untersuchen führten wir Zellfraktionierungsexperimente in CD16.7.myc.Cyclin I reexprimierenden p35/Cyclin I knockout Podozyten und Wildtyp Podozyten durch. Abbildung 6 A zeigt die Westernblot-Ergebnisse einer Zellfraktionierung, bei der nach Auftrennung in Membran-, Zytosol- und Kernfraktion der Nachweis von endogenem Cdk5 mittels spezifischem Cdk5-Antikörper erfolgte. In den p35- /CyclinI-Knockout-Podozyten ist lediglich ein schwaches Signal für Cdk5 in der Membranfraktion nachzuweisen, während sich in den CD16.7.myc.Cyclin I transgenen Zellen eine deutliche Bande in der Membranfraktion nachweisen lässt. Fibrillarin und der Transferrinrezeptor dienten als Reinheitsindikatoren des Versuches, wobei Fibrillarin weder in der Zytosol- noch in der Membranfraktion und dagegen der Transferrinrezeptor lediglich nicht in der Zytosol-Fraktion nachzuweisen ist. Nach Vergleich der Bandenintensität ist deutlich in Abbildung 6B zu erkennen, dass in Gegenwart von membrangebundenem CD16.7.myc.Cyclin I signifikant mehr Cdk5 in den Membrananteilen nachgewiesen werden konnte.

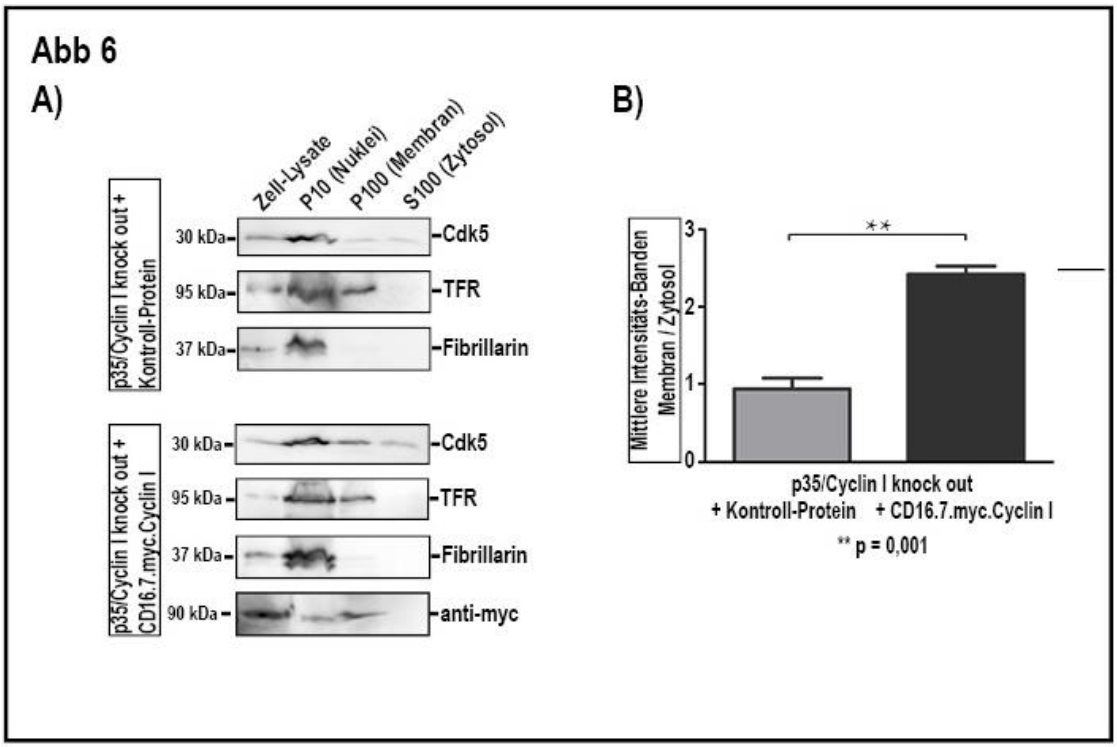

Abbildung 6: Membranassoziiertes Cyclin I rekrutiert Cdk5 in die Plasmamembran. . **A)** In Cyclin I / p35-Knockout Podozyten wurde membrangezieltes Cyclin I (CD16.7.myc.Cyclin I) reexprimiert wodurch in einer Zellfraktionierung signifikant mehr Cdk5 in den Membranfraktionen nachgewiesen werden konnte. Färbungen auf den Transferrinrezeptor sowie Firbillarin dienen als Qualitätsmarker des Versuches. **B)** Die Quantifizierung der Bandenintensitäten im Verhältnis Membran/Zytosol ergibt signifikant mehr Cdk5 in Membranen bei Expression von membrangezieltem CD16.7.myc.Cyclin I (Kontrolle: Mittlere Intensität 0,937; CD16.7.myc.Cyclin I: Mittlere Intensität 2,421; P= 0,001)

Diese Ergebnisse konnten in Immunfluoreszenzuntersuchungen bestätigt werden. Die gezielte Anfärbung von Cdk5 in der Immunfluoreszenz in den CD16.7.myc.Cyclin I reexprimierenden p35-/Cyclin-I-Knockout Podozyten zeigt im Vergleich zu p35-/Cyclin-I-Knockout Podozyten, welche mit einem Kontroll-Plasmid transduziert wurden, einen deutlich stärkere Lokalisation von Cdk5 in die Plasmamembran in Gegenwart von membranassoziiertem Cyclin I. In den Kontroll-Podozyten erscheint das Cdk5-Signal im Zytosol bzw. perinukleär betont. Die subzelluläre Lokalisation von Cdk5 erscheint somit primär von der subzellulären Lokalisation seines Interaktionspartners abhängig.

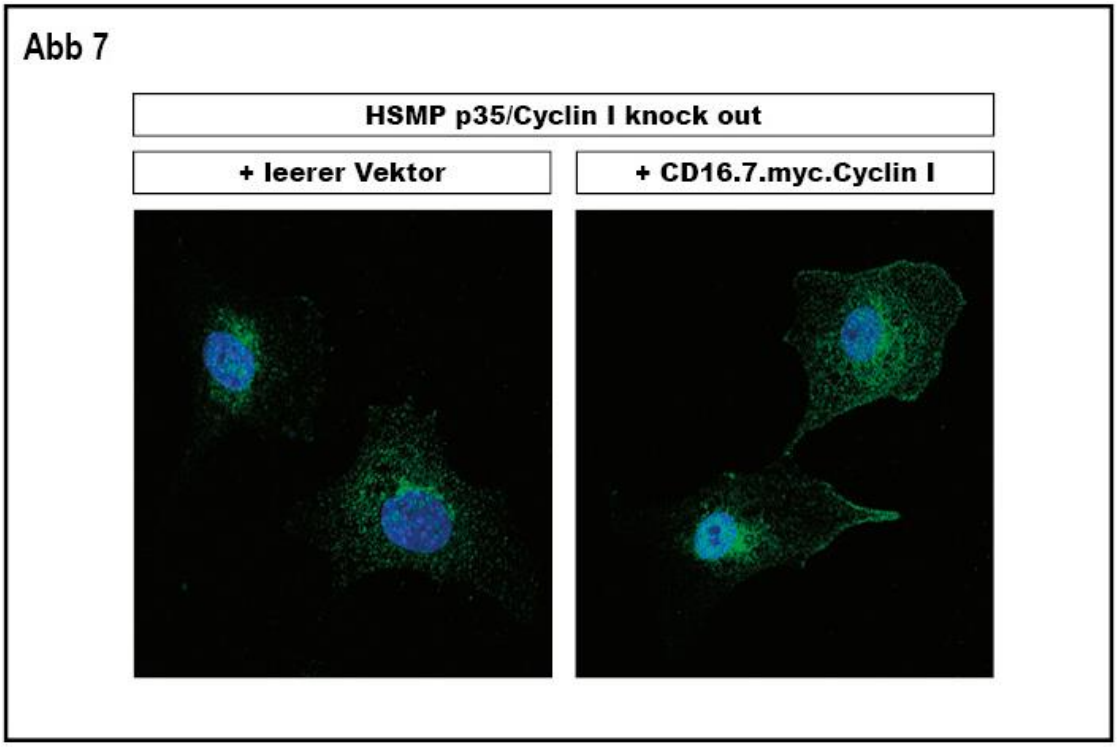

Abbildung 7: Immunfluoreszenz von p35/Cyclin I – Knock out-Podozyten + CD16.7.myc.Cyclin I . . Im Immunostaining auf Cdk5 ist in p35/Cyclin I-Knockout Podozyten in CD16.7.myc.Cyclin I-Expremiierenden Zellen ein deutliches Signal für Cdk5 in der Membran erkennbar, wohingegen in Podozyten die einen leeren Vektor exprimieren Cdk5 im Zytosol sowie perinukleär nachweisbar ist.

5.3. Cdk5 interagiert mit TRPC6 und Podocin

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben bereits den positiven Einfluss von Cdk5 auf das Überleben von Podozyten in der Niere gezeigt. Uns interessierte nun, ob darüber hinaus auch eine Interaktion von Cdk5 mit Proteinen an der Schlitzmembran der Podozyten erfolgt.

Wir transfizierten hierzu HEK-293-T-Zellen mit Cdk5.flag sowie V5.mPodocin bzw. V5.hTRPC6. Nach Lyse der Zellen erfolgte eine V5-antigenvermittelte Immunpräzipitation. Als Positiv-Kontrolle diente uns bei bekannter Interaktion von Cdk5 und p35 das Konstrukt p35.V5 und als Negativ-Kontrolle V5.EPS (EPS15L1).

Die Westernblotanalyse der Immunpräzipitation in Abbildung 8 zeigt, dass CDK5 sowohl mit humanem TRPC6 wie auch Podocin der Maus intragiert.

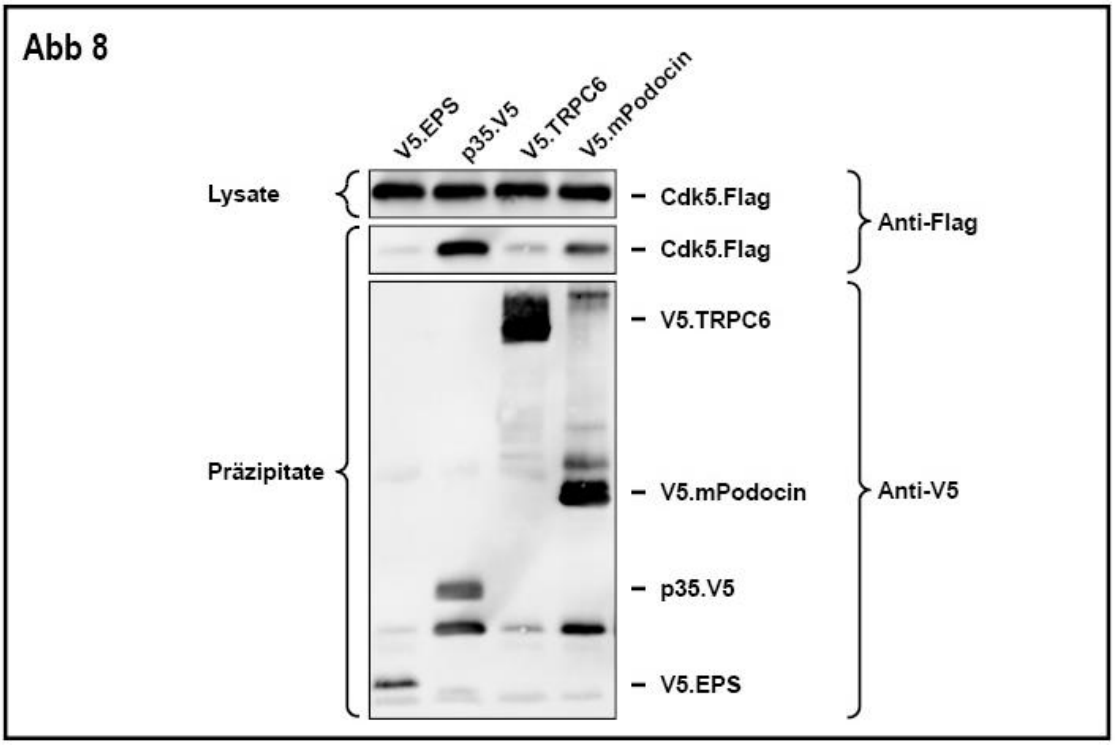

Abbildung 8: Immunpräzipitation von Cdk5 mit Schlitzmembranproteinen. . Deutlich zu erkennen ist, dass nach V5-vermittelter IP und nachfolgendem ECL-Staining mit HRP-Antikörpern bei gleichmäßig ausgeprägtem CDK5.flag-Signal in den Lysaten in den Präzipitaten Cdk5 sowohl in der Spur der Podocin- wie auch TRPC6-exprimierenden Zellen nachzuweisen ist. V5.EPS diente als Negativkontrolle, p35.V5 als Positivkontrolle.

5.4. Cdk5 moduliert die Proteinstabilität von TRPC6

Für Cdk5 ist bekannt, dass es die Genexpression verschiedener Gene durch Modulation nukleärer Transkiptionsfaktoren oder –repressoren beeinflusst. Um eine Cdk5-vermittelte Modulation der TRPC6 Expression zu untersuchen, nutzten wir eine in unserem Labor bereits vorhandene p35-Knockout HSMP-Zelllinie. Wir erstellten mittels lentiviraler Transduktion je eine p35.V5- und p25.myc-Rescuezelllinie. Als Kontrolle diente jeweils eine mit GFP transduzierte p35-Knockout HSMP-Zelllinie. Nach Differenzierung der HSMP-Zellen auf 37°C für zehn Tage erfolgte mittels rtPCR mit TRPC6-spezifischer Primer und Actin-β als Kontrolle eine mRNA-Quantifizierung.

Es sind in Abbildung 9A keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Leveln von TRPC6 im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Ebenso zeigte sich im direkten Vergleich mit einer HSMP-Wildtyp-Zellinie ebenfalls kein Unterschied in den gemessenen mRNA-Leveln. Cdk5 beeinflusst also nicht die Expression von TRPC6.

Für Cdk5 ist weiterhin bekannt, dass es durch Phosphorylierung die Proteinstabilität seiner Substrate verändern kann und sie so z.B. vor proteasomalem Abbau geschützt sind [11]. Da der TRPC6-Nachweis aus Maus-Podozyten aufgrund niedriger Expressionslevel des endogenen TRPC6 im Western Blot schwierig war, transduzierten wir die Rescue-Zelllinien unter zu Hilfenahme eines pbabe-Retrovirus mit TRPC6.V5. Bei der anschließenden Quantifizierung der TRPC6.V5-Konzentrationen stellten wir eine erhöhte Konzentration von TRPC6.V5 in den p35-Rescue-Zelllinien fest. Hingegen lag in den p25-Rescue-Zellen die TRPC6.V5-Konzentration auf Höhe derer der p35-Knockout-GFP-Kontrolle [Abbildung 9B] .

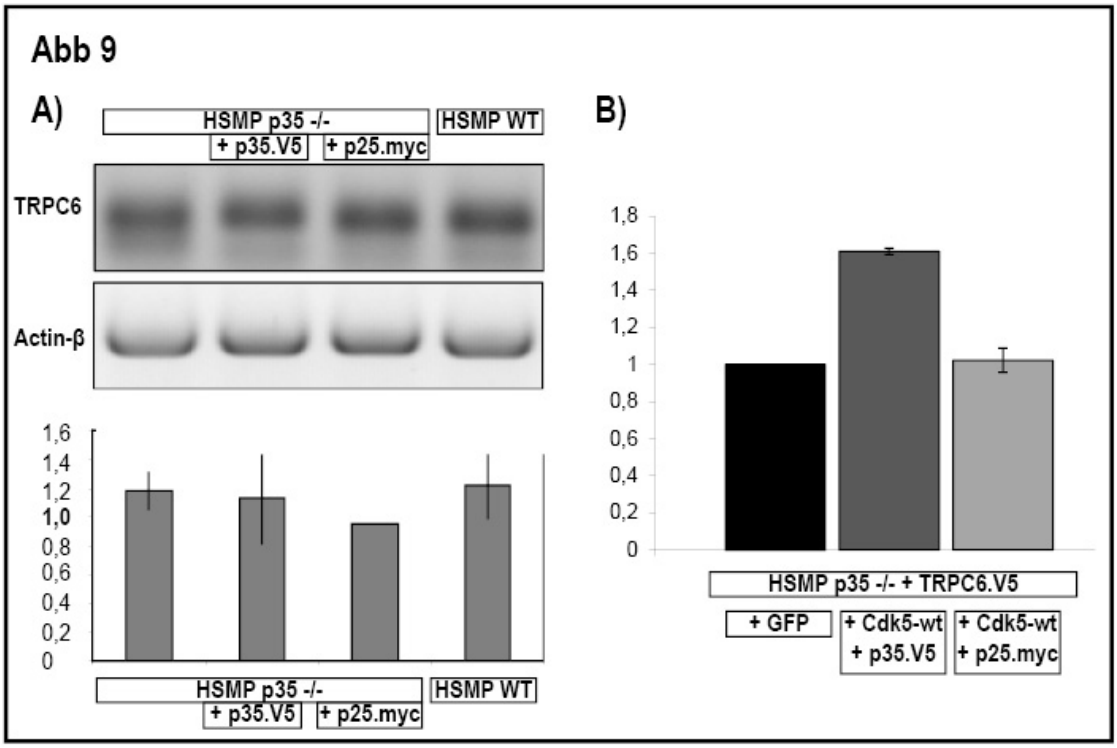

Abbildung 9: mRNA-Quantifizierung in HSMP-p35-Knockout-Zelllinien. . **A)** mRNA-Quantifizierung mittels rtPCR für TRPC6-spezifische Primer. Als Kontrolle fungiert Actin-β. Nach Densitometrischer Quantifizierung zeigt sich für die unterschiedlichen Zelllinien kein Unterschied der in der Zelle vorhandenen mRNA-Level. **B)** Protein-Quantifizierung für TRPC6 mittels Densitometrie. Deutlich ist zu erkennen, dass in Gegenwart von Cdk5-p35 im Gegensatz zu Cdk5-p25 eine erhöhte Proteinkonzentration von TRPC6 in den Zellen aufzufinden ist. Die Proteinkonzentration für TRPC6 in Gegenwart von Cdk5-p25 entspricht der der GFP-Kontrolle.

5.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass sowohl eine Interaktion von Cdk5 mit dem Schlitzmembran-Protein Podocin wie auch dem Ionenkanal TRPC6 erfolgt. In Gegenwart von Cdk5-p35 erfolgt eine Lokalisierung des TRPC6-Cdk5-p35-Komplexes in Detergenzienresistente Membrandomänen, was bei fehlendem oder nicht funktionalem Myristol-Anker nicht beobachtet werden kann. Ebenfalls erfolgt eine ausgeprägt starke subzelluläre Lokalisation von Cdk5 in Gegenwart von membrangezieltem Cyclin I in die Plasmamembran, dies im Vergleich in deutlich geringerem Maße durch endogenes Cyclin I. Cdk5 hat keinen Einfluss auf die Expression von TRPC6. Es konnten jedoch insgesamt erhöhte TRPC6-Proteinkonzentrationen innerhalb des Podozyten in Gegenwart von Cdk5-p35 im Vergleich zu Cdk5-p25 und p35-Knockout gemessen werden.

Dies lässt zusammenfassend folgende drei Schlussfolgerungen zu:

1. Die subzelluläre Lokalisation von Cdk5 wird durch die anwesenden Aktivatoren bestimmt.

2. Cdk5 interagiert mit den Schlitzmembranproteinen TRPC6 und Podocin.

3. Cdk5 reguliert die Proteinstabilität von TRPC6 aber nicht die TRPC6-Expression.

6. Diskussion

Die Bedeutung einer stabilen Nierenfunktion mit intaktem glomerulärem Filter für das Individuum zeigt sich an den Folgen einer gestörten Funktion, die für Patienten so gut wie immer mit deutlichen Einschränkungen der Lebensqualität einhergeht. Die aus Forschungen an Neuronen bereits seit längerem bekannten Folgen einer Dysfunktion von TRPC6, Cdk5 oder p35, die z.B. zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen führen können, stehen in der Forschung bereits seit vielen Jahren im Fokus.

Es liegt nahe, dass auf Grund der hohen Ähnlichkeit von Neuronen und Podozyten auch ein großer Einfluss dieser Proteine auf den Podozyten und seine Funktion zu erwarten ist. Bei beiden Zelltypen handelt es sich um postmitotische Zellen die mit ihren Zellfortsätzen hoch spezialisierte Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Nicht nur die Struktur des Zytoskelettes beider Zelltypen gleicht einander [52], sondern auch die Organisation der Zellfortsätze scheint durch die gleichen Proteine, u.a. Synaptopodin und auch Nephrin beeinflusst zu werden [102].

Durch bisherige Versuche konnte bereits gezeigt werden, dass der an der Schlitzmembran lokalisierte Komplex aus Podocin-TRPC6 durch die atypische Cyclinabhängige Kinase Cdk5 unter Mitwirkung von ihren Aktivatoren direkt beeinflusst wird [87]. Die subzelluläre Lokalisation von Cdk5-Aktivatoren p35, p39 oder Cyclin I ist gut untersucht und ihr Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen konnte bereits beschrieben werden [3, 4, 76]. Bislang war jedoch nicht geklärt, ob die Lokalisation des Aktivators auch die Lokalisation der Effektor-Kinase Cdk5 bestimmt.

6.1. Der Einfluss von Cyclin I und p35/p25 auf die subzelluläre Lokalisation von Cdk5

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des Aktivators von Cdk5 auch eine unterschiedliche Lokalisation von Cdk5 erfolgt. So kann in Gegenwart von p35 eine Lokalisierung von Cdk5 in Detergenz-resistente Membrandomänen (DRM) nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der subzellulären Lokalisation von Cdk5 und Cyclin I gezeigt werden, wobei nach gezielter (Fehl-)Lokalisation von Cyclin I in Membranen auch Cdk5 vermehrt in selbige lokalisiert.

Wir konnten also zeigen, dass die subzelluläre Lokalisation von Cdk5 streng von der Prävalenz des jeweiligen Aktivators abhängt. Es ist anzunehmen, dass die Prädominanz des jeweiligen Aktivators durch die subzelluläre Lokalisation von Cdk5

auch Einfluss auf die Kinasespezifität von Cdk5 hat. Nukleäre Zielproteine werden daher wahrscheinlich eher von Cdk5/Cyclin I angesprochen, während membranassoziierte Proteine von Cdk5/p35 phosphoryliert werden.

Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die nukleäre Lokalisation jedoch nicht über einen Cyclin I-vermittelten Importmechanismus oder Shuttlemechanismus vermittelt wird, da die nukleäre Anreicherung von Cdk5 auch in Zellen ohne Cyclin I erreicht werden konnte, indem der nukleäre Export inhibiert wurde [31].

Zum aktuellen Zeitpunkt gehen wir davon aus, dass Cyclin I und p35 die Translokation von Cdk5 zwar nicht aktiv beeinflussen, jedoch auf Grund ihrer eigenen spezifischen Lokalisation in bestimmte Zellkompartimente Cdk5 dort im Rahmen einer Interaktion lokal binden und somit passiv zur Lokalisation von Cdk5 beitragen. Dies wird auch durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen mit Ergebnissen aus u.a. der Forschung an Neuronen gestützt, bei denen eine Lokalisation von Cdk5 in Abhängigkeit von p35/p39 beobachtet wurde [3, 4] und u.a. eine perinukleäre Lokalisation von Cdk5 In Gegenwart von p25 beobachtet wurde [76].

Die Cdk5/Cyclin I-vermittelte transkriptionale Regulation von Genen, welche einen positiven Einfluss auf das Überleben postmitotischer Zellen haben, konnte bereits nachgewiesen werden [9]. Weiterführende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass durch Cdk5/p35 eine spezifische Phosphorylierung des Membranständigen Ionenkanales TRPC6 erfolgt und in Folge dieser es zu einer gesteigerten Kanalaktivität kommt [30].

6.2. Cdk5 interagiert mit Schlitzmembranproteinen

Interessanterweise konnten wir eine direkte Interaktion von Cdk5 mit den klassischen Schlitzmembranproteinen Podocin und TRPC6 nachweisen. Es ist also möglich, dass Cdk5 auch in der Nähe der Schlitzmembran lokalisiert. Allerdings bedarf die Kinase immer noch der Aktivierung durch den membranständigen Aktivator p35.

Auf Grund der ähnlichen Morphologie von Neuronen und Podozyten im Bereich ihrer Zell-Zell-Kontakte der Synapsen bzw. der Schlitzmembran erscheint es durchaus plausibel, dass die von uns beobachtete Lokalisation von Cdk5/p35 in die cholesterinreichen DRM weitere Parallelen in der Bedeutung dieser Kinase für neuronalen Synapsen und die podozytären Schlitzmembran aufzuzeigen vermag.

Der Einfluss von Cdk5 auf die Podozyten-Biologie, insbesondere auf Proliferation, Differenzierung und Morphologie, ist bereits länger bekannt [27] sodass Cdk5 nicht nur

ein Einfluss von auf die regelhafte Funktion von Podozyten sondern auch direkt auf die Funktionalität der Schlitzmembran und dort lokalisierte Proteine zu haben scheint.

6.3. Beeinflusst Cdk5-p35 die Stabilität oder die Expression von TRPC6?

Unsere weiteren Untersuchungen zeigten zudem, dass TRPC6 in Anwesenheit von Cdk5/p35 auf Proteinebene vermehrt vorliegt. Eine Regulation auf mRNA-Ebene konnte von uns nicht beobachtet werden. Möglicher Weise ist der Abbau von TRPC6 verzögert, sei es durch eine Stabilisierung oder einen Entzug vor einem Abbau in Folge der verstärkten Membranlokalisation.

Für TRP-Kanäle ist bekannt, dass deren intrazelluläres Trafficking von Verschiedenen Faktoren wie pH, intrazellulärer Ca^{2+}-Konzentration und verschiedener Proteine abhängig und vielschichtig reguliert ist. An dieser strengen Regulation aus vesikulärem Transport u.a. über das Trans-Golgi-Netzwerk in Endosomen, late-Endosomen bis zum Lysosom scheint auch Cdk5 einen Anteil zu haben. So wurde in Neuronen für die Endozytose von synaptischen Vesikeln eine Abhängigkeit von der Cdk5-Aktivität [1], sowie eine Cdk5-abhängige Beeinflussung von Autophagie [13] beobachtet. Dies erscheint durch Beobachtungen gestützt, bei denen es nach Inhibition des Rab11- bzw. Rab9-abhängigen TRPC6-Abbaus über das trans-Golgi-Netzwerk nachfolgend zu einem verstärkten, TRPC6-vermittelten Kalziumeinstrom in die Zelle kam [12]. Ob allerdings Cdk5 einen direkten Einfluss auf das Trafficking von TRPC6-beinhaltenden Vesikeln hat ist derzeit noch offen und bedarf weiterer Forschung.

6.4. Ausblick

Für Neuronen konnte zuletzt gezeigt werden, dass TRPC6 direkt an einem Membrankomplex beteiligt ist, der einen Calciumeinstrom in das Neuron vermittelt und die Ausbildung und insbesondere Erhaltung von Dendriten im Bereich des Hippocampus vermittelt. Im Mausmodell konnte in diesem Rahmen ein Modulator dieses Komplexes erprobt werden, der den Dendriten-Verlust aufhält [118]. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf Podozyten erscheint möglich, sodass auch hier der mit TRPC6 assoziierte Membrankomplex als mögliches Ziel für medikamentöse Therapien in den Fokus zukünftiger Forschungen rückt und Moleküle, die eine Modulation des TRPC6-vermittelten Calciumeinstromes möglicherweise einen Abbau von Fußfortsätzen verhindern können.

Mögliche Medikamente die über eine Expressionsregulationsregulation von TRPC6 wirken könnten sind bereits im Fokus der Forschung: Das auch als Viagra bekannte Medikament Sildenafil reduziert in vivo über eine PPAR-γ vermittelte Expressionsregulation von TRPC6 und eine nachfolgend verminderte Kanalaktivität die Proteinurie bei Ratten mit Adriamycin-Induzierter Protein ebenso wie bei Mäusen mit Hyperglykämie-Induzierter Nierenschädigung [99]. Ein nephroprotektiver Effekt ist bereits für andere PPAR-γ-Agonisten wie Glitazone beschrieben worden [63, 117] wobei der genaue Mechanismus bisher unbekannt war. Weitere Studien werden mit großer Sicherheit folgen.

Ob auch eine medikamentöse Beeinflussung der Lokalisation von TRPC6 an die Membran über eine Verringerung der Cdk5-p35-Aktivität möglich ist, bleibt zu klären. In Neuronen konnte eine Verringerung der Kinaseaktivität unter dem Einfluss von Valproinsäure beobachtet werden [109].

Für die weitere Forschung erscheint die Erstellung einer Cdk5-Knockout-Maus und Untersuchung des entsprechenden Phänotypes sinnvoll. Erste Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen an Zellkulturen zeigen eine vermehrte Apoptose von Podozyten für den Cdk5 oder p35-Knockdown [120].

Mit Hilfe von massenspektrometrischer Analyse des Phospho-Proteoms ist es in Zukunft auch an Patientenproben möglich, nach spezifisch phosphorylierten Peptiden zu suchen. So könnte die Frage adressiert werden, ob eine verstärkte Phosphorylierung von TRPC6 mit Erkrankungen wie FSGS oder der diabetischen Nephropathie einhergeht.

7. Zusammenfassung

Die hier vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss der spezifischen Aktivatoren p35/p25 und Cyclin I auf die subzelluläre Lokalisation der atypischen Cyclin-abhängigen Kinase Cdk5 im Podozyten und einen möglichen Einfluss von Cdk5 auf Proteine der podozytären Schlitzmembran.

Die Niere als für den Körper essentielles Ausscheidungsorgan kann durch Filtration des Blutes und anschließende Rückresorption der für den Körper essentiellen Bestandteile ein Urinvolumen von täglich rund 2 Litern produzieren. Insbesondere für das Zurückhalten der nicht-rückresorbierbaren Bestandteile des Blutes ist ein intakter Filter der Glomeruli und eine intakte Funktion der an der dortigen Filtrationsbarriere beteiligten Podozyten unabdingbar. Erkrankungen wie die fokal-segmentale Glomerulosklerose, die eine terminale Niereninsuffizienz mit Proteinverlust im Sinne eines nephrotischen Syndromes verursachen, haben in erster Linie ihre Ursache in einer Störung der podozytären Funktion. Mutationen in Proteinen wie Podocin, Nephrin, oder TRPC6 führen im Verlauf zu zellmorphologischen Veränderungen und Fehlfunktion der Podozyten. Podozyten weisen morphologisch und strukturell eine große Ähnlichkeit zu Neuronen auf. Ergebnisse aus der Neuroforschung, wie z.B. zur Rolle von Cdk5 bei neurodegenerativen Erkrankungen konnten auch im Podozyten nachvollzogen und weiter entwickelt werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Lokalisation von Cdk5 vom Vorkommen spezifischer Aktivatoren abhängt. So ist die Lokalisation von Cdk5 in detergenz-resistente Membrandomänen von der Anwesenheit von p35 und der Integrität des Myristolankers von p35 abhängig. Cyclin I vermittelt dagegen eine nukleäre Lokalisation von Cdk5. Modifiziert man Cyclin I in einer Weise, dass es an die Plasmamembran lokalisiert, so kann Cdk5 in Cyclin I- und p35-defizienten Mauspodozyten vorrangig in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, dass die Lokalisation von Cdk5 streng von der Lokalisation des spezifischen Aktivators abhängt.

Wir konnten weiter zeigen, dass Cdk5 mit den Schlitzmembranproteinen Podocin und TRPC6 interagiert. Eine Expressionsregulation von TRPC6 konnten wir mittels mRNA-Quantifizierung ausschließen. Dennoch erscheint TRPC6 auf Proteinebene in Anwesenheit von Cdk5/p35 in der Zell stabilisiert. Ob eine direkte Proteinstabilisierung und somit ein verringerter Abbau oder aber die Lokalisation von TRPC6 in die Membran hierbei entscheidend ist, ist in weiteren Experimenten zu klären.

8. Literaturverzeichnis

[1] *Activity-Dependent Control of Slow Synaptic Vesicle Endocytosis by Cyclin-Dependent Kinase 5 | Journal of Neuroscience*. URL http://www.jneurosci.org/content/27/2/401.long. - abgerufen am 2018-03-18

[2] ALPERN, R. J. ; MOE, O. W. ; CAPLAN, M. J. (Hrsg.): *Seldin and Giebisch's the kidney: physiology & pathophysiology*. Fifth edition. Aufl. Amsterdam : Elsevier/AP, 2013 — ISBN 978-0-12-381462-3

[3] ASADA, AKIKO ; SAITO, TARO ; HISANAGA, SHIN-ICHI: Phosphorylation of p35 and p39 by Cdk5 determines the subcellular location of the holokinase in a phosphorylation-site-specific manner. In: *J Cell Sci* Bd. 125 (2012), Nr. 14, S. 3421–3429

[4] ASADA, AKIKO ; YAMAMOTO, NAOYUKI ; GOHDA, MASAKI ; SAITO, TARO ; HAYASHI, NOBUHIRO ; HISANAGA, SHIN-ICHI: Myristoylation of p39 and p35 is a determinant of cytoplasmic or nuclear localization of active cycline-dependent kinase 5 complexes. In: *Journal of Neurochemistry* Bd. 106 (2008), Nr. 3, S. 1325–1336

[5] BAI, XIAOYAN ; HOU, XIAOYAN ; TIAN, JIANWEI ; GENG, JIAN ; LI, XIAO ; BAI, XIAOYAN ; HOU, XIAOYAN ; TIAN, JIANWEI ; U. A.: CDK5 promotes renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via ERK1/2/PPARγ pathway. In: *Oncotarget* Bd. 7 (2016), Nr. 24, S. 36510–36528

[6] BENZING, THOMAS: Signaling at the Slit Diaphragm. In: *Journal of the American Society of Nephrology* Bd. 15 (2004), Nr. 6, S. 1382–1391

[7] BINUKUMAR, BK. ; SHUKLA, VARSHA ; AMIN, NIRANJANA D. ; GRANT, PHILIP ; BHASKAR, M. ; SKUNTZ, SUSAN ; STEINER, JOSEPH ; PANT, HARISH C.: Peptide TFP5/TP5 derived from Cdk5 activator P35 provides neuroprotection in the MPTP model of Parkinson's disease. In: *Molecular Biology of the Cell* Bd. 26 (2015), Nr. 24, S. 4478–4491

[8] BOURON, ALEXANDRE ; CHAUVET, SYLVAIN ; DRYER, STUART ; ROSADO, JUAN A.: Second Messenger-Operated Calcium Entry Through TRPC6 (2016), S. 201–249

[9] BRINKKOETTER, PAUL T. ; OLIVIER, PAUL ; WU, JIMMY S. ; HENDERSON, SCOTT ; KROFFT, RONALD D. ; PIPPIN, JEFFREY W. ; HOCKENBERY, DAVID ; ROBERTS, JAMES M. ; U. A.: Cyclin I activates Cdk5 and regulates expression of Bcl-2 and Bcl-XL in postmitotic mouse cells. In: *The Journal of Clinical Investigation* Bd. 119 (2009), Nr. 10, S. 3089–3101

[10] BRINKKOETTER, PAUL T. ; PIPPIN, JEFFREY W. ; SHANKLAND, STUART J.: Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells. In: *Cell Cycle* Bd. 9 (2010), Nr. 9, S. 1729–1731

[11] BRINKKOETTER, PAUL T ; WU, JIMMY S ; OHSE, TAKAMOTO ; KROFFT, RONALD D ; SCHERMER, BERNHARD ; BENZING, THOMAS ; PIPPIN, JEFFREY W ; SHANKLAND, STUART J: p35, the non-cyclin activator of Cdk5, protects podocytes against apoptosis in vitro and in vivo. In: *Kidney Int* Bd. 77 (2010), Nr. 8, S. 690–699

[12] CAYOUETTE, SYLVIE ; BOUSQUET, SIMON M. ; FRANCOEUR, NANCY ; DUPRÉ, ÉMILIE ; MONET, MICHAËL ; GAGNON, HUGO ; GUEDRI, YOUSSEF B. ; LAVOIE, CHRISTINE ; U. A.: Involvement of Rab9 and Rab11 in the intracellular trafficking of TRPC6. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* Bd. 1803 (2010), Nr. 7, S. 805–812

[13] *Cdk5-mediated phosphorylation of endophilin B1 is required for induced autophagy in models of Parkinson's disease | Nature Cell Biology*. URL https://www.nature.com/articles/ncb2217. - abgerufen am 2018-03-18

[14] CHEN, C ; OKAYAMA, H: High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. In: *Molecular and Cellular Biology* Bd. 7 (1987), Nr. 8, S. 2745–2752

[15] CHENG, K. ; IP, N. Y.: Cdk5: A New Player at Synapses. In: *Neurosignals* Bd. 12 (2003), Nr. 4–5, S. 180–190

[16] CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Analytical Biochemistry* Bd. 162 (1987), Nr. 1, S. 156–159

[17] CLAPHAM, DAVID E. ; RUNNELS, LOREN W. ; STRÜBING, CARSTEN: The trp ion channel family. In: *Nature Reviews Neuroscience* Bd. 2 (2001), Nr. 6, S. 387–396

[18] COONS, A. H.: The beginnings of immunofluorescence. In: *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* Bd. 87 (1961), S. 499–503

[19] DEEN, W. M. ; BOHRER, M. P. ; BRENNER, B. M.: Macromolecule transport across glomerular capillaries: application of pore theory. In: *Kidney International* Bd. 16 (1979), Nr. 3, S. 353–365

[20] DHAKA, AJAY ; VISWANATH, VEENA ; PATAPOUTIAN, ARDEM: Trp Ion Channels and Temperature Sensation. In: *Annual Review of Neuroscience* Bd. 29 (2006), Nr. 1, S. 135–161

[21] DHARIWALA, FATEMA A. ; RAJADHYAKSHA, MEDHA S.: An Unusual Member of the Cdk Family: Cdk5. In: *Cellular and Molecular Neurobiology* Bd. 28 (2008), Nr. 3, S. 351–369

[22] DHAVAN, RANI ; TSAI, LI-HUEI: A decade of CDK5. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Bd. 2 (2001), Nr. 10, S. 749–759

[23] DRENCKHAHN, D. ; SCHNITTLER, H. ; NOBILING, R. ; KRIZ, W.: Ultrastructural organization of contractile proteins in rat glomerular mesangial cells. In: *The American Journal of Pathology* Bd. 137 (1990), Nr. 6, S. 1343–1351

[24] DRYER, STUART E. ; REISER, JOCHEN: TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Bd. 299 (2010), Nr. 4, S. F689–F701

[25] FAUL, CHRISTIAN ; ASANUMA, KATSUHIKO ; YANAGIDA-ASANUMA, ETSUKO ; KIM, KWANGHEE ; MUNDEL, PETER: Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. In: *Trends in Cell Biology* Bd. 17 (2007), Nr. 9, S. 428–437

[26] FOSTER, REBECCA R. ; SALEEM, MOIN A. ; MATHIESON, PETER W. ; BATES, DAVID O. ; HARPER, STEVEN J.: Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Bd. 288 (2005), Nr. 1, S. F48–F57

[27] GRIFFIN, SIAN V. ; HIROMURA, KEIJU ; PIPPIN, JEFFREY ; PETERMANN, ARNDT T. ; BLONSKI, MARY J. ; KROFFT, RON ; TAKAHASHI, SATORU ; KULKARNI, ASHOK B. ; U. A.: Cyclin-Dependent Kinase 5 Is a Regulator of Podocyte Differentiation, Proliferation, and Morphology. In: *The American Journal of Pathology* Bd. 165 (2004), Nr. 4, S. 1175–1185

[28] GRIFFIN, SIÂN V. ; OLIVIER, J. PAUL ; PIPPIN, JEFFREY W. ; ROBERTS, JAMES M. ; SHANKLAND, STUART J.: Cyclin I Protects Podocytes from Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* Bd. 281 (2006), Nr. 38, S. 28048–28057

[29] GUPTA, A. ; TSAI, L.-H.: Cyclin-Dependent Kinase 5 and Neuronal Migration in the Neocortex. In: *Neurosignals* Bd. 12 (2003), Nr. 4–5, S. 173–179

[30] HAGMANN, HENNING ; MANGOLD, NICOLE ; RINSCHEN, MARKUS M. ; KOENIG, TIM ; KUNZELMANN, KARL ; SCHERMER, BERNHARD ; BENZING, THOMAS ; BRINKKOETTER, PAUL T.: Proline-dependent and basophilic kinases phosphorylate human TRPC6 at serine 14 to control channel activity through increased membrane expression. In: *The FASEB Journal* Bd. 32 (2017), Nr. 1, S. 208–219

[31] HAGMANN, HENNING ; TANIGUCHI, YOSHINORI ; PIPPIN, JEFFREY W. ; KAUERZ, HANS-MICHAEL ; BENZING, THOMAS ; SHANKLAND, STUART J. ; BRINKKOETTER, PAUL THOMAS: Cyclin I and p35 determine the subcellular distribution of Cdk5. In: *American Journal of Physiology - Cell Physiology* Bd. 308 (2015), Nr. 4, S. C339–C347

[32] HARALDSSON, BÖRJE ; NYSTRÖM, JENNY ; DEEN, WILLIAM M.: Properties of the Glomerular Barrier and Mechanisms of Proteinuria. In: *Physiological Reviews* Bd. 88 (2008), Nr. 2, S. 451–487

[33] HARDIE, ROGER C. ; MINKE, BARUCH: The trp gene is essential for a light-activated Ca2+ channel in Drosophila photoreceptors. In: *Neuron* Bd. 8 (1992), Nr. 4, S. 643–651

[34] HE, LISHENG ; ZHANG, ZHAOJUN ; YU, YAN ; AHMED, SOHAIL ; CHEUNG, NAM SANG ; QI, ROBERT Z.: The neuronal p35 activator of Cdk5 is a novel F-actin binding and bundling protein. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* Bd. 68 (2011), Nr. 9, S. 1633–1643

[35] HEIKKILÄ, EIJA ; RISTOLA, MERVI ; HAVANA, MARIKA ; JONES, NINA ; HOLTHÖFER, HARRY ; LEHTONEN, SANNA: Trans-interaction of nephrin and Neph1/Neph3 induces cell adhesion that associates with decreased tyrosine phosphorylation of nephrin. In: *Biochemical Journal* Bd. 435 (2011), Nr. 3, S. 619–628

[36] HEROLD, GERD: *Innere Medizin 2014*. Auflage: 1., Aufl. Aufl. Köln : Herold, Gerd, 2013 — ISBN 978-3-9814660-3-4

[37] HSIAO, KUANGFU ; BOZDAGI, OZLEM ; BENSON, DEANNA L.: Axonal cap-dependent translation regulates presynaptic p35. In: *Developmental neurobiology* Bd. 74 (2014), Nr. 3, S. 351–364

[38] HUBER, TOBIAS B. ; BENZING, THOMAS: The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* Bd. 14 (2005), Nr. 3, S. 211–216

[39] HUBER, TOBIAS B. ; KÖTTGEN, MICHAEL ; SCHILLING, BIRGIT ; WALZ, GERD ; BENZING, THOMAS: Interaction with Podocin Facilitates Nephrin Signaling. In: *Journal of Biological Chemistry* Bd. 276 (2001), Nr. 45, S. 41543–41546

[40] HUBER, TOBIAS B ; SCHERMER, BERNHARD ; BENZING, THOMAS: Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. In: *Nephron. Experimental Nephrology* Bd. 106 (2007), Nr. 2, S. e27-31

[41] HUBER, TOBIAS B. ; SCHERMER, BERNHARD ; MÜLLER, ROMAN ULRICH ; HÖHNE, MARTIN ; BARTRAM, MALTE ; CALIXTO, ANDREA ; HAGMANN, HENNING ; REINHARDT, CHRISTIAN ; U. A.: Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Bd. 103 (2006), Nr. 46, S. 17079–17086

[42] ICHIMURA, KOICHIRO ; KURIHARA, HIDETAKE ; SAKAI, TATSUO: Actin Filament Organization of Foot Processes in Rat Podocytes. In: *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* Bd. 51 (2003), Nr. 12, S. 1589–1600

[43] *Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. | JCB*. URL http://jcb.rupress.org/content/93/1/97.long. - abgerufen am 2018-01-16

[44] JAT, P S ; NOBLE, M D ; ATALIOTIS, P ; TANAKA, Y ; YANNOUTSOS, N ; LARSEN, L ; KIOUSSIS, D: Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 88 (1991), Nr. 12, S. 5096–5100

[45] JENSEN, MICHAEL RUGAARD ; AUDOLFSSON, THORIR ; FACTOR, VALENTINA M ; THORGEIRSSON, SNORRI S: In vivo expression and genomic organization of the mouse cyclin I gene (Ccni). In: *Gene* Bd. 256 (2000), Nr. 1–2, S. 59–67

[46] JEONG, JAEHOON ; PARK, YOUNG-UN ; KIM, DAE-KYUM ; LEE, SAEBOM ; KWAK, YONGDO ; LEE, SEOL-AE ; LEE, HAERYUN ; SUH, YOO-HUN ; U. A.: Cdk5 Phosphorylates Dopamine D2 Receptor and Attenuates Downstream Signaling. In: *PLoS ONE* Bd. 8 (2013), Nr. 12

[47] KABOURIDIS, P. S. ; MAGEE, A. I. ; LEY, S. C.: S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. In: *The EMBO journal* Bd. 16 (1997), Nr. 16, S. 4983–4998

[48] KANDA, SHOICHIRO ; HARITA, YUTAKA ; SHIBAGAKI, YOSHIO ; SEKINE, TAKASHI ; IGARASHI, TAKASHI ; INOUE, TAKAFUMI ; HATTORI, SEISUKE: Tyrosine

phosphorylation–dependent activation of TRPC6 regulated by PLC-γ1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. In: *Molecular Biology of the Cell* Bd. 22 (2011), Nr. 11, S. 1824–1835

[49] KARNOVSKY, M. J. ; AINSWORTH, S. K.: The structural basis of glomerular filtration. In: *Advances in Nephrology from the Necker Hospital* Bd. 2 (1972), S. 35–60

[50] KIM, SUNG HYUN ; RYAN, TIMOTHY A.: CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release. In: *Neuron* Bd. 67 (2010), Nr. 5, S. 797–809

[51] KINDT, KATIE S. ; VISWANATH, VEENA ; MACPHERSON, LINDSEY ; QUAST, KATHLEEN ; HU, HONGZHEN ; PATAPOUTIAN, ARDEM ; SCHAFER, WILLIAM R.: Caenorhabditis elegans TRPA-1 functions in mechanosensation. In: *Nature Neuroscience* Bd. 10 (2007), Nr. 5, S. 568–577

[52] KOBAYASHI, N. ; MUNDEL, P.: A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells. In: *Cell and Tissue Research* Bd. 291 (1998), Nr. 2, S. 163–174

[53] KOBAYASHI, NAOTO ; GAO, SHUANG-YAN ; CHEN, JIE ; SAITO, KYOKO ; MIYAWAKI, KYOJY ; LI, CHUN-YU ; PAN, LEI ; SAITO, SHOUICHIRO ; U. A.: Process formation of the renal glomerular podocyte: is there common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? In: *Anatomical science international* Bd. 79 (2004), Nr. 1, S. 1–10

[54] KOLANUS, WALDEMAR ; ROMEO, CHARLES ; SEED, BRIAN: T cell activation by clustered tyrosine kinases. In: *Cell* Bd. 74 (1993), Nr. 1, S. 171–183

[55] KOOS, FABIENNE: *Podocin regulates TRPC6 ion channels at the slit diaphragm URN: urn:nbn:de:bsz:25-opus-84164*. Freiburg, Albert-Ludwigs-Universität

[56] KRICKA, L. J. ; NOZAKI, O. ; STANLEY, P. E.: Bioluminescence and chemiluminescence literature. The 1981 literature: Part I. In: *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* Bd. 8 (1993), Nr. 4, S. 215–235

[57] KRIZ, WILHELM ; GRETZ, NORBERT ; LEMLEY, KEVIN V.: Progression of glomerular diseases: Is the podocyte the culprit? In: *Kidney International* Bd. 54 (1998), Nr. 3, S. 687–697

[58] KUMAZAWA, A ; MITA, N ; HIRASAWA, M ; ADACHI, T ; SUZUKI, H ; SHAFEGHAT, N ; KULKARNI, A B ; MIKOSHIBA, K ; U. A.: Cyclin-dependent kinase 5 is required for normal cerebellar development. In: *Molecular and cellular neurosciences* Bd. 52 (2013), S. 97–105

[59] L SZYMCZAK-WORKMAN, ANDREA ; VIGNALI, KATE ; VIGNALI, DARIO: *Design and Construction of 2A Peptide-Linked Multicistronic Vectors*. Bd. 2012, 2012

[60] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* Bd. 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685

[61] LAURENS, W. ; BATTAGLIA, C. ; FOGLIENI, C. ; DE VOS, R. ; MALANCHINI, B. ; VAN DAMME, B. ; VANRENTERGHEM, Y. ; REMUZZI, G. ; U. A.: Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo. In: *Kidney International* Bd. 47 (1995), Nr. 4, S. 1078–1086

[62] LAZARO, J. B. ; KITZMANN, M. ; POUL, M. A. ; VANDROMME, M. ; LAMB, N. J. ; FERNANDEZ, A.: Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells. In: *Journal of Cell Science* Bd. 110 (1997), Nr. 10, S. 1251–1260

[63] LIU, HUA-FENG ; GUO, LI-QIN ; HUANG, YU-YING ; CHEN, KENG ; TAO, JING-LI ; LI, SHANG-MEI ; CHEN, XIAO-WEN: Thiazolidinedione attenuate proteinuria and glomerulosclerosis in Adriamycin-induced nephropathy rats via slit diaphragm protection. In: *Nephrology* Bd. 15 (2010), Nr. 1, S. 75–83

[64] LIU, ZHAOWEI ; YANG, JIAJIA ; ZHANG, XIAOCHEN ; XU, PENGJUAN ; ZHANG, TAO ; YANG, ZHUO: Developmental changes in the expression and function of TRPC6 channels related the F-actin organization during differentiation in podocytes. In: *Cell Calcium* Bd. 58 (2015), Nr. 6, S. 541–548

[65] LÜLLMANN-RAUCH, RENATE ; PAULSEN, FRIEDRICH: *Taschenlehrbuch Histologie*. 4. Auflage. Aufl. : Thieme Verlag — ISBN 978-3-13-151664-0

[66] MA, RONG ; CHAUDHARI, SARIKA ; LI, WEIZU: Canonical Transient Receptor Potential 6 Channel: A New Target of Reactive Oxygen Species in Renal Physiology and Pathology. In: *Antioxidants & Redox Signaling* (2016)

[67] MAGEN, DANIELLA ; OFIR, AYALA ; BERGER, LIRON ; GOLDSHER, DORIT ; ERAN, AYELET ; KATIB, NASSSER ; NIJEM, YOUSIF ; VLODAVSKY, EUVGENI ; U. A.: Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with a loss-of-function mutation in CDK5. In: *Human Genetics* Bd. 134 (2015), Nr. 3, S. 305–314

[68] MCDONELL, M. W. ; SIMON, M. N. ; STUDIER, F. W.: Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. In: *Journal of Molecular Biology* Bd. 110 (1977), Nr. 1, S. 119–146

[69] MEDICAL NETCARE GMBH: Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den Gemeinsamen Bundesausschuss. Berichtsjahr: 2013 (2014)

[70] MITA, NAOKI ; HE, XIAOJUAN ; SASAMOTO, KODAI ; MISHIBA, TOMOHIDE ; OHSHIMA, TOSHIO: Cyclin-Dependent Kinase 5 Regulates Dendritic Spine Formation and Maintenance of Cortical Neuron in the Mouse Brain. In: *Cerebral Cortex* Bd. 26 (2016), Nr. 3, S. 967–976

[71] MOELLER, M. J.: Neue Erkenntnisse zur glomerulären Struktur. In: *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* Bd. 135 (2010), Nr. 24, S. 1232–1236

[72] NAKAMURA, TAKESHI ; SANOKAWA, REIKO ; SASAKI, YASNORY F. ; AYUSAWA, DAI ; OISHI, MICHIO ; MORI, NOZOMU: Cyclin I: A New Cyclin Encoded by a Gene Isolated from Human Brain. In: *Experimental Cell Research* Bd. 221 (1995), Nr. 2, S. 534–542

[73] NGUYEN, M. D. ; JULIEN, J.-P.: Cyclin-Dependent Kinase 5 in Amyotrophic Lateral Sclerosis. In: *Neurosignals* Bd. 12 (2003), Nr. 4–5, S. 215–220

[74] OHLSON, MARIA ; SÖRENSSON, JENNY ; HARALDSSON, BÖRJE: A gel-membrane model of glomerular charge and size selectivity in series. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Bd. 280 (2001), Nr. 3, S. F396–F405

[75] PARK, KEVIN H.J. ; LU, GE ; FAN, JING ; RAYMOND, LYNN A. ; LEAVITT, BLAIR R.: Decreasing Levels of the cdk5 Activators, p25 and p35, Reduces Excitotoxicity in Striatal Neurons. In: *Journal of Huntington's disease* Bd. 1 (2012), Nr. 1

[76] PATRICK, GENTRY N. ; ZUKERBERG, LAWRENCE ; NIKOLIC, MARGARETA ; DE LA MONTE, SUZANNE ; DIKKES, PIETER ; TSAI, LI-HUEI: Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk5 activity and promotes neurodegeneration. In: *Nature* Bd. 402 (1999), Nr. 6762, S. 615–622

[77] PAVENSTÄDT, H.: The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes. In: *Experimental Nephrology* Bd. 6 (1998), Nr. 2, S. 98–103

[78] PIEDRAHITA, DIEGO ; HERNÁNDEZ, ISRAEL ; LÓPEZ-TOBÓN, ALEJANDRO ; FEDOROV, DMITRY ; OBARA, BOGUSLAW ; MANJUNATH, B.S. ; BOUDREAU, RYAN L ; DAVIDSON, BEVERLY ; U. A.: Silencing of CDK5 Reduces Neurofibrillary Tangles in Transgenic Alzheimer's Mice. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 30 (2010), Nr. 42, S. 13966–13976

[79] RAKIĆ, SONJA ; DAVIS, COLIN ; MOLNÁR, ZOLTÁN ; NIKOLIĆ, MARGARETA ; PARNAVELAS, JOHN G.: Role of p35/Cdk5 in Preplate Splitting in the Developing Cerebral Cortex. In: *Cerebral Cortex* Bd. 16 (2006), Nr. suppl 1, S. i35–i45

[80] RAKIĆ, SONJA ; KANATANI, SHIGEAKI ; HUNT, DAVID ; FAUX, CLARE ; CARIBONI, ANNA ; CHIARA, FRANCESCA ; KHAN, SHABANA ; WANSBURY, OLIVIA ; U. A.: Cdk5 Phosphorylation of ErbB4 is Required for Tangential Migration of Cortical Interneurons. In: *Cerebral Cortex (New York, NY)* Bd. 25 (2015), Nr. 4, S. 991–1003

[81] RAKIĆ, SONJA ; YANAGAWA, YUCHIO ; OBATA, KUNIHIKO ; FAUX, CLARE ; PARNAVELAS, JOHN G. ; NIKOLIĆ, MARGARETA: Cortical Interneurons Require p35/Cdk5 for their Migration and Laminar Organization. In: *Cerebral Cortex (New York, NY)* Bd. 19 (2009), Nr. 8, S. 1857–1869

[82] REISER, JOCHEN ; KRIZ, WILHELM ; KRETZLER, MATTHIAS ; MUNDEL, PETER: The Glomerular Slit Diaphragm Is a Modified Adherens Junction. In: *Journal of the American Society of Nephrology* Bd. 11 (2000), Nr. 1, S. 1–8

[83] REISER, JOCHEN ; POLU, KRISHNA R ; MOLLER, CLEMENS C ; KENLAN, PETER ; ALTINTAS, MEHMET M ; WEI, CHANGLI ; FAUL, CHRISTIAN ; HERBERT, STEPHANIE ; U. A.: TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. In: *Nat Genet* Bd. 37 (2005), Nr. 7, S. 739–744

[84] RIEHLE, MARC ; BÜSCHER, ANJA K. ; GOHLKE, BJÖRN-OLIVER ; KAßMANN, MARIO ; KOLATSI-JOANNOU, MARIA ; BRÄSEN, JAN H. ; NAGEL, MATO ; BECKER, JAN U. ; U. A.: TRPC6 G757D Loss-of-Function Mutation Associates with FSGS. In: *Journal of the American Society of Nephrology* (2016), S. ASN.2015030318

[85] RINSCHEN, MARKUS M. ; WU, XIONGWU ; KÖNIG, TIM ; PISITKUN, TRAIRAK ; HAGMANN, HENNING ; PAHMEYER, CAROLINE ; LAMKEMEYER, TOBIAS ; KOHLI, PRIYANKA ; U. A.: Phosphoproteomic Analysis Reveals Regulatory Mechanisms at the Kidney Filtration Barrier. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* Bd. 25 (2014), Nr. 7, S. 1509–1522

[86] RODEWALD, RICHARD ; KARNOVSKY, MORRIS J.: Porous Substructure of the Glomerular Slit Diaphragm in the Rat and Mouse. In: *The Journal of Cell Biology* Bd. 60 (1974), Nr. 2, S. 423–433

[87] RÜHL, MICHAEL ULRICH: *Der Einfluss der atypischen Zyklin-abhängigen Kinase Cdk5 auf die posttranslationale Modifikation von Podocin*. Köln, Deutsche Zentralbibliothek für Medizin, 2014

[88] RUOTSALAINEN, VESA ; LJUNGBERG, PAIVI ; WARTIOVAARA, JORMA ; LENKKERI, ULLA ; KESTILA, MARJO ; JALANKO, HANNU ; HOLMBERG, CHRISTER ; TRYGGVASON, KARL: Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 96 (1999), Nr. 14, S. 7962–7967

[89] SADLEIR, KATHERINE R. ; VASSAR, ROBERT: Cdk5 Protein Inhibition and Aβ42 Increase BACE1 Protein Level in Primary Neurons by a Post-transcriptional Mechanism. In: *The Journal of Biological Chemistry* Bd. 287 (2012), Nr. 10, S. 7224–7235

[90] SANGER, F. ; NICKLEN, S. ; COULSON, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 74 (1977), Nr. 12, S. 5463–5467

[91] SCHERMER, BERNHARD ; BENZING, THOMAS: Lipid–Protein Interactions along the Slit Diaphragm of Podocytes. In: *Journal of the American Society of Nephrology* Bd. 20 (2009), Nr. 3, S. 473–478

[92] SCHINDLER, J. ; JUNG, S. ; NIEDNER-SCHATTEBURG, G. ; FRIAUF, E. ; NOTHWANG, H. G.: Enrichment of integral membrane proteins from small amounts of brain tissue. In: *Journal of Neural Transmission* Bd. 113 (2006), Nr. 8, S. 995–1013

[93] SCHMIDT, ROBERT F. ; LANG, FLORIAN ; HECKMANN, MANFRED: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*. Auflage: 30. Aufl. 2007. Aufl. Berlin, Heidelberg : Springer, 2007 — ISBN 978-3-540-32908-4

[94] SHANKLAND, S. J. ; PIPPIN, J. W. ; REISER, J. ; MUNDEL, P.: Podocytes in culture: past, present, and future. In: *Kidney International* Bd. 72 (2007), Nr. 1, S. 26–36

[95] SHETTY, K. T. ; KAECH, S. ; LINK, W. T. ; JAFFE, H. ; FLORES, C. M. ; WRAY, S. ; PANT, H. C. ; BEUSHAUSEN, S.: Molecular Characterization of a Neuronal-Specific Protein that Stimulates the Activity of Cdk5. In: *Journal of Neurochemistry* Bd. 64 (1995), Nr. 5, S. 1988–1995

[96] SHUKLA, VARSHA ; SKUNTZ, SUSAN ; PANT, HARISH C: Deregulated cdk5 activity is involved in inducing Alzheimer's disease. In: *Archives of medical research* Bd. 43 (2012), Nr. 8, S. 655–662

[97] SIMONS, KAI ; TOOMRE, DEREK: Lipid rafts and signal transduction. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Bd. 1 (2000), Nr. 1, S. 31–39

[98] SMITHIES, OLIVER: Why the kidney glomerulus does not clog: A gel permeation/diffusion hypothesis of renal function. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* Bd. 100 (2003), Nr. 7, S. 4108–4113

[99] SONNEVELD, RAMON ; HOENDEROP, JOOST G. ; ISIDORI, ANDREA M. ; HENIQUE, CAROLE ; DIJKMAN, HENRY B. ; BERDEN, JO H. ; THARAUX, PIERRE-LOUIS ; VLAG, JOHAN VAN DER ; U. A.: Sildenafil Prevents Podocyte Injury via PPAR-γ–Mediated TRPC6 Inhibition. In: *Journal of the American Society of Nephrology* (2016), S. ASN.2015080885

[100] SPASSOVA, MARIA A. ; HEWAVITHARANA, THAMARA ; XU, WEN ; SOBOLOFF, JONATHAN ; GILL, DONALD L.: A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 103 (2006), Nr. 44, S. 16586–16591

[101] SPECKMANN, ERWIN-JOSEF ; HESCHELER, JÜRGEN ; KÖHLING, RÜDIGER: *Physiologie: mit Zugang zum Elsevier-Portal*. Auflage: 5. Aufl. München u.a. : Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2008 — ISBN 978-3-437-41318-6

[102] SUN, YU ; ZHANG, HONGXIA ; HU, RUIMIN ; SUN, JIANYONG ; MAO, XING ; ZHAO, ZHONGHUA ; CHEN, QI ; ZHANG, ZHIGANG: The Expression and Significance of Neuronal Iconic Proteins in Podocytes. In: *PLoS ONE* Bd. 9 (2014), Nr. 4

[103] TANIGUCHI, YOSHINORI ; PIPPIN, JEFFREY W ; HAGMANN, HENNING ; KROFFT, RONALD D ; CHANG, ALICE M ; ZHANG, JIONG ; TERADA, YOSHIO ; BRINKKOETTER, PAUL ; U. A.: Both cyclin I and p35 are required for maximal survival benefit of Cyclin-dependent kinase 5 in kidney podocytes. In: *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (2012)

[104] TISCORNIA, GUSTAVO ; SINGER, ODED ; VERMA, INDER M: Production and purification of lentiviral vectors : Article : Nature Protocols. In: *Nat. Protocols* Bd. 1 (2006), Nr. 1, S. 241–245

[105] TOWBIN, H ; STAEHELIN, T ; GORDON, J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 76 (1979), Nr. 9, S. 4350–4354

[106] TRACEY JR., W. DANIEL ; WILSON, RACHEL I ; LAURENT, GILLES ; BENZER, SEYMOUR: painless, a Drosophila Gene Essential for Nociception. In: *Cell* Bd. 113 (2003), Nr. 2, S. 261–273

[107] TRUNOVA, SVETLANA ; BAEK, BRIAN ; GINIGER, EDWARD: Cdk5 regulates the size of an AIS-like compartment in Mushroom Body neurons of the Drosophila central brain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* Bd. 31 (2011), Nr. 29, S. 10451–10462

[108] TSIOKAS, LEONIDAS ; KIM, EMILY ; ARNOULD, THIERRY ; SUKHATME, VIKAS P. ; WALZ, GERD: Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Bd. 94 (1997), Nr. 13, S. 6965–6970

[109] *Valproic acid downregulates Cdk5 activity via the transcription of the p35 mRNA - ScienceDirect*. URL https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14007141?via%3Dihub. - abgerufen am 2018-03-18

[110] VENKATACHALAM, KARTIK ; LUO, JUNJIE ; MONTELL, CRAIG: Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. In: NILIUS, B. ; FLOCKERZI, V. (Hrsg.): *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, *Handbook of Experimental Pharmacology* : Springer International Publishing, 2014 — ISBN 978-3-319-05160-4, S. 937–962

[111] VOSSHALL, LESLIE B. ; STOCKER, REINHARD F.: Molecular Architecture of Smell and Taste in Drosophila. In: *Annual Review of Neuroscience* Bd. 30 (2007), Nr. 1, S. 505–533

[112] WARTIOVAARA, JORMA ; OFVERSTEDT, LARS-GORAN ; KHOSHNOODI, JAMSHID ; ZHANG, JINGJING ; MAKELA, EETU ; SANDIN, SARA ; RUOTSALAINEN, VESA ; CHENG,

R. HOLLAND ; U. A.: Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. In: *Journal of Clinical Investigation* Bd. 114 (2004), Nr. 10, S. 1475–1483

[113] WELSH, DONALD G. ; MORIELLI, ANTHONY D. ; NELSON, MARK T. ; BRAYDEN, JOSEPH E.: Transient Receptor Potential Channels Regulate Myogenic Tone of Resistance Arteries. In: *Circulation Research* Bd. 90 (2002), Nr. 3, S. 248–250

[114] WELSH, GAVIN I. ; SALEEM, MOIN A.: The podocyte cytoskeleton|[mdash]|key to a functioning glomerulus in health and disease. In: *Nature Reviews Nephrology* Bd. 8 (2012), Nr. 1, S. 14–21

[115] WINN, MICHELLE P. ; CONLON, PETER J. ; LYNN, KELVIN L. ; FARRINGTON, MERRY KAY ; CREAZZO, TONY ; HAWKINS, APRIL F. ; DASKALAKIS, NIKKI ; KWAN, SHU YING ; U. A.: A Mutation in the TRPC6 Cation Channel Causes Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis. In: *Science* Bd. 308 (2005), Nr. 5729, S. 1801–1804

[116] XU, JIQING ; TSUTSUMI, KOJI ; TOKURAKU, KIYOTAKA ; ESTES, KATHERINE A. ; HISANAGA, SHIN-ICHI ; IKEZU, TSUNEYA: Actin interaction and regulation of cyclin-dependent kinase 5/p35 complex activity. In: *Journal of neurochemistry* Bd. 116 (2011), Nr. 2, S. 192–204

[117] YANG, H.-C. ; MA, L.-J. ; MA, J. ; FOGO, A. B.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist is protective in podocyte injury-associated sclerosis. In: *Kidney International* Bd. 69 (2006), Nr. 10, S. 1756–1764

[118] ZHANG, HUA ; SUN, SUYA ; WU, LILI ; PCHITSKAYA, EKATERINA ; ZAKHAROVA, OLGA ; FON TACER, KLEMENTINA ; BEZPROZVANNY, ILYA: Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. In: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* Bd. 36 (2016), Nr. 47, S. 11837–11850

[119] ZHANG, YUE ; LI, HONGBO ; HAO, JUN ; ZHOU, YI ; LIU, WEI: High glucose increases Cdk5 activity in podocytes via transforming growth factor-β1 signaling pathway. In: *Experimental Cell Research* Bd. 326 (2014), Nr. 2, S. 219–229

[120] ZHENG, YA-LI ; ZHANG, XIA ; FU, HAI-XIA ; GUO, MEI ; SHUKLA, VARSHA ; AMIN, NIRANJANA D. ; E, JING ; BAO, LI ; U. A.: Knockdown of Expression of Cdk5 or p35 (a Cdk5 Activator) Results in Podocyte Apoptosis. In: *PLoS ONE* Bd. 11 (2016), Nr. 8

[121] ZINDER, NORTON D. ; LEDERBERG, JOSHUA: GENETIC EXCHANGE IN SALMONELLA1. In: *Journal of Bacteriology* Bd. 64 (1952), Nr. 5, S. 679–699

9. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Hagmann, Henning; Taniguchi, Yochinori; Pippin, Jeffrey W.; **Kauerz, Hans-Michael**; Benzing, Thomas; Shankland, Stuart J.; Brinkkoetter, Paul Thomas: Cyclin I and p35 determine the subcellular distribution of Cdk5. In: American Journal of Physiology - Cell Physiology Bd. 308 (2015), Nr. 4, S. C339–C347

10. Anhang

10.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Renale Grunderkrankungen bei ständig dialysepflichtigen Patienten 2013 in Deutschland 11
Abbildung 2: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere 12
Abbildung 3: Schematische Darstellung der TRPC6-Kanalstruktur 17
Abbildung 4: Lipid-Raft-Präparationen aus HEK-293T-Zellen. 49
Abbildung 5: Expressionskontrolle CD16.7.myc.Cyclin I in p35/Cyclin I knockout Podozyten. 50
Abbildung 6: Membranassoziiertes Cyclin I rekrutiert Cdk5 in die Plasmamembran. . 51
Abbildung 7: Immunfluoreszenz von p35/Cyclin I – Knock out-Podozyten + CD16.7.myc.Cyclin I 52
Abbildung 8: Immunpräzipitation von Cdk5 mit Schlitzmembranproteinen. 53
Abbildung 9: mRNA-Quantifizierung in HSMP-p35-Knockout-Zelllinien. 55

10.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis 8
Tabelle 2: Chemikalien und Laborbedarf 21
Tabelle 3: Puffer und Lösungen 23
Tabelle 4: Pipettiervolumina für ECL 25
Tabelle 5: Medien zur Kultivierung eukaryoter Zellen 26
Tabelle 6: Selektionsantibiotika 26
Tabelle 7: Enzyme 27
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und Kits 27
Tabelle 9: Primärantikörper 28
Tabelle 10: Sekundärantikörper 29
Tabelle 11: Plasmide und Vektoren 29
Tabelle 12: Übersicht PCR-Primer 30
Tabelle 13: Eukaryote Zelllinien 31
Tabelle 14: Bakterien 32
Tabelle 15: Software und Internetbasierte Programme 32
Tabelle 16: Standard PCR-Thermocycler-Einstellungen 34
Tabelle 17: Standard PCR-Ansatz 34
Tabelle 18: DNA-Restriktionsverdau 35
Tabelle 19: Ligation 36
Tabelle 20: Reaktionsansatz für DNA-Sequenzierung 37
Tabelle 21: Thermocycler-Einstellungen für DNA-Sequenzierung 38
Tabelle 22: Für die IP verwendete Beads 40
Tabelle 23: Transfektionsansatz zur Lentivirus-Herstellung 46

11. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.