

Matias Simons  
Dr.med.

**Zelluläre Mechanismen im Kontext der glomerulären Filtration - Molekulare Charakterisierung der Fortsatzbildung der Podozyten und des Aufbaus der glomerulären Schlitzmembran -**

Geboren am 25.04.1975 in Helsinki/Finnland  
Reifeprüfung am 14.06.1994 in Heidelberg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1995 bis SS 2002  
Physikum am 21.03.1997  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg/New York City  
Staatsexamen am 13.06.2002 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr.med. Peter Mundel

Die vorliegende Arbeit untersucht in einem ersten Teil die Rolle des vesikulären Membrantransportes für die Morphogenese der Podozyten und trägt in einem zweiten Teil zur biochemische Charakterisierung der podozytären Schlitzmembran bei.

Die Ergebnisse des ersten Teils dieser Studien basieren auf einem neuartigen Zellkultursystem, welches die Züchtung differenzierter muriner Podozyten erlaubt. Diese Podozyten teilen entscheidende morphologische wie auch funktionelle Eigenschaften mit Podozyten *in vivo*, insbesondere die Ausbildung der charakteristischen Fortsätze. Unter Zuhilfenahme eines viralen Expressionssystems wurde gezeigt, daß das neu synthetisierte Vesicular Stomatitis Virus-Glykoprotein (VSV-G) durch vesikulären Transport vom Golgi-Apparat aus zunächst in die Fortsätze der Podozyten gelangt, um dann nach Fusion mit der Plasmamembran frei in der gesamten Zelloberfläche zu diffundieren. Für die Fusion ankommender Vesikel wurden wichtige Regulationsmoleküle wie Rab8 und der Sec6/Sec8-Komplex in den Podozytenfortsätzen lokalisiert. Durch Verfolgung des Transports viraler Markermoleküle für apikale und basolaterale Membrandomänen konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei dem gerichteten Membrantransport um einen unpolarierten vesikulären Transport handelt. Die funktionelle Bedeutung dieses gerichteten Transports zeigte sich nach seiner spezifischen Blockade mit Brefeldin A. Während des Zeitraumes der Behandlung mit Brefeldin A verloren die Podozyten auf reversible Art und Weise ihre Fähigkeit, Fortsätze auszubilden. Umgekehrt konnte durch die Überexpression der aktiven Mutante von Rab8 die Ausbildung von Fortsätzen in fortsatzlosen, undifferenzierten Podozyten induziert werden. In videomikroskopischen Studien wurde zunächst dieser Effekt der Überexpression von Rab8 im Zeitverlauf visualisiert. Desweiteren zeigte sich für die differenzierten nicht-transfizierten Podozyten ein überraschend motiles Verhalten. Neben Translokationsbewegungen der gesamten Zellen erwiesen sich auch die Podozytenfortsätze selbst als hochdynamische Strukturen. Binnen weniger als eine Stunde konnte ein Fortsatz aus- und rückgebildet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Podozyten über sehr dynamische Fortsätze verfügen, welche auf einen ständigen gerichteten Membrantransport angewiesen sind. Diese Fortsatzdynamik könnte im Rahmen der Ausbildung sowie der ständigen Aufrechterhaltung der Fußfortsatzarchitektur, aber auch im Rahmen einer Regeneration nach podozytärer Schädigung eine wichtige Rolle spielen.

Im engen funktionellen Zusammenhang mit der Dynamik der Podozytenfußfortsätze stehen die Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung der Schlitzmembran. Mit einer Vielzahl von Methoden wurde die Bedeutung von Rafts für die Organisation der glomerulären Schlitzmembran untersucht. Rafts sind spezialisierte Membranmikrodomänen, welche neben Cholesterin und Glykosphingolipiden auch zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle enthalten. Als Zielmolekül diente das vor kurzem identifizierte Schlitzmembranprotein Nephrin. Mutationen im *Nephrin*-Gen verhindern in CNF-Patienten die Ausbildung von intakten Schlitzmembranen, was eine massive Proteinurie zur Folge hat. An isolierten Rattenglomeruli wurde zunächst das Löslichkeitsverhalten Nephrins gegenüber nicht-ionischen Detergenzien wie TX-100 untersucht. Es zeigte sich dabei, daß nur die oligomerisierte Oberflächenform von Nephrin cholesterinabhängig detergentunlöslich ist und damit mit Rafts assoziiert ist. Durch elektronenmikroskopische Studien an TX-100-behandelten isolierten Glomeruli wurde die Detergenzresistenz der Schlitzmembran direkt visualisiert. Zusätzlich wurde die Raftassoziation von Nephrin durch seine Koimmunopräzipitation mit einem Antikörper gegen ein podozytenspezifisches Gangliosid bestätigt. Die *in vivo*-Injektion dieses Antikörpers führte bei Ratten, wie auch schon zuvor berichtet, zur Auslösung eines „foot process effacement“. Elektronenmikroskopisch konnte nun gezeigt werden, daß es hierbei zur Dislokalisierung von Nephrin an die apikalen Zellanteile der pathologisch verformten Filtrationsschlitze kommt. Desweiteren konnte biochemisch hierbei erstmalig eine Beteiligung von Nephrin an Signaltransduktionsvorgängen über Tyrosinphosphorylierung nachgewiesen werden.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern nicht nur wichtige neue Aspekte in der Charakterisierung des pathologisch relevanten Proteins Nephrin, sondern erlauben auch Aussagen über die molekulare Organisation der glomerulären Schlitzmembran. Demzufolge sind in spezialisierte Raft-Mikrodomänen eingebettete Nephrin-Oligomere für die Integrität der Schlitzmembran von großer Bedeutung. Rafts enthalten Struktur- und Signaltransduktionsmoleküle und könnten der Schlitzmembran dadurch Stabilität und Flexibilität in der Ausübung ihrer Doppelrolle von Zell-Zell-Adhäsion und selektiver Filterung verleihen. Aus dieser Auffassung heraus ergeben sich neue Ansätze für die spezifische Therapie von proteinurischen glomerulären Erkrankungen.