

Daniel Schiwiek

Dr.sc.hum.

Generierung und Charakterisierung von Podozytenzelllinien der Maus mit stabiler Nephrin-Expression

Geb. am 13.09.1971 in Bad Homburg

Diplom der Fachrichtung Chemie am 30.12.1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Zellbiologie

Doktorvater: PD Dr.med. K. Endlich

Es sind die Podozyten, die mit ihren interdigitierenden Fußfortsätzen und der dazwischen gelegenen Schlitzmembran die Schlüsselfunktion der glomerulären Filtrationsbarriere einnehmen. Einerseits sorgt die Interdigitation der Fußfortsätze für einen langen Filtrationsschlitz, andererseits hält die Schlitzmembran, ein Zell-Zell-Kontakt, Proteine zurück. Die Inaktivierung einiger Schlitzmembranproteine führt zu Glomerulopathien, die durch ein Verschmelzen der filigranen Podozytenfußfortsätze und Proteinurie gekennzeichnet sind. Die Aufklärung der molekularen Zusammensetzung der Schlitzmembran und der Funktionen der beteiligten Proteine wird dazu beitragen, die Funktionsweise der glomerulären Filtrationsbarriere und ihre Erkrankungen besser zu verstehen. Hierzu sind Zellmodelle unabdingbar. Zur Zeit gibt es jedoch keine Podozytenzelllinie, die eine stabile Expression des wichtigsten Schlitzmembranproteins, Nephrin, und dessen Lokalisation im Zell-Zell-Kontakt zeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher neue konditional immortalisierte Podozytenzelllinien aus den Glomeruli der Immortomaus™ generiert. Die Bestätigung für den podozytären Ursprung von insgesamt 30 generierten klonalen Zelllinien war der Nachweis der Podozytenmarker WT-1, Podocalyxin und Vimentin.

Es gelang mittels RT-PCR zwei Klone zu identifizieren, die Nephrin exprimieren. Für diese Klone konnte mit Hilfe der RT-PCR auch gezeigt werden, dass eine stabile Expression von Nephrin über viele Zellpassagen (>35) hinweg gegeben war. Zudem wurde dieses Schlitzmembranprotein und seine stabile Expression mittels Western-Blotting nachgewiesen.

Da es keine kommerziell verfügbaren Antikörper gegen Nephrin gibt, die für Immunfluoreszenzanalysen geeignet sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei neue Nephrin-Antikörper hergestellt und charakterisiert. Mit ihrer Hilfe war es möglich, Nephrin mittels Immunfluoreszenz in den generierten Podozytenzelllinien nachzuweisen und subzellulär an Zell-Zell-Kontakten zu lokalisieren.

Es wurde gezeigt, dass die das thermosensitive SV40 T-Antigen tragenden Zellen unter permissiven Bedingungen proliferierten und dabei eine einschichtige Zellschicht ausbildeten. Nach zwei bis drei Wochen unter nicht-permissiven Bedingungen (38°C) verloren die Zellen den proliferativen Phänotyp und zeigten eine vollständige Differenzierung. Durch die kontrollierte Proliferation bzw. Differenzierung der Zellen war ein kontinuierliches Arbeiten mit den Zellkulturen möglich.

Es wurde die Expression aller anderen, bisher bekannten Proteine, die Bestandteil der Schlitzmembran sind oder mit ihr assoziiert vorliegen, nachgewiesen. Dies sind neben Nephrin: NEPH1, FAT, P-Cadherin, Podocin, ZO-1(α -Isoform) und CD2AP. Zudem wurde gezeigt, dass weitere podozytenspezifische Proteine wie Podoplanin, Lmx1b, Cortactin und Synaptopodin in den Zellen exprimiert werden.

Neben der Existenz der Schlitzmembranproteine weisen die Zelllinien weitere Charakteristika von Zell-Zell-Kontakten, wie sie in Podozyten *in situ* vorkommen, auf. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die Fortsätze der Zellen *in vitro* unter Ausbildung eines gleichmäßigen Abstandes primitive Interdigitationen aufwiesen. In den Zwischenräumen fand sich elektronendichtes Material, in dem mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie stellenweise das Schlitzmembranprotein Nephrin lokalisiert werden konnte. Die elektronenmikroskopische Befunde zusammengenommen belegen, dass in den generierten Podozytenzelllinien eine rudimentäre Ausbildung von *in situ* Zell-Zell-Kontakten vorliegt.

Die Aktin-assoziierten Proteine CD2AP, Cortactin und Synaptopodin sind *in situ* in den Fußfortsätzen von Podozyten stark angereichert. In den in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien wurde gezeigt, dass diese Proteine mit F-Aktin kolokalisiert vorlagen. Zudem wurde beobachtet, dass CD2AP, Cortactin und Synaptopodin im Bereich der Zell-Zell-Kontakte stark akkumuliert wurden. Dies hing deutlich vom Ausmaß der Kontaktbildung ab. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die Formierung der Zell-Zell-Kontakte und die Anreicherung von Aktin-assoziierten Proteinen in den Fußfortsätzen miteinander verbundene Vorgänge sind.

Für Nephrin wurde neben einer Kolokalisation mit F-Aktin eine kontaktabhängige Relokalisation beobachtet. Während in räumlich isolierten Zellen Nephrin überwiegend zytoplasmatisch vorgefunden wurde, zeigten Zellen mit zunehmender Kontaktbildung zu benachbarten Zellen eine Lokalisation nahezu ausschließlich entlang der Zell-Zell-Kontakte.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Podozytenzelllinien zeigen erstmals eine stabile Nephrinexpression und eine Lokalisation von Nephrin in Zell-Zell-Kontakten *in vitro*. Die Akkumulation Aktin-assoziiierter Proteine im Bereich der Zell-Zell-Kontakte und die rudimentäre Ausbildung interdigitierender Fußfortsätze tragen zusätzlich zur *in vitro* Wiedergabe der molekularen Anatomie der Podozyten bei. Daher werden die Zelllinien von großem Nutzen sein, die molekulare Zusammensetzung und die Ausbildung der Schlitzmembran in Podozyten *in vitro* zu untersuchen, um so die Filtrationsbarriere und glomeruläre Erkrankungen besser verstehen zu können.