

Thilo Welsch
Dr. med.

Zur Rolle des CD2-assoziierten Proteins in Podozyten

Geboren am 13.04.1977 in Hamburg
Reifeprüfung am 26.06.1996 in Überlingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1998 bis WS 2003/04
Physikum am 22.03.2000 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Baltimore, USA und Heidelberg
Staatsexamen am 02.04.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Dipl.-Phys. Karlhans Endlich

Die Podozyten bilden mit ihren Aktin-reichen, interdigitierenden Fußfortsätzen und der Ausbildung der in ihrer Zusammensetzung noch nicht geklärten Schlitzmembran die entscheidende Einheit der glomerulären Filtrationsbarriere. Mäuse, die keine Expression des 80 kDa-Proteins CD2AP aufweisen, entwickeln auf noch ungeklärte Weise eine progrediente und in nur sechs Wochen post partum letal endende Niereninsuffizienz mit Proteinurie. Histopathomorphologisch lässt sich ein Verlust der Podozyten-Fußfortsätze sowie eine Glomerulosklerose nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde immunhistochemisch gezeigt, dass CD2AP *in situ* sowohl in den Perikaryen als auch in Fußfortsätzen von Podozyten lokalisiert ist. Durch die elektronenmikroskopische Beschreibung von CD2AP im Zytoplasma von Fußfortsätzen und auch in der unmittelbaren Nähe der Schlitzmembran wurde erstmals der Nachweis für eine mögliche örtliche Assoziation mit Komponenten der Schlitzmembran erbracht.

In weiteren Untersuchungen an einer Podozyten-Zelllinie wurde CD2AP mittels RT-PCR, Western-Blot und Immunfluoreszenz nachgewiesen sowie auf subzellulärer Ebene lokalisiert. Dabei fand sich eine strenge Kolokalisation von CD2AP mit punktförmigen F-Aktin-Strukturen, die keine örtliche Beziehung zu Fokalkontakten oder Aktin-Stressfasern aufwiesen. Vielmehr akkumulierte CD2AP gemeinsam mit F-Aktin in diesen charakteristischen Spots mit einem Durchmesser von 1 µm. Diese Spots konnten ebenfalls mit dem Arp2/3-Komplex, ein Proteinkomplex, der sowohl Aktin-Nukleation und -Netzwerkbildung katalysiert sowie mit seinem aktivierenden Bindungspartner Cortactin kolokalisiert werden. Darüber hinaus fand sich eine direkte Kolokalisation von CD2AP und Cortactin in Spots.

Die Mikroinjektion von G-Aktin-Molekülen führte schon 1 min nach Injektion zu einer Rekrutierung von Aktin-Molekülen zu Lamellipodien und CD2AP-Spots und demonstrierte funktionell einen aktiven Aktin-Umsatz in diesen Strukturen.

Das Signalprotein p130Cas, welches als mögliches Bindungsmolekül von CD2AP identifiziert wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit zwar ebenfalls sowohl in Podozyten *in situ* als auch in kultivierten Podozyten nachgewiesen werden, doch ergab die subzelluläre Immunfluoreszenzanalyse eine divergente Verteilung im Vergleich zu CD2AP. p130Cas war vorrangig an Fokalkontakten konzentriert und zeigte keine Assoziation mit CD2AP, was eine bedeutende Interaktion der beiden Proteine in Podozyten unwahrscheinlich macht.

Zudem wurde jedoch eine enge Assoziation von CD2AP-Spots mit α -Actinin-4 konstatiert, das wahrscheinlich physiologisch die Aktin-Filamente in Podozyten vernetzt und durch die

Entwicklung einer schweren fokal segmentalen Glomerulosklerose infolge Mutation besondere Bedeutung erlangt.

Zusätzlich wurde CD2AP sowie der Arp2/3-Komplex, Cortactin, Vinculin und Actinin-1 in neuen, motilen Aktin-Ringstrukturen (ARS) beschrieben, die spezifisch durch EGF induziert werden konnten und im folgenden als Modell für die Charakterisierung der Interaktion von CD2AP mit Aktin-Strukturen dienten. Aufgrund der durch 3D-Darstellung nachgewiesenen apikalen Orientierung im Zytosol der Podozyten und wegen der charakteristischen Assoziation mit bestimmten Proteinen, insbesondere mit SWAP-70, wurden die ARS von Membrankrausen (engl. „ruffles“) und Podosomen abgegrenzt. Die dynamische Expansion dieser ARS betrug durchschnittlich 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (n=6 Exp.) und basierte auf einer ungestörten Polymerisation von F-Aktin, wie durch Hemmung der Ausdehnungsdynamik durch das Aktin-stabilisierende Jasplakinolide gezeigt wurde. Die Bildung von ARS konnte außer mit EGF-Rezeptor-Blockern auch durch Inhibitoren der PI3-Kinase unterdrückt werden. Eine Dislozierung des Arp2/3-Komplexes durch Mikroinjektion einer C-terminalen WASP-Domäne resultierte in einer 6-fachen Reduktion des Auftretens von ARS, wohingegen die Antikörperbindung an CD2AP - nach Mikroinjektion eines gegen die C-terminale Hälfte von CD2AP gerichteten Immunglobulins - zu einer signifikant gesteigerten Bildung von ARS führte. Demnach könnte CD2AP in Podozyten eine Drosselung der Signalkette, die schließlich in der Reorganisation von Aktin-Strukturen durch Aktivierung des Arp2/3-Komplexes endet, bewirken.

Aufgrund der beschriebenen Lokalisation von CD2AP im Glomerulus *in situ*, der Assoziation mit dynamischen Aktin-Spots und Nukleationsproteinen sowie der funktionellen Charakterisierung von CD2AP als ein Protein, das in negative Regulationsmechanismen dynamischer Strukturen des Aktin-Zytoskeletts in Podozyten eingebunden ist, wurden so neue Ansätze für die Erklärung der glomerulosklerotischen Veränderungen bei CD2AP-defizienten Mäusen aufgezeigt. Das Aktin-Filamentwerk besitzt eine wesentliche Bedeutung sowohl für die Motilität der Fußfortsätze, als auch für die Stabilität der Schlitzmembran. Ein ungeordneter Aktin-Umsatz mit Reorganisation des Zytoskeletts könnte diese pathomorphologischen Veränderungen bedingen.