

Gökmen Gökce
Dr. med.

Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts von Podozyten mit Hilfe des Grün Fluoreszierenden Proteins

Geboren am 26.11.1977 in Heidelberg
Staatsexamen am 10.05.2005 an der Universität Heidelberg

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

Veränderungen in der Expression von Aktin-assoziierten Proteinen wie CD2AP (CD2-assoziiertes Protein) und α -Aktinin-4, die beide in den Podozyten exprimiert werden, führen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus zur Entwicklung einer fokal segmentalen Glomerulosklerose. Darüber hinaus bewirken verschiedene Störungen in der glomerulären Schlitzmembran, wie zum Beispiel die Mutationen der Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin, chronische Nierenerkrankungen. Die enge Verbindung sowohl der Aktin-assoziierten Proteine als auch der glomerulären Schlitzmembran zum Aktin-Zytoskelett der Podozyten, welches eine wesentliche Bedeutung für die Morphologie der Fußfortsätze sowie für die Stabilität der Schlitzmembran besitzt, legt nahe, dass das Aktin-Zytoskelett eine gemeinsame Leitstruktur in der Pathogenese der chronischen Nierenerkrankungen sein könnte. Da deshalb das podozytäre Aktin-Zytoskelett im Mittelpunkt des Interesses steht, stellt die vorliegende Arbeit eine Methodik vor, die sich die Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts und seiner Dynamik in lebenden Podozyten zum Ziel gesetzt hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch Lipofektion ein Expressionsvektor, der für ein Fusionsprotein von Aktin mit dem Grünen Fluoreszenz-Protein (GFP) kodiert, in kultivierte Podozyten eingeschleust. Durch den Einbau der GFP-Aktin-Monomere in filamentöse Strukturen des Aktin-Netzwerkes konnte das Aktin-Zytoskelett sowohl an fixierten als auch an lebenden, transient transfizierten Podozyten direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Durch gleichzeitige Darstellung des F-Aktins mit rot fluoreszierendem Phalloidin konnte an fixierten Podozyten durch Intensitätsmessungen mit konfokaler Mikroskopie gezeigt werden, dass GFP-Aktin in die verschiedenen F-Aktin-Strukturen in einem konstanten Verhältnis zu endogenem (nicht GFP-gekoppeltem) Aktin eingebaut wird. Bei den dabei untersuchten F-Aktin-Strukturen handelte es sich um Stressfasern, Lamellipodien, Aktin-Spots (kleine ca. 0,5 μm große, punktförmige F-Aktin-Strukturen) und RiLiS (Ring-like Actin Structures), die aus einem ringförmigen Cluster von Aktin-Spots bestehen. Weiterhin wurde durch Immunfluoreszenz nachgewiesen, dass die Aktin-assoziierten Proteine Vinculin, Cortactin und CD2AP mit den GFP-Aktin markierten F-Aktin-Strukturen in gleicher Weise wie mit den F-Aktin Strukturen nicht transfizierter Zellen kolokalisiert sind. An lebenden Podozyten, die GFP-Aktin exprimierten, konnte mittels Zeitraffer-Fluoreszenzmikroskopie die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts untersucht werden. Es zeigte sich, dass Stressfasern und Fokaladhäsionen äußerst statische F-Aktin-Strukturen sind, die sich über einen Zeitraum von mehreren Minuten nur wenig verändern. Aktin-Spots hingegen zeigten eine deutliche Motilität im Minutenbereich. Erstmals konnte die Aktin-Dynamik der RiLiS, die auf einer Zeitskala von Sekunden erfolgte, beobachtet werden. Schließlich wurde der Einfluss der Stärke der GFP-Expression auf die Aktin-Dynamik ermittelt. In Podozyten mit einer hohen Expression von GFP-Aktin, die anhand der Fluoreszenzintensität gemessen wurde, war der Wiederaufbau des Aktin-Zytoskeletts nach

Depolymerisation mit Cytochalasin D deutlich verlangsamt. Podozyten mit einer niedrigen GFP-Aktin-Expression zeigten im Vergleich zu nicht transfizierten Podozyten keine messbare Verzögerung im Aufbau des Aktin-Zytoskeletts.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine ausreichend niedrige Expression von GFP-Aktin weder zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts noch zur Beeinträchtigung der Aktin-Dynamik führt. Damit gestattet diese Methode eine Untersuchung der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts an lebenden Podozyten. Die vorliegende Arbeit legt somit die methodische Grundlage für die weitere Erforschung dynamischer Aspekte des Aktin-Zytoskeletts in Podozyten, welches für die Pathogenese glomerulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt.