

Jochen Reiser
Dr. med.

Pathobiologie der Podozyten

-Molekulare Analyse der glomerulären Schlitzmembran und Fortsatzdynamik von Podozyten-

Geboren am 23.06.1971 in Pforzheim

Reifeprüfung am 16.05.1990 in Königsbach

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 1998

Physikum am 28.03.1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg, New York

Staatsexamen am 19.11.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. P. Mundel

Die vorliegende Arbeit beschreibt die molekulare Analyse der podozytären Schlitzmembran sowie die Regulation der Fortsatzdynamik von Podozyten unter normalen und pathologischen Bedingungen. Die Ergebnisse dieser Studien basieren auf einem neuartigen Zellkulturmodell zur Differenzierung von kultivierten Podozyten. Diese Podozyten teilen zahlreiche morphologische wie auch funktionelle Eigenschaften mit Podozyten in vivo. Differenzierte, kultivierte Podozyten formen Interzellularkontakte, die in ihren morphologischen und molekularen Charakteristika der Schlitzmembran im Glomerulus nahe kommen.

Die Schlitzmembran ist für die Funktion der Podozyten von entscheidender Wichtigkeit; sie regelt u.a. die Größenselektivität und die Hydraulik der glomerulären Filtration. 40 Jahre nach der morphologischen Erstbeschreibung wird in der vorliegenden Arbeit die molekulare Komposition dieser Struktur und ihre Klassifikation als Zonula adhaerens aufgeklärt. Durch die Analyse der Markerproteine von Zell-Zell-Verbindungen an kultivierten Podozyten, konnte die molekulare Zusammensetzung der Fortsatzinterdigitationen von Podozyten beschrieben werden. Der entscheidende Befund ist die Detektion von P-Cadherin als transmembranäres Protein einer modifizierten ZA in kultivierten Podozyten. In diesem spezialisierten Zell-Zellkontakt bindet P-Cadherin an beta- bzw. gamma- Catenin. Diese wiederum binden über alpha- Catenin und ZO-1 an das Aktin- Zytoskelett. Auch in intakten Glomeruli finden sich diese Proteine. Die ultrastrukturelle Analyse von intakten Rattenglomeruli zeigte, daß nach Immunogoldmarkierung P-Cadherin auch in vivo mit der Schlitzmembran assoziiert ist. Demnach handelt es sich bei der glomerulären Schlitzmembran um eine modifizierte ZA. Modifiziert ist diese ZA, da die Lokalisation von Vinculin nicht wie in klassischen ZA als Teil des Cadherin /Catenin Komplexes, sondern direkt daneben in fokalen Kontakten liegt. Mit diesem neu gewonnenen Wissen über die molekulare Zusammensetzung der Schlitzmembran und ihrer Klassifikation als modifizierte ZA wird der Weg zu einem besseren funktionellen Verständnis dieser Struktur und ihrer Relevanz bei der Entstehung glomerulärer Erkrankungen geebnet. Es bieten sich nun neue experimentelle Ansätze der Identifikation Schlitzmembran assoziierter Proteine durch Co- Immunpräzipitation mit P- Cadherin.

Im engen funktionellen Zusammenhang mit der molekularen Charakterisierung der Schlitzmembran stehen die Untersuchungen zu der Dynamik der Podozytenfußfortsätze. Die Fusion und die Retraktion der podozytären Fußfortsätze sind typische pathomorphologische Frühveränderungen bei der Ausbildung einer Proteinurie. Die Mechanismen, die zu diesen morphologischen Veränderungen führen, sind nur ansatzweise verstanden. Ein differenziertes

Zellkultursystem für Podozyten erlaubt es, Steuermechanismen zu untersuchen, da Podozyten in vitro Fortsätze wie in vivo zeigen. Dazu wurde durch Gabe von Protaminsulfat und Puromycin die Fortsatzretraktion und das Ablösen der Zellen von der Matrix induziert. Diese Vorgänge gehen mit einer Reduktion der Expression von Vinculin, einer Reduktion der Tyrosinphosphorylierung in den Fortsätzen und einer reduzierten Aktivität der Tyrosinphosphatasen einher. Während das Polykation Protaminsulfat durch Ladungsausgleich an der Membranoberfläche kultivierter Podozyten eine akute Blockade von Tyrosinphosphatasen bewirkt, findet man nach Puromycin Gabe einen prolongierten Effekt mit der Bildung von freien Radikalen. Letztendlich bewirken aber beide Substanzen eine gesteigerte Tyrosinphosphorylierung podozytärer Proteine, die eine Retraktion der Fortsätze auslöst.

Die Applikation von Vitamin E hat bis zu einem gewissen Grad einen stabilisierenden Effekt auf die Fortsätze und das Adhäsionsverhalten kultivierter Podozyten, kann aber das komplette Ablösen der Podozyten nicht inhibieren. Aufgrund der vorliegenden Arbeit sollte die Entwicklung neuer Substanzen möglich sein, die eine Tyrosinphosphorylierung podozytärer Proteine wiederherstellen und damit eine funktionsfähige Fortsatzarchitektur gewährleisten.