

Andrzej KUSZKA

Dr. med.

**„Identifikation von Interaktionspartnern des Protocadherins FAT1 mit Hilfe  
der Yeast-two-hybrid Methode“**

Geboren am 20.07.1974 in PISZ (Polen)

Staatsexamen am 05.06.2001 an der Universität: Medizinische Akademie, Bialystok (Polen)

Promotionsfach: Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. Wilhelm Kriz

Mitbetreuung: Dr. Marcus Moeller

Die Schlitzmembran ist eine extrazelluläre Proteinmembran, die von den Podozyten gebildet wird und die Filtrationsschlitze überbrückt. Sie ist das morphologische Korrelat der Proteinbarriere des glomerulären Filters. Bei fast allen glomerulären Erkrankungen ist die Schlitzmembran betroffen. Meist ist dies verbunden mit einem Verlust der Fußfortsatzarchitektur (*foot process effacement*), der auf dramatischen Umbauten des Zytoskeletts der Podozyten beruht.

Von der Arbeitsgruppe Moeller wurde gezeigt, dass FAT1 nicht nur ein Strukturprotein der Schlitzmembran ist, sondern auch als Signalmolekül das Zytoskelett der Podozyten beeinflusst. So reguliert FAT1 über Ena/VASP die gerichtete Aktinpolymerisation, die die treibende Kraft für Ausbildung der Fussfortsätze der Podozyten liefert. Weiterhin reguliert FAT1 über einen noch unbekanntem Mechanismus die Ausrichtung von Zellen in der horizontalen Ebene („planare Polarisierung“). Um die molekularen Vorgänge, die den Auf- bzw. Umbau des glomerulären Ultrafilters steuern, besser zu verstehen, sollten in dieser Arbeit weitere mit der zytoplasmatischen Domäne von FAT1 interagierende Proteine identifiziert werden.

Der zytoplasmatische Anteil von FAT1 enthält multiple Motive, die Proteinbindungsmotiven sehr ähnlich sind. Zunächst wurden verschiedene Fragmente der zytoplasmatischen Domäne von FAT1 mit der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert, in

Hefezellen transformiert und auf eine Autoaktivierung der Reportergene getestet. Schliesslich konnte ein aussichtsreiches Fragment identifiziert werden, das drei potentielle Bindungsmotive und ein Prolin-reiches Motiv enthielt und keine unerwünschte Autoaktivierung zeigte. Mit diesem „Bait“ (Köderprotein) wurde eine murine embryonale cDNA-Gehirn-Expressionsbibliothek auf interagierende Protein-fragmente durchsucht. Aus insgesamt 4 Millionen Klonen wurden 99 positive Klone identifiziert, die potentiell eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von FAT1 eingingen. Diese Interaktion in Hefezellen konnte auch mit alternativen Reporterassays bestätigt werden. Alle interagierenden Klone wurden anschließend durch Sequenzierung und/oder Polymerasekettenreaktion analysiert. Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Klone (61 %) einem Interaktor entsprach.

Der Interaktor ist - ebenso wie FAT1 - an Zell-Zellkontakten lokalisiert. Durch Deletions- und Punktmutationen konnte die Interaktion auf PXXP#1, eines der Bindungsmotive innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von FAT1 kartiert werden; dies konnte mittels eines *Pull-down* Assays bestätigt werden. Dieses Ergebnis führt zur Hypothese, dass über das Protein weitere Proteine einer Adherens-Junction, darunter E-Cadherin, an FAT1 rekrutiert werden. Diese Interaktionen könnten unter anderem bei Umbauten der Schlitzmembran in der Adherens-Junction von Bedeutung sein, die bei glomerulären Erkrankungen mit Proteinurie auftreten.