

Aus dem Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK)
und der Klinik II für Innere Medizin der Universität zu Köln
Nephrologie, Rheumatologie, Diabetologie und Allgemeine Innere Medizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Benzing

**Identifikation neuer Targets,
die an der aPKC-vermittelten Signalübertragung
der Nierenfiltrationsbarriere beteiligt sind**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Anja-Maria Mürmann
aus Frechen

promoviert am 14.02.2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Gereon Rudolf Fink

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter
2. Gutachterin: Prof. Dr. Carien Niessen

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter
Dr. Sybille Köhler
Dr. Martin Höhne

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter und Dr. Sybille Köhler von mir ausgeführt worden. Die bioinformatische Auswertung der phosphoproteomischen Analyse (Abb. 9, 10, 13) wurde im Wesentlichen durch Dr. Martin Höhne mit MaxQuant und Perseus vorgenommen.

Bei der finalen Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse wurde ich teilweise von den medizinisch-technischen Assistentinnen Ruth Herzog und Angelika Köser unterstützt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 14.02.2023

Unterschrift: 

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen ausdrücklichen Dank den nachfolgend genannten Personen und Förderungen aussprechen, ohne die die Anfertigung dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Benzing und Prof. Dr. med. Bernhard Schermer für die Möglichkeit, meine experimentelle Doktorarbeit im Nierenforschungszentrum und Zentrum für Molekulare Medizin Köln durchzuführen und die vielseitigen Bereiche der Wissenschaft kennenlernen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Paul Brinkkötter für seine erstklassige Betreuung, bedingungslosen Rückhalt und sein komplexes Fachwissen, mit dessen Hilfe er durch viele Gespräche maßgeblich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen hat.

Dr. Sybille Köhler für ihre hervorragende Betreuung, ihren Zuspruch und Rückhalt während aller Höhen und Tiefen sowie ihren großartigen wissenschaftlichen Input, der mich immer wieder neu inspiriert und motiviert hat.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Martin Höhne für seine unverzichtbare Unterstützung und gewissenhafte Ausarbeitung der phosphoproteomischen Analyse. Dr. Frederik Tellkamp für sein beeindruckendes Wissen im Bereich der Proteomik und seine wertvolle Hilfe bei der Ausarbeitung der Ergebnisse.

Johanna Odenthal, Vivian Ludwig, Angelika Köser, Ruth Herzog und der gesamten AG Brinkkötter für die schöne gemeinsame Zeit und die bedeutsame Zusammenarbeit, die ich immer in guter Erinnerung behalten werde.

Der Stiftung Begabtenförderung berufliche Bildung für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums. Dem Bayer Graduiertenprogramm für Pharmakologie und experimentelle Therapeutik an der Universität Köln für die finanzielle und wissenschaftliche Förderung.

Von Herzen möchte ich meinem Ehemann Max Mürmann, meinen Eltern, meinen Brüdern Matthias und Thomas und meiner Großmutter Gertrud Dommers danken, für die bedingungslose Unterstützung und Ermutigung zu jeder Zeit.

Meinem Ehemann

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	12
2. EINLEITUNG	13
2.1 Einleitende Zusammenfassung.....	13
2.2 Stand der Forschung	14
2.2.1 Glomeruläre Entwicklung	15
2.2.2 Podozyten und der Schlitzmembrankomplex.....	18
2.2.3 Zellpolarität	20
2.2.3.1 Epitheliale Zellpolarität	20
2.2.3.2 Der aPKC-Par-Polaritätskomplex.....	22
2.2.3.3 Zellpolaritätssignalwege in Podozyten	24
2.3 Zielsetzung dieser Arbeit	25
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien und Laborbedarf.....	27
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	29
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	31
3.1.4 Kits/Assays	32
3.1.5 Plasmide	33
3.1.6 Bakterien	33
3.1.7 Eukaryote Zellen	33
3.1.8 Primer	34
3.1.9 Antikörper.....	34
3.1.10 Geräte	35
3.1.11 Software.....	37
3.2 Methoden	37
3.2.1 Zellkultur.....	37
3.2.1.1 Immortalisierte Zelllinien	37
3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	38
3.2.2 Proteinbiochemie.....	38
3.2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmungen	38

3.2.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.2.2.3	Western Blot.....	40
3.2.3	Immunpräzipitation.....	41
3.2.4	Chemische Inhibitoren gegen aPKC ^{iota}	41
3.2.5	PKC Kinase Activity Assay Kit.....	42
3.2.6	Gentechnische Methoden	42
3.2.6.1	Transformation	42
3.2.6.2	Plasmidpräparation	43
3.2.6.3	Sequenzierung	43
3.2.7	Herstellung stabiler Zelllinien mit viralem Gentransfer.....	43
3.2.7.1	Virusproduktion	44
3.2.7.2	Generierung einer induzierbaren aPKC ^{iota} - <i>knockdown</i> Podozytenzelllinie.....	44
3.2.7.3	Doxycyclin-Inkubation	45
3.2.8	Generierung eines aPKC ^{iota} - <i>knockdown</i> in Sammelrohrzellen mittels siRNA	45
3.2.9	Quantifizierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene.....	46
3.2.9.1	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	46
3.2.9.2	Quantitative PCR	46
3.2.10	Massenspektrometrie (MS).....	47
3.2.10.1	Zellernte für MS.....	47
3.2.10.2	Herstellung von Zelllysaten für MS.....	47
3.2.10.3	Phosphopeptide Enrichment für MS	48
3.2.10.4	Phosphoproteomanalysen	48
4.	ERGEBNISSE	50
4.1	Keine Inhibition von aPKC ^{iota} durch chemische Inhibitoren ATG, ATM und PS432 in Podozytenzelllinie	50
4.2	Herstellung und Validierung einer stabilen Podozytenzelllinie mit induzierbarem aPKC ^{iota} - <i>knockdown</i>	53
4.3	Identifikation neuer aPKC ^{iota} -Targets in Podozytenzelllinie mittels massenspektrometrischer Analyse.....	54
4.4	Generierung eines aPKC ^{iota} - <i>knockdown</i> in Sammelrohrzellen mittels siRNA	62
4.5	Keine signifikanten aPKC ^{iota} -Targets durch massenspektrometrische Analyse in Sammelrohrzellen mit analogen Testgütekriterien	64
5.	DISKUSSION.....	70
5.1	Potenzielle Targets von aPKC ^{iota} in Podozytenzelllinie.....	70

5.2	Mögliche Kompensationsmechanismen in der Abwesenheit von aPKC ^{iota} in Podozytenzelllinie	72
5.3	aPKC ^{iota} - <i>knockdown</i> in Sammelrohrzellen mittels siRNA möglicherweise nicht suffizient genug	73
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	74
7.	ANHANG	85
7.1	Abbildungsverzeichnis	85
7.2	Tabellenverzeichnis	86

Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACTB:	Aktin, zytoplasmatisch 1
Add3:	Gamma-adducin
aPKC ^{iota} :	atypische Proteinkinase C iota
APS:	Ammoniumperoxodisulfat
Arhgef17:	Rho guanine nucleotide exchange factor 17
Arvcf:	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog
ATG:	Aurothioglukose
ATM:	Aurothiomalat
BSA:	Bovines Serum Albumin
CD2AP:	CD2-assoziiertes Protein
Cdc42:	Cell division control protein 42
Cdc42ep4:	Cdc42 effector protein 4
Cdc42bpg:	Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma
cDNA:	complementary Desoxyribo-Nucleic-Acid
cPKC:	klassische Proteinkinase C
CRIB:	Cdc42/Rac-interactive binding
ddH ₂ O:	bidestilliertes Wasser
Dlg:	Discs large
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribo-Nucleic-Acid
DTT:	Dithiothreitol

ECL:	Enhanced Chemiluminescence
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
FA:	Ameisensäure
FBS:	fetales Kälberserum
FDR:	Falscherkennungsrate
FSGS:	fokal-segmentale Glomerulosklerose
GO:	Gene Ontology
GSK3 β :	Glykogensynthasekinase 3 beta
HEK:	Human Embryonic Kidney
HPRT:	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSMP:	Heat-Sensitive Mouse Podocytes
IAA:	Iodacetamid
mIMCD:	Mouse Inner Medullary Collecting Duct Cells
INT:	Interferon
JAM-1:	Junctional Adhesion Molecule
kDa:	Kilodalton
KO:	<i>knockout</i>
LB:	Luria-Bertani
LGL1:	Lethal giant larvae 1
LGL2:	Lethal giant larvae 2
Lima1:	LIM domain and actin-binding protein 1
Magi1:	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1
Micall2:	MICAL-like protein 2
Mink1:	Misshapen-like kinase 1

Mprip:	Myosin phosphatase Rho-interacting protein
MS:	Massenspektrometrie
Myh9:	Myosin-9
Mylk:	Myosin light chain kinase, smooth muscle
NaCl:	Natriumchlorid
Ndrg1:	Protein NDRG1
nPKC:	neue Proteinkinase C
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pals1:	Protein associated with Lin-7 1
Par3A:	Partitioning defective 3 A
Par3B:	Partitioning defective 3 B
Par6:	Partitioning defective 6
Patj:	Pals1-associated tight junction protein
PBS:	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
Pdim2:	PDZ and LIM domain protein 2
PIM:	complete protease inhibitor
Pkp4:	Plakophilin-4
PPI:	protease phosphatase inhibitor
PS432:	2-[5-(4-chlorophenyl)-2-furanyl]-2,5-dihydro-4-hydroxy-1-(6-methyl-2-benzothiazolyl)-5-oxo-1H-pyrrole-3-carboxylic acid ethyl ester
PVDF:	Polyvinylidenfluorid
qPCR:	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RISC:	RNA-induced silencing complex
Rock1:	Rho-associated protein kinase 1

RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
RT:	Reverse Transkriptase
SDS:	Natriumdodecylsulfat
Synpo:	Synaptopodin
shRNA:	small hairpin Ribonucleic Acid
siRNA:	small interfering Ribonucleic Acid
SOC:	Super Optimal broth with Catabolite repression
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
Tln1:	Talin-1
V:	Volt
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO-1:	Zonula occludens protein 1
ZO-2:	Zonula occludens protein 2

1. Zusammenfassung

Glomeruläre Schädigung ist mit Veränderungen des strukturegebenden Aktinzytoskeletts verbunden. Der aPKC-Par-Komplex konnte als essenzieller Akteur zum Aufbau und Erhalt der komplexen Podozytenarchitektur identifiziert werden. Während der podozytenspezifische Verlust von aPKC^{iota} in einer schweren Schädigung des Nierenfilters resultiert, bleibt der podozytenspezifische *knockout* von Par3A phänotypisch unauffällig. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, neue aPKC^{iota}-Targets zu identifizieren, um ein tieferes Verständnis für die Polaritätswege von aPKC^{iota} in Podozyten zu erlangen. Zur Identifikation neuer Targets testeten wir dazu die Inhibitoren ATG, ATM und PS432 von aPKC^{iota} *in vitro*. Die effiziente Inhibition von aPKC^{iota} durch die chemischen Inhibitoren konnte in der Podozytenzelllinie nicht reproduziert werden.

In einem zweiten Ansatz wurden parallel aPKC^{iota}-*knockdown* Experimente in einer Podozytenzelllinie sowie in Sammelrohrzellen der Niere durchgeführt, um die Targets von aPKC^{iota} zwischen Podozyten und klassischen Epithelien zu vergleichen. Die Phosphoproteomanalyse des aPKC^{iota}-induzierbaren *knockdown* in der Podozytenzelllinie ergab zahlreiche potenzielle Targets von aPKC^{iota}. Einige der interessanten Proteine sind mit dem Aktinzytoskelett assoziiert und unterstreichen die funktionelle Bedeutung von aPKC^{iota} an der Ausbildung der Podozytenarchitektur. Die Phosphoproteomanalyse der Sammelrohrzellen ergab bei analogen Testgütekriterien keine signifikanten Targets von aPKC^{iota}, sodass auf einen Vergleich zwischen Podozyten und klassischen Epithelien verzichtet wurde.

Kürzlich publizierte Forschungsergebnisse belegen, dass aPKC^{iota} in Podozyten im Gegensatz zu klassischen Epithelien unabhängig von Par3A/B organisiert ist. Dies ist im Einklang mit der aktuellen Studienlage, die auf eine einzigartige Polaritätsmaschinerie in Podozyten hindeutet. Die identifizierten aPKC^{iota}-Targets sowie zukünftige *in-vivo*-Experimente werden zu einem tieferen Verständnis der Polaritätswege in Podozyten beitragen und eventuell zur Etablierung neuer, spezifischer Therapieansätze während glomerulärer Schädigung führen.

2. Einleitung

2.1 Einleitende Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen stellen ein wachsendes, globales Gesundheitsproblem dar. In einkommensstarken Ländern liegt die Prävalenz bei ca. 11%¹ der erwachsenen Bevölkerung.^{2,3} Die Hauptursachen für chronische Nierenfunktionseinschränkungen sind Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie.^{1,4,5} Im Verlauf droht eine terminale Niereninsuffizienz, die sich unter anderem durch Linksherzhypertrophie, renale Osteopathie, renale Anämie und urämisches Syndrom manifestieren kann.^{1,4} Chronische Nierenerkrankungen sind darüber hinaus ein Hochrisikofaktor für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse.⁴ In einer großangelegten Kohortenstudie konnten Tonelli und Kollegen (2012) nachweisen, dass chronische Nierenerkrankungen mit einer höheren Gesamtmortalität assoziiert sind als ein vorausgegangener Myokardinfarkt.⁶ Trotz intensiver Forschung und einem wachsenden tieferen Verständnis für die molekularpathologischen Ursachen von Nierenerkrankungen haben sich bis heute keine spezifischen Therapien etabliert.

In der Mehrheit der Fälle liegt chronischen Nierenerkrankungen ein Funktionsverlust der Glomeruli zugrunde. In den Glomeruli werden durch Ultrafiltration des Blutplasmas täglich 180 l Primärharn gebildet.⁷ Um für den Organismus essenzielle Bestandteile zu erhalten, wird das Plasma durch eine Blut-Harn-Schranke filtriert, die für größere Proteine wie Albumin undurchlässig ist.⁴ Im anschließenden Tubulussystem werden zusätzlich über 99% der filtrierten Moleküle und des Wassers aus dem Primärharn resorbiert sowie Abfallstoffe sekretiert.⁸ Der Nierenfilter setzt sich aus dem fenestrierten Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten zusammen.^{9,10} Podozyten sind hochspezialisierte, postmitotische Epithelzellen der Niere, die durch Ausbildung primärer und sekundärer Fortsätze die Blutkapillaren vollständig umschließen. Benachbarte Podozyten sind durch eine einzigartige Schlitzmembran miteinander vernetzt, die über die Funktion einer mechanischen Filtereinheit hinaus eine komplexe Signalplattform integriert.^{7,11}

Schädigungen an den Podozyten sind durch Veränderungen des strukturgebenden Aktinzytoskeletts charakterisiert.^{12,13} Die resultierenden morphologischen Veränderungen zeigen sich im Verlust der Schlitzmembran und des podozytenspezifischen Fortsatzmusters, das als *Foot Process Effacement* bezeichnet

wird.^{14,15} Polaritätssignalwege sind als ein Hauptregulator an der Zelldifferenzierung beteiligt und für die Ausbildung und Aufrechterhaltung des Aktinzytoskeletts essenziell.¹⁶ Während der Entwicklung der Zelle sind sie zudem für die exakte Lokalisation von Ionen transportern, Kanälen und Transkriptionsfaktoren zu spezifischen Plasmamembranbereichen verantwortlich.¹⁷ Die apikobasale Zellpolaritätsachse wird in Epithelien durch die Polaritätskomplexe Crumbs-, Par- und Scribble-Komplex etabliert.¹⁸ Während der Crumbs-Komplex bestehend aus Crumbs, Protein associated with Lin-7 1 (Pals1) und Pals1-associated tight junction protein (Patj) apikal lokalisiert ist,¹⁹ befindet sich der Par-Komplex apikolateral und setzt sich aus der atypischen Proteinkinase C (aPKC), Partitioning defective 3 (Par3) und Partitioning defective 6 (Par6) zusammen.^{20,21} Der Scribble-Komplex ist in basolateralen Domänen der Zelle lokalisiert und besteht aus den Proteinen Scribble, Discs large (Dlg) und Lethal giant larvae (Lgl).²⁰ Überraschenderweise ist der podozytenspezifische *knockout* von Scribble und Par3A phänotypisch unauffällig,^{9,19,20} während der podozytenspezifische *knockout* der Polaritätsproteine Crumbs und aPKC^{iota} zu gravierender Schädigung der Podozytenmorphologie führt.²² Obwohl Par3A den aPKC-Par-Komplex über Neph1-/Nephrin-Interaktion mit der Schlitzmembran verbindet,¹⁰ führt eine genetische Deletion nicht zu glomerulärer Schädigung.⁹ Aktuelle Studien konnten zeigen, dass Par3B die dominierende Variante der Par3-Proteine in Podozyten ist,^{9,23} allerdings im Unterschied zu Par3A keine aPKC-Bindedomäne aufweist.²⁴ Bislang ist nicht geklärt, wie die Kinase aPKC^{iota} an der Schlitzmembran verbleiben kann, nachdem das codierende Gen für Par3A ausgeschaltet wurde. Weiterhin sind die aPKC^{iota}-spezifischen-Targets in Podozyten nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, potenzielle Targets der Kinase aPKC^{iota} zu identifizieren und mögliche Wechselwirkungen zu untersuchen.

2.2 Stand der Forschung

Die paarig angelegten Nieren sind mit 20 % des Herzzeitvolumens die am stärksten durchbluteten Organe des Körpers.^{25,26} Sie produzieren durch Ultrafiltration des Blutplasmas täglich ca. 180 l Primärharn,^{27,28} der im Nierentubulussystem auf 1 - 2 l Endharn²⁹ konzentriert wird. Durch komplexe Regulationsprozesse im Tubulus- und Sammelrohrsystem werden essenzielle Stoffe wie Elektrolyte resorbiert und harnpflichtige Stoffwechselendprodukte eliminiert.²⁵ Durch Regulation des Wasser-

und Elektrolythaushalts beeinflussen die Nieren den arteriellen Blutdruck und das Blutvolumen im Körperkreislauf wesentlich mit.

Makroskopisch gliedert sich das Nierenparenchym in die Nierenrinde und das innen liegende Nierenmark auf.³⁰ Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das sich aus Nierenkörperchen und Tubulussystem zusammensetzt.²⁸ Die in der Rinde lokalisierten Nierenkörperchen bestehen aus einem Gefäßknäuel, dem sogenannten Glomerulus, das von der undurchlässigen Bowman-Kapsel umschlossen wird.⁸ Im Gefäßpol des Nierenkörperchens finden über die Vas afferens und Vas efferens Blutzufuhr und -abfluss statt.^{8,28,30} In den Kapillarschlingen des Glomerulus entsteht durch Ultrafiltration des Blutes der Primärharn,²⁸ der zwischen viszeralem und parietalem Blatt der Bowman-Kapsel aufgefangen wird.⁸ Das Ultrafiltrat muss hierzu eine dreischichtige Barriere passieren, bestehend aus fenestriertem Endothel der Kapillaren, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten, die das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel darstellen.^{7,8} Die lumenwärtige Plasmamembran des Endothels sowie der Podozyten ist von einer anionischen Glykokalyx überzogen, die zusätzlich zur negativ geladenen glomerulären Basalmembran eine Barriere für negativ geladene Moleküle darstellt.^{7,8,31} Podozyten sind postmitotisch und besitzen eine einzigartige Morphologie durch Ausbildung von primären und sekundären Fortsätzen. In dem ca. 40 nm breiten Spalt zwischen benachbarten Podozyten spannt sich die Schlitzmembran auf, die als hochspezialisierter Zell-Zellkontakt Ähnlichkeit zu Tight und Adherens Junction aufweist und selektiv permeabel in Abhängigkeit von Größe und Form der Moleküle ist.^{7,31} Der produzierte Primärharn wird in den proximalen Tubulus fortgeleitet, der am Harnpol der Bowman-Kapsel entspringt.^{8,30,32} Der Harnfluss erfolgt weiter über den Intermediärtubulus in den distalen Tubulus, um schließlich durch den Verbindungstubulus in das Sammelrohr zu münden.²⁸

2.2.1 Glomeruläre Entwicklung

Eine Hauptaufgabe der Niere ist die Ultrafiltration des Blutplasmas, die durch die Integrität von ca. einer Millionen Filtereinheiten, den Glomeruli, gewährleistet wird.³³ Während der Embryonalentwicklung ist eine komplizierte Maschinerie an Transkriptionsfaktoren, parakrinen Signalkaskaden und Zellinteraktionen erforderlich, um die hochentwickelte Architektur der Glomeruli zu bilden.¹⁹ Die Glomerulogenese durchläuft vier Entwicklungsstadien, beginnend mit dem Nierenbläschen, dem Komma- und S-förmigen Körperchen, dem Kapillarschlingenstadium und schließlich

der Reifung der Podozyten.¹¹ Im kommaförmigen Stadium weisen Podozyten ein klassisches Zylinderepithel auf. Zell-Zell-Kontakte werden durch einen apikalen Zellverbindungskomplex bestimmt (Abb. 1), der vorwiegend durch Cadherine und Tight Junction-Proteine wie Zonula occludens protein 1 (ZO-1) dominiert wird.¹⁹ Durch parakrine Sekretion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) regen die noch unreifen Podozyten endotheliale Vorläuferzellen zur Vaskulogenese in der Spalte des S-förmigen Körperchens an.¹⁹ Im somit induzierten Kapillarschlingenstadium verlagert sich die apikale Verbindungsmaschinerie zum basalen Teil der Epithelzelle und bildet die Schlitzmembran aus, die sowohl Charakteristika einer Adherens Junction^{19,34} als auch einer Tight Junction aufweist.^{11,34} Die primordialen Podozyten beginnen mit der Expression klassischer Schlitzmembran-Proteine wie Nephrin, Neph1, Podocin und CD2-associated protein (CD2AP).^{11,19,35} Der aPKC-Par-Komplex, der für die Integrität der Zellpolarität eine zentrale Rolle spielt, ist in den frühen Entwicklungsstadien der Podozyten ebenfalls apikal lokalisiert und transloziert gemeinsam mit den Zell-Zell-Kontakten zum basolateralen Segment der Zelle.²⁰ Parallel findet eine faszinierende Konformationsänderung vom klassischen Zylinderepithel zur Ausbildung der einzigartigen Podozytenarchitektur mit primären und sekundären Fortsätzen statt, die mit dem Verlust der Zellteilungsfähigkeit assoziiert ist.^{11,19} Die glomeruläre Basalmembran wird durch Fusion der beiden Basalmembranen von Podozyten- und Endothel-Vorläuferzellen gebildet.^{19,36}

Bemerkenswerterweise konnte gezeigt werden, dass sich bei glomerulärer Schädigung die Fortsätze der Podozyten zurückbilden¹⁵ und die Zellen wieder das typische Erscheinungsbild von klassischen Epithelzellen annehmen. Zusätzlich findet eine Translokation der basolateralen Zellkontakte zum apikalen Teil der Zelle statt, begleitet von einer Expression von Tight Junctions, wie sie in frühen Entwicklungsstadien der Podozyten beobachtet wird.¹⁹ Eine Annahme besteht darin, dass die phänotypische Zellveränderung als Schutzmechanismus aktiviert wird, um den podozytären Zellverlust durch stabilere Verbindungen zwischen den Zellen und zur glomerulären Basalmembran zu verhindern.¹⁴ In meiner Forschungsgruppe (AG Brinkkötter) wurde die Hypothese generiert, dass Podozyten während glomerulärer Erkrankungen eine Art Dedifferenzierung durchlaufen (Abb. 1). In diesem Stadium ist die Podozytenschädigung noch reversibel und daher von größtem Interesse für potenzielle Therapiestrategien.

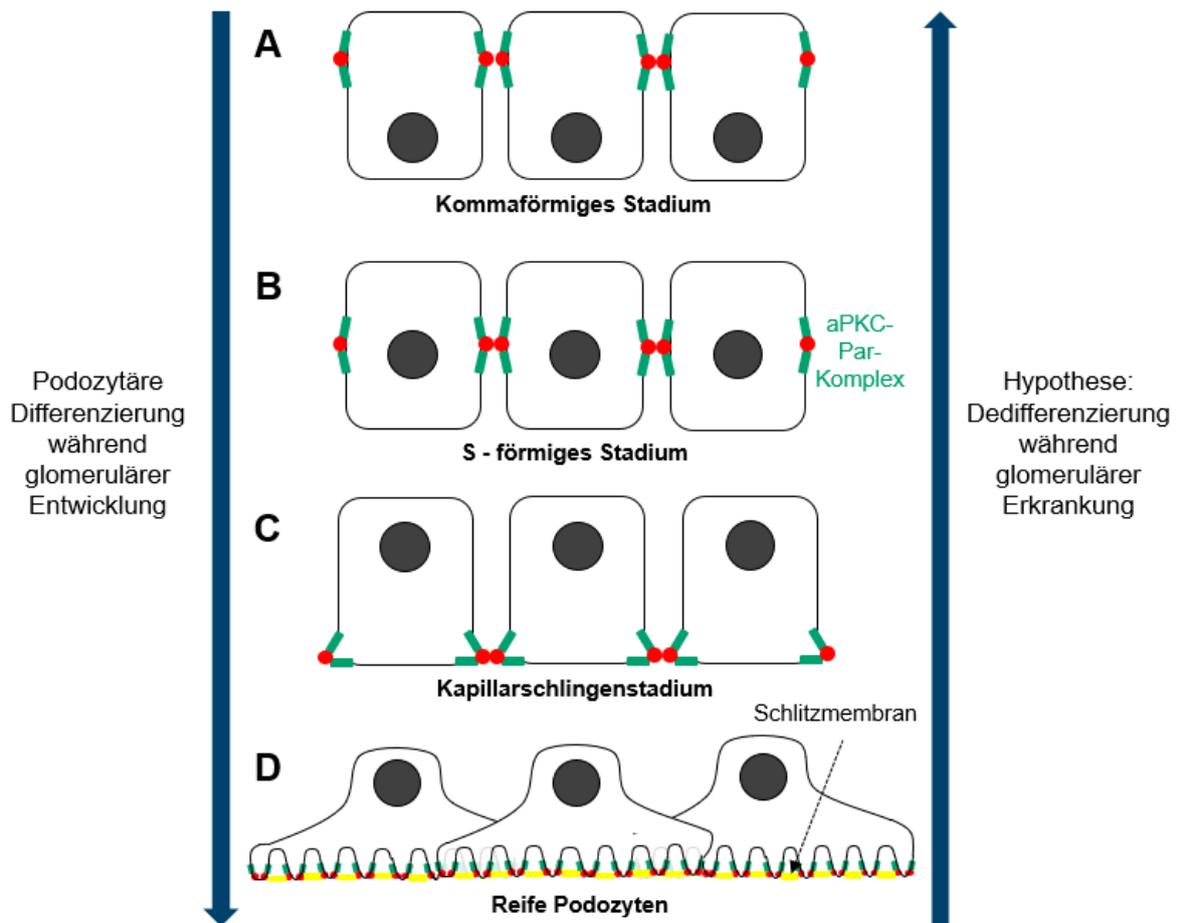


Abb. 1: Schematische Darstellung der Podozytenentwicklung (modifiziert nach Hartleben und Kollegen, 2012)²⁰

A Im kommalförmigen Stadium weisen prämaturre Podozyten apikal gelegene Zellverbindungskontakte auf.¹⁹

B Der aPKC-Par-Komplex transloziert ab dem S-förmigen Stadium gemeinsam mit den Zell-Zell-Kontakten Richtung basolateralem Anteil der Podozyten.²⁰

C Im Kapillarschlingenstadium befindet sich die Zellverbindungsmaschinerie und der aPKC-Par-Komplex schließlich am basalen Pol der Zelle, während die Reifung von primären und sekundären Fortsätzen beginnt.^{11,19}

D Die differenzierten Podozyten bilden interdigitierende Fußfortsätze aus, zwischen denen sich die Schlitzmembran aufspannt.^{11,19}

2.2.2 Podozyten und der Schlitzmembrankomplex

Podozyten sind hochspezialisierte Epithelzellen der Niere und bilden die äußere Schicht der glomerulären Filtrationsbarriere.¹¹ Durch Ausbildung von primären Fortsätzen, von denen sich sekundäre Fußfortsätze verzweigen, verzahnen sich benachbarte Podozyten untereinander.¹⁹ Der Spalt zwischen benachbarten Podozyten wird durch eine sogenannte Schlitzmembran überbrückt, die neben einer mechanischen Siebfunktion Ausgangspunkt komplexer Signalwege ist (Abb. 2).⁷ Eine Schädigung des strukturgebenden Aktinzytoskeletts der Podozyten ist eine Ursache für das Leitsymptom von Nierenerkrankungen, der Proteinurie, und daher von zentraler Bedeutung für die nephrologische Forschung.^{7,13}

Um die spezifische Architektur der Podozyten auszubilden, besitzen Zellkörper und primäre Fortsätze ein Zytoskelett aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, während die sekundären Fußfortsätze aus Aktin-Mikrofilamenten bestehen.¹¹ Die Mikrofilamente sind in Bündeln organisiert, die bis in die Ausläufer der Fußfortsätze reichen.¹¹ Die Aktinfilamente sind mit der glomerulären Basalmembran über einen $\alpha\beta 1$ -Integrin-Komplex verbunden,^{14,37} der mit Kollagen IV der glomerulären Basalmembran interagiert.¹¹ Podozyten weisen ein kontraktiles Aktinzytoskelett auf,^{11,38} bestehend aus Paxillin⁷, Aktin, Talin, Vinculin, Myosin-II und α -Actinin-4.¹⁴ Mutationen im für α -Actinin-4 kodierenden Gen ACTN4 führen zu einer autosomal-dominanten Form der fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS).³⁹ Das Adapterprotein CD2AP stellt eine Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett⁴⁰ und der Schlitzmembran über das Schlitzmembranprotein Nephrin her.¹⁴ CD2AP-*knockout*-Mäuse zeigen ein kongenitales nephrotisches Syndrom und versterben wenige Wochen nach der Geburt.⁴¹ Die dramatischen Auswirkungen in Mutationen der Genexpression von α -Actinin-4 und CD2AP demonstrieren die grundlegende Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die Struktur und Funktionalität der Podozyten. Ein weiteres strukturelevantes Protein der kontraktiven Mikrofilamente ist Synaptopodin (Synpo),⁴² das mit α -Actinin interagiert und an der Bündelung der Aktinfilamente beteiligt ist.⁴³ Asanuma und Kollegen (2012) konnten *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass der *knockout* von Synaptopodin zu einer verzögerten Neubildung von Aktinfilamenten führt.⁴³ Zudem lassen ihre Forschungsergebnisse schlussfolgern, dass ein weiteres Protein, Synpo-T, in der Abwesenheit von Synaptopodin dessen Funktion kompensiert.⁴³ Ning und Kollegen (2020) konnten im Gegensatz zu den vorherigen Forschungsergebnissen zeigen, dass Synaptopodin für die Entwicklung

und den Erhalt der Podozyten verzichtbar ist, jedoch eine protektive Wirkung vor Nierenerkrankungen besitzt.⁴⁴

Die Fußfortsätze von interdigitierenden Podozyten sind verbunden durch einen Multiproteinkomplex, der sogenannten Schlitzmembran, welche unter anderem aus den Proteinen Nephrin, Podocin, Neph1 und CD2AP zusammengesetzt ist (Abb. 2).¹¹ Das Protein Nephrin wird durch das Gen NPHS1 codiert, dessen Mutation ursächlich für das nephrotische Syndrom vom finnischen Typ ist.^{7,11,45,46} Nephrin und Neph1, die gemeinsam zur Immunglobulin-Superfamilie zählen, interagieren mit dem Genprodukt von NPHS2, Podocin.^{7,47} NPHS2 ist in einer Form des steroidresistenten, nephrotischen Syndroms mutiert und beweist die Bedeutung von Podocin für die Integrität des glomerulären Filters.⁴⁸ Huber und Kollegen (2003) konnten zeigen, dass Podocin Nephrin zu sogenannten Lipid-Raft-Mikrodomänen navigiert, wodurch die Effizienz des Nephrin-Signaling erheblich gesteigert wird.⁴⁹ Eine weitere Induktion der Signaltransduktion erfolgt durch Interaktion zwischen ZO-1 und Neph1.⁵⁰ *Knockout*-Mäuse mit einer Mutation für Neph1 weisen ein kongenitales, nephrotisches Syndrom auf, das dem Phänotyp von NPHS-Mutationen ähnelt.⁷ In einer kürzlich publizierten Studie konnten Butt und Kollegen (2020) demonstrieren, dass Mutationen in Podocin zu Veränderungen im Aktinzytoskelett der Podozyten und einer Verkürzung der Schlitzmembran führen.⁵¹ Durch diese morphologischen Veränderungen wird die Resistenz der Podozyten gegenüber den Filtrationskräften herabgesetzt und der von den Podozyten ausgeübte Kompressionsdruck auf die glomeruläre Basalmembran vermindert.⁵¹ In Folge dessen wird die Faserdichte der glomerulären Basalmembran aufgelockert und die Permeabilität des Nierenfilters erhöht, was sich klinisch als Proteinurie manifestiert.⁵¹

Zusammenfassend beweist die aktuelle Studienlage, dass die Funktionalität des Nierenfilters wesentlich durch wechselseitige Interaktionen und Signalkaskaden zwischen Schlitzmembran und Aktinzytoskelett gewährleistet wird.⁷

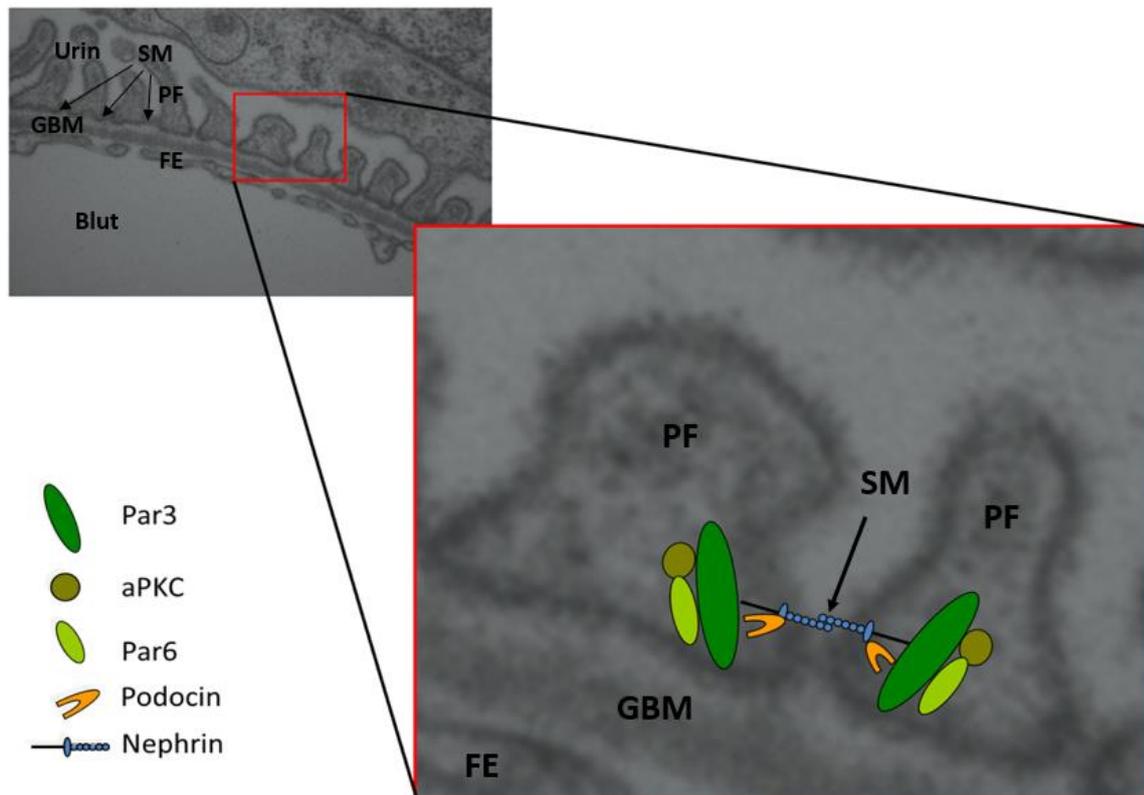


Abb. 2: Glomeruläre Schlitzmembran und der Par-Komplex

Der dreischichtige Nierenfilter setzt sich aus dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten mit ihren primären und sekundären Fußfortsätzen zusammen. Benachbarte Podozyten sind über eine einzigartige Schlitzmembran verbunden, die u. a. aus Podocin und Nephrin besteht. Der evolutionär hochkonservierte Par-Komplex setzt sich aus der Kinase aPKC sowie den Gerüstproteinen Par3 und Par6 zusammen. In Podozyten ist der Komplex mit den Schlitzmembranproteinen Podocin und Nephrin assoziiert. (SM: Schlitzmembran, PF: Podozytenfortsatz, GBM: Glomeruläre Basalmembran, FE: fenestriertes Endothelium)

Mit freundlicher Erlaubnis von Dr. Sybille Köhler, Zentrum für Molekulare Medizin Köln (ZMMK), Klinik II für Innere Medizin der Universität zu Köln

2.2.3 Zellpolarität

2.2.3.1 Epitheliale Zellpolarität

Epithelzellen sind die dominierende Zellart in vielzelligen Organismen und fungieren als selektive Schutzbarriere, die sämtliche inneren und äußeren Oberflächen des Körpers bedeckt.⁵² Epithelzellen weisen eine asymmetrische Polaritätsachse auf, die sich in ein apikales, laterales und basales Kompartiment gliedert.⁵³ Während die

apikale Zelloberfläche lumenwärts gerichtet und unter anderem für Sekretionsprozesse verantwortlich ist,⁵² wird über das laterale Zellkompartiment die Verbindung zu benachbarten Zellen hergestellt.⁵³ Der basal gelegene Teil der Zelle dient der Verankerung mit der Basalmembran.^{18,53} Das biologische Prinzip der Zellpolarität ist elementar für die Entwicklung und den Erhalt von Zellen und reflektiert durch eine spezifische Lipid- und Proteinzusammensetzung die unterschiedlichen zellulären Funktionsbereiche.^{18,54} Die epitheliale Zellpolarität wird durch drei evolutionär hochkonservierte Polaritätskomplexe, den Par-, Scribble- und Crumbs-Komplex, gewährleistet (Abb. 3).¹⁸ Der Par-Komplex besteht aus den Gerüstproteinen Par3 und Par6 sowie der Serin/Threonin-Kinase aPKC und ist in klassischen Epithelzellen apikolateral lokalisiert.^{9,11,20,21} Der Crumbs-Komplex setzt sich aus den Proteinen Crumbs, Pals1 und Patj zusammen und befindet sich apikal.^{9,19} Der basolateral gelegene Scribble-Komplex wird aus den Proteinen Scribble, Dlg und Lgl zusammengesetzt,²⁰ die neben regulatorischen Funktionen als Gerüstproteine fungieren.²¹

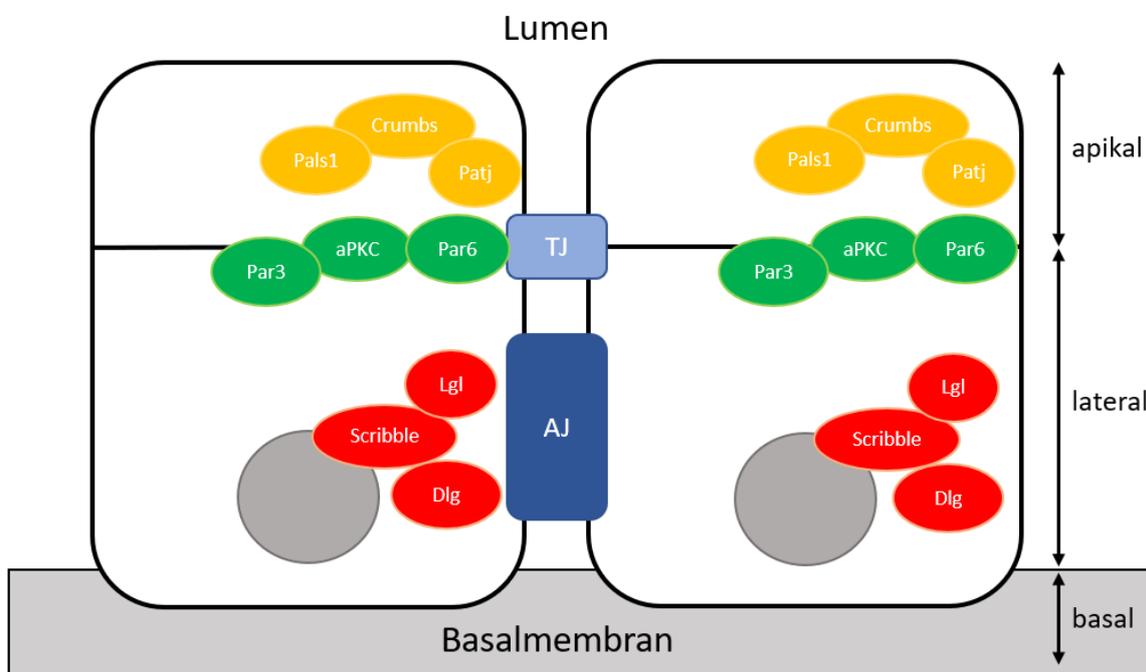


Abb. 3: Schematische Darstellung der Zellpolaritätskomplexe in klassischen Epithelzellen
(modifiziert nach Martin-Belmonte und Kollegen, 2011)¹⁸

In klassischen Epithelzellen wird die Zellpolarität durch drei Polaritätskomplexe gewährleistet. Der Crumbs-Komplex (in orange dargestellt) ist apikal lokalisiert und besteht aus den Proteinen Crumbs, Pals1 und Patj.^{9,19} Der Par-Komplex (grün) befindet sich apikolateral und setzt sich aus der Kinase aPKC, Par3 und Par6 zusammen.^{20,21} Der Scribble-Komplex (rot) befindet sich hingegen in basolateralen Domänen der Zelle und besteht aus den Proteinen Scribble, Dlg und Lgl.²⁰ (TJ: Tight Junction, AJ: Adherens Junction)

2.2.3.2 Der aPKC-Par-Polaritätskomplex

In klassischen Epithelien ist der Par3-Par6-aPKC Komplex essenziell für die Etablierung der Zellpolarität. Die ersten codierenden Gene für Polaritätsproteine wurden 1988 von Kemphues und Kollegen (1988, 2008) im Embryo des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* entdeckt.^{54,55} Im Verlauf wurde herausgefunden, dass für die asymmetrische Zellteilung der Zygote von *Caenorhabditis elegans* insgesamt 6 Partitioning defective-Proteine erforderlich sind. Neben dem 14-3-3 Protein Par5 und dem Zinkfingerprotein Par2⁵⁶ dienen Par1⁵⁷ und Par4⁵⁸ als Serin/Threonin-Kinasen.⁵⁴ Die Par-Proteine Par3 und Par6 besitzen PDZ-Domänen, die eine direkte Interaktion untereinander ermöglicht.⁵⁴ Sie fungieren darüber hinaus als Gerüstproteine und bilden mit der Kinase aPKC den evolutionär konservierten aPKC-Par-Komplex. Während Par3 über seine erste PDZ-Domäne mit Par6 interagiert,^{54,59,60} bilden aPKC und Par6 einen Heterodimer über ihre PB-1-Domänen aus (Abb. 4).⁵³ Defekte in einem der drei Polaritätsproteine führen zu einer Dislokation der anderen Interaktionspartner und belegen die wechselseitige Abhängigkeit voneinander.⁶¹

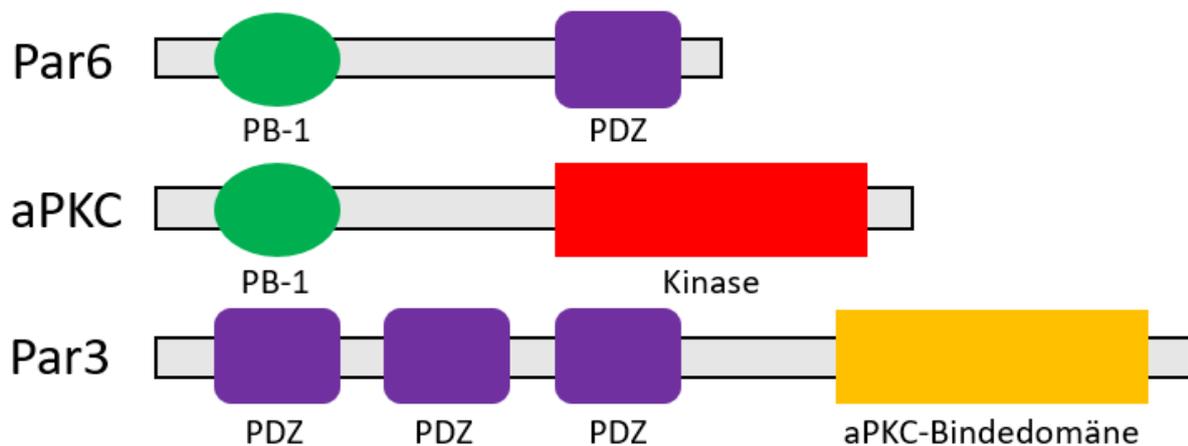


Abb. 4: Polaritätsproteine des Par-Komplexes (modifiziert nach Pieczynski und Kollegen, 2011)⁶²

Der evolutionär hochkonservierte Par-Komplex besteht aus den Polaritätsproteinen aPKC, Par6 und Par3. Par6 und aPKC sind über ihre PB-1-Domänen verbunden und bilden einen Heterodimer aus.⁵³ Durch das Gerüstprotein Par3 wird der Komplex in klassischen Epithelzellen über seine PDZ-Domäne am apikalen Kortex lokalisiert.¹⁶

In Säugetieren sind zwei unterschiedliche Par3-Gene, Pard3A und Pard3B, für die Expression der Par3-Proteine verantwortlich. Von Par3A existieren mehrere Isoformen, wobei die drei dominierenden Isoformen die Molekulargewichte 100 kDa, 150 kDa und 180 kDa aufweisen. Die kürzeste Par3A-Isoform (100 kDa) besitzt im Unterschied zu den anderen beiden vorherrschenden Par3A-Isoformen keine aPKC-Bindedomäne, bei Par3B (140 kDa) fehlt die Kinasedomäne hingegen komplett.⁵⁴ Par3A fungiert als Gerüstprotein, indem es über seine PDZ-Domäne mit dem C-Terminus von Junctional Adhesion Molecule (JAM)-1 interagiert, das über ZO-1 mit dem Hauptstrukturprotein der Tight Junctions Claudin verbunden ist.¹⁶ Über diese Verbindungsmechanismen wird der aPKC-Par-Komplex am apikalen Kortex lokalisiert und reguliert die korrekte Formation der Tight Junctions.^{16,63} Die Aktivierung von aPKC wird durch Konformationsänderung von Par6 initiiert, wodurch die Hemmwirkung von Par6 auf aPKC aufgehoben wird.^{60,64} Die Konformationsänderung von Par6 erfolgt durch Interaktion zwischen der semi-Cdc42/Rac-interactive binding (CRIB)- und PDZ-Domäne von Par6 und der GTP-gebundenen Form von Ras-related C3 botulinum toxin

substrate 1 (Rac1) und Cdc42.^{16,60} Nach Aktivierung der Kinase aPKC wird Par3A an Serin 827 phosphoryliert und dissoziiert vom Komplex.⁶¹

Die Kinase aPKC gehört neben der klassischen Proteinkinase C (cPKC) und der neuen Proteinkinase C (nPKC) zur Familie der Proteinkinasen C, die durch Phosphorylierung von Serin- oder Threoningruppen die Aktivität ihrer Substrate reguliert.⁶⁵ Im Unterschied zu cPKC und nPKC ist die Aktivität des Isoenzym aPKC unabhängig von Calciumionen und/oder Diacylglycerin, sondern basiert auf Protein-Protein-Interaktionen.⁶⁶ Die Proteinkinase aPKC liegt zudem in den Isoformen aPKC^{iota} und aPKC^{zeta} vor. Interessanterweise führt der podozytenspezifische Verlust der Serin/Threonin-Kinase aPKC^{iota} zu Proteinurie und vorzeitigem Tod,²² während aPKC^{zeta} in Podozyten nur gering exprimiert wird und bei genetischer Deletion keinen Phänotyp aufweist.⁶⁷ Neben einer zahlreichen und stetig wachsenden Anzahl an aPKC-Substraten sind u. a. die Polaritätsproteine Par3A,⁶⁶ Par6,⁶⁸ Dlg,⁶⁹ Crumbs,⁷⁰ Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3 β)⁶⁶ und Lgl⁷¹ Targets der Kinase. Die Zellpolarität wird u. a. durch verschiedene Interaktionen der Polaritätsproteine reguliert, wodurch nachgeschaltete Signalkaskaden aktiviert oder inaktiviert werden können. Während der Entwicklung der Zellpolarität bildet Lgl mit aPKC und Par6 einen Komplex.⁷² Nach Aktivierung von aPKC wird Lgl phosphoryliert, was eine weitere Interaktion zwischen beiden Polaritätsproteinen verhindert. Lgl transloziert daraufhin von apikalen Bereichen der Plasmamembran nach basolateral und etabliert somit einen Teil der apikobasalen Polaritätsachse.^{66,72,73} Daraufhin bildet aPKC einen Komplex mit Par3 und Par6, wodurch die Bildung von Tight Junctions angeregt wird.⁷² Über die Hälfte aller Polaritätsproteine konnten in den letzten Jahrzehnten als Substrate von aPKC identifiziert werden und belegen die elementare Bedeutung von aPKC für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität.⁶⁶

2.2.3.3 Zellpolaritätssignalwege in Podozyten

Die epitheliale Zellpolarität ist seit einigen Jahrzehnten intensiv erforscht worden. Zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen und Regulationsmechanismen wurden entschlüsselt, die für die Differenzierung und den Erhalt der Zelle in komplexen Signalkaskaden verantwortlich sind. Während der podozytenspezifische *knockout* der Proteine Crumbs und aPKC^{iota} in einer zerstörten Podozytenarchitektur resultiert, ist der podozytenspezifische *knockout* von Scribble überraschenderweise phänotypisch

unauffällig.^{19,20} Der aPKC-Par-Komplex ist in frühen Reifestadien der Podozyten in apikalen Zellkompartimenten gemeinsam mit Tight Junctions lokalisiert.^{11,20} Im Unterschied zur typischen Polaritätsachse von Epithelien transloziert der Komplex während der podozytären Differenzierung gemeinsam mit den Zellverbindungskontakten zum basolateralen Pol der Zelle und verbindet sich mit den Schlitzmembranproteinen Neph1 und Nephrin.^{10,22} Die Proteinkinase aPKC liegt in den Isoformen aPKC^{iota} und aPKC^{zeta} vor, die eine hohe Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen aufweisen, aber durch unterschiedliche Gene codiert werden.^{22,74} Hartleben und Kollegen (2008, 2009) konnten nachweisen, dass der podozytenspezifische *knockout* von aPKC^{iota} in Mäusen mit schwerer glomerulärer Schädigung, Proteinurie und Tod nach wenigen Wochen einhergeht,^{10,22} während die genetische Deletion von aPKC^{zeta} phänotypisch unauffällig bleibt.^{9,67} Studien von Köhler und Kollegen (2016) konnten zeigen, dass der podozytenspezifische *knockout* von Par3A keine Auswirkungen auf die glomeruläre Filtrationsbarriere hat.⁹ Zudem zeigen die Forschungsergebnisse, dass Par3B und nicht Par3A die vorherrschende Par3-Variante in Podozyten darstellt, jedoch im Gegensatz zu Par3A keine aPKC-Bindedomäne aufweist.⁹ Da Podozyten im Gegensatz zu klassischen Epithelzellen nur einen basal gelegenen Zell-Zell-Kontakt aufweisen, sind alle Polaritätskomplexe dicht zueinander und zur Schlitzmembran lokalisiert. Die Annahme ist daher naheliegend, dass sich die Polaritätssignalwege zwischen Podozyten und klassischen Epithelien unterscheiden.

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Bedeutung des aPKC-Par-Komplexes ist evolutionär hochkonserviert und reicht vom Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* bis hin zu Säugetieren.¹⁶ Der aPKC-Par-Komplex konnte als ein zentraler Akteur zur Etablierung der Zellpolarität und des Aktinzytoskeletts von Podozyten identifiziert werden, deren Funktion für den glomerulären Filter unerlässlich ist. Die aktuelle Studienlage beweist zudem die elementare Bedeutung der Kinase aPKC^{iota} für die Funktion des Nierenfilters.²² Überraschenderweise führt der podozytenspezifische *knockout* des Gerüstproteins Par3A, welches aPKC in klassischen Epithelien mit der Plasmamembran verankert, zu keiner nachweisbaren Schädigung des glomerulären Filters.⁹ Die in Podozyten

dominierende Par3-Variante Par3B besitzt zudem keine aPKC-Bindedomäne. Aus den gewonnenen Erkenntnissen leiteten sich folgende Fragestellungen ab:

- 1) Gibt es spezifische aPKC-Targets, die direkt oder über Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden an der Konservierung von aPKC im Par-Komplex beteiligt sind?
- 2) Wie unterscheiden sich die spezifischen Targets von aPKC zwischen klassischen Epithelien und Podozyten?

Da aPKC eine essenzielle Rolle in der Podozytenbiologie spielt und wir Polaritätswege in Podozyten im Detail besser verstehen wollen, ist das Ziel dieser Arbeit die Identifikation von neuen, podozytenspezifischen aPKC^{iota}-Targets. Mit Hilfe von chemischen aPKC-Inhibitoren wurde versucht, neue Targets zu identifizieren. Parallel wurde aPKC in klassischen Epithelzellen und Podozyten deletiert und mittels massenspektrometrischer Analysen neue aPKC^{iota}-Targets gefunden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Laborbedarf

Tab. 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Laborbedarf

Chemikalien/Reagenzien/Lösungen	Anbieter
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Applichem
Aurothioglukose (ATG)	Sigma-Aldrich
Aurothiomalat (ATM)	Sigma-Aldrich
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Th. Geyer GmbH
Complete protease inhibitor EDTA-free (PIM)	Roche
Cumarsäure	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithio-1,4-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Doxorubicin	Sigma-Aldrich
Doxycycline hydrochloride	Sigma-Aldrich
Ethanol 96% mit Methylalkohol	Th. Geyer GmbH
Ethidiumbromid 1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom AG
Glycin	Roth
Glutamax	Thermo Fisher Scientific
HEPES Puffer 1M	Life Technologies
Interferon γ (IFN- γ)	Provitro
Iodacetamid (IAA)	Merck
Kaliumchlorid	Roth
Kollagen I	InvitroGen
LB-Medium	Roth

Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific
Luminol	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
Natriumbicarbonat-Lösung 7,5%	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat	Sigma-Aldrich
Nonylphenyl-polyethylen-glycol (NP-40)	Sigma-Aldrich
ON-TARGET ^{plus} mouse Prcki (18759) siRNA SMARTpool	Dharmacon
ON-TARGET ^{plus} Non-targeting siRNA Pool	Dharmacon
Opti-MEM®	Invitrogen
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas
Pierce® Water LC-MS Grade	Thermo Fisher Scientific
Halt® Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific
Protein G Sepharose	Th. Geyer GmbH
PS432	Sigma-Aldrich
Sucrose	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck
Trizma base	Sigma-Aldrich
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
TRIzol® Reagent	Lifetechnologies
Trypsin-EDTA Lösung	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid 30%	Roth
Zeocin	InvivoGen

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	100 mM Tris 1,25 mM Luminol 0,2 mM Cumarsäure 0,75% H ₂ O ₂ pH 8,5
Einfriermedium	45% Fetales Kälberserum 45% DMEM für mIMCD oder RPMI-1640 für HSMP 10% DMSO
HEBS (2x)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,08
HEK 293T Zellkulturmedium	10% Fetales Kälberserum in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
HSMP Zellkulturmedium	10% Fetales Kälberserum 5 ml 1M HEPES Puffer 5 ml 100 mM Natrium Pyruvat in RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)
mIMCD Zellkulturmedium	10% Fetales Kälberserum 1% Glutamax in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
IP Puffer	20 mM Tris 1% Triton X-100 50 mM NaCl

	15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 50 mM NaF pH 7,5
Laemmli Probenpuffer (2x)	100 mM Tris 4% SDS 20% Glycerol Bromphenolblau 100 mM DTT pH 6,8
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris 192 mM Glycine 0,1% SDS
Neutralisationslösung	40 mM Tris-HCl pH 5
Phosphatgepufferte Salzlösung	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Sammelgel-Puffer	2 M Trizma Hydrochlorid 2 M Trizma Base 20% SDS in 1 l ddH ₂ O
SOC-Medium	2% Tryptone 0,5% Hefeextrakt 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl 20 mM MgSO ₄ 20 mM Glukose
TAE (1x)	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,5
Trenngel-Puffer	2 M Trizma Hydrochlorid

	2 M Trizma Base 20 % SDS in 1 l ddH ₂ O pH 8,8
Transfer-Puffer	25 mM Tris 188 mM Glycin 0,1% SDS
Urea-Puffer	8 M Urea 50 mM Ammoniumbicarbonat 10 ml Reinstwasser
Waschpuffer	30 mM Tris 300 mM NaCl 0,3% Tween20 pH 7,5

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Anbieter
Agarplatte (10 cm)	Sarstedt
BD Primaria Zellkulturschalen (10 cm)	BD Biosciences
Blottingpapier (Sorte BF4, 580 x 580)	VWR
Glasplatte 10 x 10 cm	VWR
Kryobox	VWR
Kryoröhrchen (1,2 ml)	VWR
Millipore Immobilon-P Transfermembranen	Carl Roth
Multiply 8er Deckelkette, flach	Sarstedt
Multiply- μ Strip 0,2 ml Kette	Sarstedt
Nitril Fino Handschuhe S	Hartmann
Oasis HLB 1 cc Vac Cartridge 30 mg	Waters

Parafilm 10 cm Dispenserkarton	VWR
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polypropylene Conical Tubes (15 ml)	VWR
Polypropylene Conical Tubes (50 ml)	VWR
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße Safe Lock (1,5 ml)	LMS
Reaktionsgefäße Safe Lock (2 ml)	LMS
Rotalibo Spritzenfilter 0,45 µm, steril	Carl Roth
Stripetten (5 ml)	LMS
Stripetten (10 ml)	LMS
Stripetten (25 ml)	LMS
Tip-One 1 – 200 µl abgeflacht, steril	Starlab
Zellkulturschalen 6-Well	LMS
Zellkulturschalen (10 cm)	Corning

3.1.4 Kits/Assays

Tab. 4: Liste der verwendeten Kits und Assays

Kits/Assays	Anbieter
BCA Protein Assay Kit	Pierce
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
Blotting Papier (Sorte BF4, 580 x 580)	VWR
Direct-zol® RNA MiniPrep	Zymo Research
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific
High-Select® Fe-NTA Phosphopeptide Enrichment Kit	Thermo Fisher Scientific
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey Nagel
PKC Kinase Activity Assay Kit	Abcam
Power SYBR® Green Mastermix	Thermo Fisher Scientific

3.1.5 Plasmide

Tab. 5: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Vektor	Anbieter
aPKC ^{iota} hp2+3 pLenti4/TO	pLenti4/TO/V5/Dest	Nephrologisches Forschungslabor, Köln
Mir Neg pLenti4/TO	pLenti4/TO/V5/Dest	Nephrologisches Forschungslabor, Köln
pLenti6.TTR	pLenti6	Nephrologisches Forschungslabor, Köln
pMD2 VSV G		Nephrologisches Forschungslabor, Köln
pMDL g/p		Nephrologisches Forschungslabor, Köln
pRSV-rev		Nephrologisches Forschungslabor, Köln

3.1.6 Bakterien

Tab. 6: Liste der verwendeten Bakterienstämme

Bakterienstamm	Anbieter	Verwendung
Top10-Bakterien (E. coli)	Invitrogen	Lenti-Klonierungen

3.1.7 Eukaryote Zellen

Tab. 7: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Anbieter
HEK 293T	Nephrologisches Forschungslabor, Köln

HSMP	Nephrologisches Forschungslabor, Köln
mIMCD	Nephrologisches Forschungslabor, Köln

3.1.8 Primer

Tab. 8: Liste der verwendeten Primer

Primer	Verwendung	Sequenz 5'-3'
emGFP fp	Sequenzieren	ATGGTGAGCAAGGGGCGAGGAGCTGTTC
m-ACTB fp1	qPCR	AAGAGCTATGAGCTGCCTGA
m-ACTB rp1	qPCR	TACGGATGTCAACGTCACAC
m-HPRT1 fp	qPCR	GCTGACCTGCTGGATTACAT
m-HPRT1 rp	qPCR	TTGGGGCTGTACTGCTTAAC
Prkci	qPCR	TaqMan® FAM Thermo Fisher Scientific Mm01293252_m1

3.1.9 Antikörper

Tab. 9: Liste der verwendeten Antikörper

Antigen	Typ	Verdünnung	Gewonnen aus	Katalognummer	Anbieter
Anti-Kaninchen-IgG (H+L)-HRPO	Polyklonaler Sekundärantikörper	1:15.000	Ziege	111-035-045	Dianova
Anti-Maus-IgG (H+L)-HRPO	Polyklonaler Sekundärantikörper	1:15.000	Ziege	115-035-003	Dianova

aPKC ^{iota}	Polyklonaler Primär-antikörper	2 µl für IP	Meerschweinchen		AG Niessen
aPKC ^{iota}	Primär-antikörper	1:1.000	Kaninchen	2998S	Cell Signaling Technologies
Lgl2	Monoklonaler Primär-antikörper	1:1.000	Maus	sc-376857	Santa Cruz
Par3A	Polyklonaler Primär-antikörper	1:500	Kaninchen	07-330	Millipore
Par3B	Monoklonaler Primär-antikörper	1:500	Maus	sc-398761	Santa Cruz
Phospho-(Ser) PKC Substrate	Polyklonaler Primär-antikörper	1:1.000	Kaninchen	2261S	Cell Signaling Technologies
β-Tubulin	Monoklonaler Primär-antikörper	1:1.000	Maus	T0198	Sigma-Aldrich

3.1.10 Geräte

Tab. 10: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Modell/ Produktnummer	Hersteller
Autoklavierer	V-150	Systec
AxioCam	ICc 1	Zeiss
Hamilton Syringe (50 µl Typ 705)	549-1155	VWR
Heatingblock	TH 21	Ditabis
Hood	021928	Kojair

Inkubator (Zellkultur)	MCO-20AIC	Sanyo
Inkubator (Bakterien)	BD115	Binder
Live Zell-Analysator, JuLI® Br	91-JUBR04	VWR
Fast Real-Time PCR System	7900HT	ABI
Fusion Solo Luminometer	60-FU-SOLO	VWR
Kühlzentrifuge Avanti	J-E	Beckman
Kühlzentrifuge Heraeus®	4 KR	VWR
Mehrfachdispenser, Multipipette® M4	613-2890	VWR
Mehrkanalpipette	316-3706	VWR
Microzentrifuge	5421	Eppendorf
Minizentrifuge	521-2844	VWR
Mithras Multimode Microplate Reader	LB 940	Berthold Technologies
NanoDrop Spectrophotometer	1000	Peqlab
Pipetboy acu	613-4438	Integra
Pipetten	613-1143	Eppendorf
Power supply, VWR® Power Source	700-0115	VWR
Power supply, Elektrophorese	EV231	Consort
Sunlab® Rollenmischer	D-8400	neoLab®
Sonifikator	SONIC-250W	Donserv
Speed Vac Zentrifuge	SC110A	Savant
Thermoshaker	444-0823	Grant
Thermozykler	Mastercycler® gradient	Eppendorf
Thermozykler	070-601	Biometra
Vakuumpumpe	HLC	DITABIS
Vortex Mixer	444-1372	VWR
Zentrifuge	Z216MK	Hermle

3.1.11 Software

Tab. 11: Liste der benutzten Software

Software	Version	Anbieter
Adobe Illustrator CS4	CC2018	Adobe
DataAssist	V3 01	Applied Biosystems
FusionCAPT	15.16	Vilber Lourmat
GraphPad Prism®	7.05	GraphPad Software Inc.
MikroWin	2.000	Berthold Technologies
NanoDrop 1.000	3.7	Thermo Scientific
SDS Software	2.4.1	Applied Biosystems

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Immortalisierte Zelllinien

Die Experimente wurden mit den Zelllinien Heat-Sensitive Mouse Podocytes (HSMPs), Mouse Inner Medullary Collecting Duct Cells (mIMCDs) und Human Embryonic Kidney (HEK) 293T durchgeführt. Bei HSMP-Zellen handelt es sich um immortalisierte Podozyten, die aus der H-2Kb-tsA58-transgenen Maus gewonnen wurden.⁷⁵ Die Zelllinie enthält das temperatursensitive SV40 große T-Antigen, welches das Tumorsuppressorgen p53 ausschaltet.⁷⁶ Durch Hinzugabe von INT- γ wird der Histokompatibilitätskomplex H-2K^b Promoter induziert, der die Genexpression des großen T-Antigens zusätzlich aktiviert. Die postmitotischen Podozyten werden somit wieder zur Zellteilung angeregt und proliferieren.

Die Kultivierung der Podozytenzelllinie erfolgte bei 33 °C und 5% CO₂ in 10 cm Primaria Zellkulturschalen, die mit Kollagen I beschichtet waren. Zum Passagieren wurde den Zellen unter einer sterilen Werkbank das RPMI-1640 Medium mit 10% FBS, 10 mM HEPES Puffer, 1 mM Natrium Pyruvat und 5 ng/ml INT- γ entnommen. Es folgten ein Waschschrift mit 10 ml 1x PBS und eine 5-minütige Inkubationszeit mit 1 ml Trypsin bei 33 °C. Durch Hinzugabe von frischem Medium wurde der Trypsinverdau

gestoppt. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:6 auf neue Zellkulturschalen mit vorbereitetem Medium und INT- γ ausgesät.

mIMCD-Zellen sind innermedulläre Sammelrohrzellen der Maus⁷⁷, die bei 37 °C in DMEM-Medium mit 10% FBS und 1% Glutamax in Corning Zellkulturschalen kultiviert wurden. HEK 293T-Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die zur Kultivierung mit DMEM-Medium mit 10% FBS bei 37 °C inkubiert wurden. Das Passagieren der beiden Zelllinien erfolgte analog der HSMP-Zelllinie mit Ausnahme der Trypsin-Inkubation, die bei 37 °C durchgeführt wurde.

3.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen für die Lagerung vorzubereiten, wurden diese nach einem Waschschrift mit 10 ml 1x PBS für 5 Minuten mit 1 ml Trypsin bei 33 °C (HSMP) bzw. bei 37 °C (mIMCD) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 9 ml Medium resuspendiert und bei 1.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 1 ml Einfriermedium (45% Medium, 45% FBS, 10% DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nachdem die Zellen zunächst schonend in einem Mr. Frosty Einfrierbehälter eingefroren wurden, erfolgte die Lagerung bei -80 °C. Um Zellen aufzutauen, wurden diese zügig erwärmt und in eine 10 cm-Zellkulturschale mit vorgewärmtem Medium überführt.

3.2.2 Proteinbiochemie

3.2.2.1 Proteinkonzentrationsbestimmungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der photometrisch messbaren Biuret-Reaktion, bei der Proteine im alkalischen Milieu mit Cu^{2+} -Ionen Chelate bilden.⁷⁸ Die Cu^{2+} -Ionen im Komplex werden im nächsten Schritt zu Cu^+ -Ionen reduziert. Durch Hinzugabe von Bicinchoninsäure (BCA) erfolgt ein violetter Farbumschlag des Komplexes, der proportional zur enthaltenen Proteinkonzentration ist.⁷⁹

Um die Proteinkonzentrationen in verschiedenen Proben zu quantifizieren, wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce verwendet. 5 μl der Proben sowie 5 μl einer Standardverdünnungsreihe mit Albumin wurden in eine 96-Well Mikroplatte pipettiert. Alle Proben und die Standardreihe wurden in Duplets bestimmt. Anschließend wurden

150 µl Reagenz A und 3 µl von Reagenz B in jedes Well pipettiert. Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde 15 Sekunden bei 300 rpm auf einem Plattenshaker durchmischt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messung der Proteinkonzentrationen erfolgte mittels kolorimetrischer Messung bei 562 nm durch einen Mithras LB 940 Microplate reader (Berthold Technologies).

3.2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine biochemische Methode zur Trennung von Stoffgemischen. Die Auftrennung erfolgt aufgrund der Molekülgröße und der Ladungsverhältnisse. Im Anschluss an die Gelelektrophorese werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran transferiert, wo sie mit spezifischen immunologischen Verfahren sichtbar gemacht werden.

Die Herstellung des Polyacrylamidgels erfolgte in zwei Schritten, die einzelnen Bestandteile sind in Tabelle 1 aufgelistet. Im ersten Schritt erfolgte die Herstellung des Trenngels, welches zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen wurde. Im Anschluss wurde Isopropanol hinzugefügt, um die Entstehung von Luftblasen zu verhindern. Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel hinzugegeben. Ein Plastikkamm mit 10 Fächern für die späteren Proben wurde im Anschluss in das Sammelgel eingefügt. Nach Abschluss der Polymerisierung wurde der Plastikkamm entfernt. Das Gel konnte nun verwendet oder in feuchten Kleenextüchern eingewickelt bei 4 °C gelagert werden.

Tab. 12: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
ddH ₂ O	5 ml	1,9 ml
40% Acrylamide/Bis Solution	5 ml	0,6 ml
Trenngel-Puffer	10 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	2,5 ml
APS	200 µl	50 µl
TEMED	30 µl	7,5 µl

30 µl der Proteinlysate bzw. 30 µl des Proteinlysats nach Immunpräzipitation wurden mit je 30 µl 2x Laemmli-Puffer mit DTT versetzt. Im 5-minütigen Inkubationsschritt bei 95 °C wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgebrochen, sodass die Proteine linearisiert vorlagen. Das im Gel sowie im Laufpuffer enthaltene SDS bindet die Proteine in einem proportionalen Ladungs- zu Masse-Verhältnis, sodass diese negativ geladen sind.⁷⁹ Die Proteine trennen sich entsprechend ihrer Ladung und ihrer Größe im elektrischen Feld durch die Poren der Polyacrylamidmatrix auf. Als Anhaltspunkt für das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine wurde ein Marker (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) aufgetragen, der Proteinproben mit definierter Größe enthält, die kovalent an Farbstoffe gekoppelt sind. Die Elektrophorese wurde bei 70 Volt (V) für 45 Minuten durchgeführt, gefolgt von 4 mA/Gel für 1 Stunde.

3.2.2.3 Western Blot

Die Übertragung der Proteine erfolgte mittels *semi-dry*-System durch Elektrophorese. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde hierbei auf eine durch Methanol aktivierte und anschließend in Transfer-Puffer getränkte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran gelegt. Unter der PVDF-Membran als auch über dem Gel wurden Whatman Filterpapiere platziert, die ebenfalls in Transfer-Puffer getränkt wurden. Die Proteine wurden bei 12 V für 60 Minuten auf die PVDF-Membran transferiert. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurde die Membran anschließend für eine Stunde in 5% BSA-Lösung bei Raumtemperatur auf einem Shaker (Stuart) inkubiert. Nach dreimaligem Waschschrift mit Waschpuffer für je 5 Minuten wurde die Membran in einer primären Antikörper-Lösung über Nacht bei 4 °C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nachdem die Membran dreimalig für je 5 Minuten mit Waschpuffer von unspezifischen Bindungen gelöst wurde, erfolgte die Inkubation mit Horse Radish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 Stunde. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran in Waschpuffer wurde diese mit Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Visualisierungslösung benetzt, die im Labor selber hergestellt wurde.⁸⁰ Von Lösung A und Lösung B (Tab. 13) wurden je 1 ml vermischt und auf die Membran gegeben. Die Meerrettich-Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion mit dem in Lösung A enthaltenden Luminol. Die Lichtemission wurde anschließend mit dem Fusion-Solo 7S (VWR) detektiert.

Tab. 13: Enhanced Chemiluminescence (ECL)

Ingredienz	Lösung A	Lösung B
H ₂ O	17,7 ml	18 ml
1M Tris/HCl pH 8,5	2 ml	2 ml
30% H ₂ O ₂	-	12 µl
Luminol	200 µl	-
Coumarinsäure	88 µl	-

3.2.3 Immunpräzipitation

Um die Interaktion von Proteinen zu untersuchen, wurde die Methode der Immunpräzipitation angewendet. 10 cm-Zellkulturschalen einer HSMP-Zelllinie oder einer mIMCD-Zelllinie wurden mit je 10 ml kaltem PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 1 ml IP-Puffer mit 40 µl PIM versetzt und gelöst in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten in Eis inkubiert und anschließend bei 15.000 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde für 1 Stunde mit einem aPKC^{iota}-Primärantikörper (AG Niessen) auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Mit Protein G beschichtete Sepharose-Kügelchen (Beads) wurden hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag folgte eine 2-minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm und 4 °C. Nach Absaugen des Überstands wurde auf die verbliebenen Beads, die spezifisch den Primärantikörper aPKC^{iota} mit der Kinase aPKC^{iota} gebunden haben, 1 ml IP-Puffer pipettiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt drei Mal wiederholt. Die gewonnene Probe wurde im letzten Schritt mit 30 µl Laemmli-Puffer mit DTT versetzt, mittels SDS-Gel aufgetrennt und durch einen Western Blot analysiert.

3.2.4 Chemische Inhibitoren gegen aPKC^{iota}

Um die Kinase aPKC^{iota} zu inhibieren, wurde die Podozytenzelllinie (HSMP) mit den Inhibitoren Aurothioglukose (ATG), Aurothiomalate (ATM) und PS432 behandelt. Die verschiedenen Konzentrationen und Zeitpunkte wurden mittels Western Blot validiert, um die Bedingungen zu identifizieren, unter denen die Inhibition am effektivsten ist. In

einem zweiten Schritt wurde bei den Inhibitoren ATM und PS432 ein PKC Kinase Assay Kit (Abschnitt 5.5) verwendet, um die Kinaseaktivität spezifisch nachzuweisen.

3.2.5 PKC Kinase Activity Assay Kit

Die Kinaseaktivität von aPKC^{iota} nach Inhibition durch ATM und PS432 wurde mit dem PKC Kinase Activity Assay Kit (Abcam UK) untersucht.⁸¹

Die Mikrotiterplatte wurde mit 50 µl Verdünnungspuffer je Well für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 30 µl der Proben und der Positivkontrolle (aufgereinigte, aktive PKC) als Duplikate hinzugefügt. Nach Hinzugabe von 10 µl ATP folgte ein 90-minütiger Inkubationsschritt bei 30 °C, bei dem die Mikrotiterplatte alle 20 Minuten geschüttelt wurde, um eine optimale Durchmischung der Komponenten zu erreichen. Bei jedem folgenden Inkubationsschritt wurden die geladenen Proben in der Mikrotiterplatte alle 10 - 20 Minuten durch kurzes Schütteln durchmischt. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Mikrotiterplatte ausgeleert wurde. Es folgte ein 60-minütiger Inkubationsschritt mit einem polyklonalen Antikörper, der spezifisch phosphorylierte Substrate detektiert. Nach einem viermaligen Waschschrift mit 100 µl Waschpuffer je Well wurde ein Sekundärantikörper hinzugegeben, der mit dem Enzym HRP konjugiert ist. Zuletzt wurde nach erneutem viermaligen Reinigen mit 100 µl Waschpuffer je 60 µl Tetramethylbenzidin(TMB)-Substrat pro Well hinzugefügt. Durch Aktivierung mit HRP erfolgte innerhalb von 30 – 60 Minuten ein Farbumschlag nach blau, der mit 20 µl Stop Solution angehalten wurde. Die Absorptionzunahme wurde bei der Wellenlänge 450 nm mit einem Mithras LB 940 Microplate reader (Berthold Technologies) gemessen.

3.2.6 Gentechnische Methoden

3.2.6.1 Transformation

Um die bereits im Nephrologischen Forschungslabor (Köln) vorhandenen Plasmide zur Herstellung stabiler Zelllinien zu vervielfältigen, wurde die Plasmid-DNA in Top10-Bakterien transformiert. Hierzu wurden 10 ng der Plasmid-DNA mit 50 µl kompetenter Top10-Bakterien für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 45 Sekunden einem 42 °C-Hitzeschock ausgesetzt. Nach einem 2-minütigem Inkubationsschritt auf Eis wurden 175 µl SOC-Medium

hinzugegeben, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation auf einem 30 °C-Schüttler. Im letzten Schritt wurden 60 µl der Bakteriensuspension auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte mit LB-Medium ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

3.2.6.2 Plasmidpräparation

Nach nächtlicher Inkubation wurden einzelne Kolonien der transformierten Top10-Bakterien mit der enthaltenen Plasmid-DNA gepickt und in 200 ml antibiotikahaltigem LB-Nährbouillon bei 30 °C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Bakteriensuspension bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde zur Gewinnung der replizierten Plasmid-DNA mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufbereitet.

3.2.6.3 Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass während des Klonierungsvorgangs keine Neumutationen entstanden sind, wurden die verwendeten Plasmide mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) sequenziert.⁸² Pro Sequenzierung wurden 200 ng DNA, 2 pmol Primer, 0,25 µl BigDye® Terminator v3.1 und 2,25 µl BigDye® Sequencing Buffer aufgefüllt mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl. Das Thermocycler-Programm wurde wie folgt eingestellt: 96 °C für 1 Minute gefolgt von 40 Zyklen bei 96°C für 10 Sekunden, 55 °C für 5 Sekunden, 60 °C für 4 Minuten. Die Sequenzierungen erfolgten durch das Cologne Center for Genomics (CCG, Köln).

3.2.7 Herstellung stabiler Zelllinien mit viralem Gentransfer

Um eine Zelllinie zu generieren, die ein DNA-Konstrukt stabil in das Genom integriert hat, wurde die Methode der lentiviralen Gentransduktion verwendet. Die Arbeiten zur Herstellung der stabilen Zelllinie wurden bis zur vollständigen Inaktivierung der Lentiviren unter einer gesonderten Werkbank mit S2-Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt.

3.2.7.1 Virusproduktion

Zur pLenti4-Virusproduktion wurden HEK 293T-Zellen mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Auf dem viralen Plasmid wurde eine Antibiotikaresistenz gegen Zeocin als Selektionsmarker eingefügt. Zusätzlich zur Transfektion mit dem viralen Plasmid wurden Helferkonstrukte ko-transfiziert (pMDL g/p, pRSV-rev, pMD2 VSV G), die für virale Strukturproteine kodieren. Pro Zellkulturschale wurde ein Mastermix angesetzt, der 10 µg virales Plasmid, 6,5 µg pMDL g/p, 2,5 µg pRSV-rev, 3,5 µg pMD2 VSV G und 500 µl 0,25 M CaCl₂ enthält. Anschließend wurde unter Vortexen 500 µl HEBS hinzugefügt. Um die Transfektion zu starten, wurde die Lösung kreisförmig auf 10 cm-Zellkulturschalen der HEK 293T-Zellen verteilt. Nach 8-stündiger Inkubation wurde die Transfektion durch einen Medium-Wechsel gestoppt. Nach 72 Stunden wurde das Medium 5 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen 0,45 µm Spitzenfilter in ein 50 ml Falcon überführt. Der Überstand mit den geernteten Viren wurde anschließend bei 4 °C gelagert.

3.2.7.2 Generierung einer induzierbaren aPKC^{iota}-*knockdown* Podozytenzelllinie

Um eine Podozytenzelllinie mit einem induzierbaren aPKC^{iota}-*knockdown* zu generieren wurde eine im Nephrologischen Forschungslabor (Köln) bereits vorhandene Podozytenzelllinie verwendet. Diese enthält eine Doxycyclin-induzierbare shRNA, welche zuvor mittels viralem Gentransfer in das Genom integriert wurde. Die Expression der shRNA wird durch Hinzugabe von Doxycyclin induziert und bewirkt durch RNA-Interferenz den spezifischen *knockdown* von aPKC^{iota}. Da der dauerhafte *knockdown* von aPKC^{iota} *in vitro* für die Zellen letal ist, ermöglicht die Verwendung des Tet-On Systems den transienten *knockdown* von aPKC^{iota} um die Auswirkungen der verringerten Genexpression zu untersuchen.⁸³

Die Podozytenzelllinie mit dem Tet-On System wurde mit 5 ml Viruslösung, 5 ml frischem Zellkulturmedium und 6 µl Polybrene transduziert. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und die Transduktionseffizienz mit dem Selektionsmarker Zeocin getestet, bis alle nicht-transduzierten Zellen in der Kontrollschale abgestorben waren.

3.2.7.3 Doxycyclin-Inkubation

Um den transienten *knockdown* von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie zu induzieren, wurden die Zellen in frisches Medium gesplittet, welches 0,1 µg/ml Doxycyclin enthielt. Nach 24 Stunden wurden erneut 0,1 µg/ml Doxycyclin in das Medium hinzugegeben. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen an Tag vier geerntet und für weitere Experimente verwendet.

3.2.8 Generierung eines aPKC^{iota}-*knockdown* in Sammelrohrzellen mittels siRNA

Bei der RNA-Interferenz wird Doppelstrang-RNA (dsRNA) durch die zytoplasmatische Nuclease Dicer in zwei Einzelstrang-RNAs gespalten. Der RNA-Strang mit dem stabileren 5'-Ende bildet anschließend mit einem Multiproteinkomplex den RNA-induced silencing complex (RISC). Im letzten Schritt verbindet sich RISC mit der komplementären mRNA des gewünschten Proteins und wird gespalten.⁸⁴ Durch die Spaltung der mRNA wird die Translation in ein funktionsfähiges Protein verhindert.

Zur Induktion eines aPKC^{iota}-spezifischen-*knockdowns* in einer mIMCD-Zelllinie wurde die Methode der transienten RNA-Interferenz genutzt. Hierzu wurde die ON-TARGET^{plus} SMARTpool siRNA (Dharmacon) spezifisch für Prkci verwendet. Durch die Verwendung von vier verschiedenen siRNAs wird die Wirksamkeit des aPKC^{iota}-spezifischen-*knockdowns* maximiert. Um mögliche Nebeneffekte der siRNA zu kontrollieren, wurde zusätzlich unspezifische ON-TARGET^{plus} Non-targeting siRNA (Dharmacon) verwendet.⁸⁵

Für die Transfektion wurden je 150 µl Opti-MEM® mit 9 µl Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorbereitet sowie 150 µl Opti-MEM® mit 10 nmol der gewünschten siRNA. Die beiden Mischungen wurden anschließend zusammengeführt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Lösung tröpfchenweise auf einer ca. 60%-konfluenten mIMCD-Zellkultur verteilt und für 24 Stunden inkubiert.

3.2.9 Quantifizierung der Genexpression auf transkriptioneller Ebene

3.2.9.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Zellernte und die Extraktion der RNA erfolgte unter einer Werkbank unter reinlichsten Vorkehrungen, um eine Kontamination mit RNAsen zu verhindern.

Im ersten Schritt wurden die Zellen unter Hinzugabe von 700 µl TRIzol® Reagent extrahiert und bei -80 °C gelagert. Für die RNA-Extraktion wurde das Direct-zol® RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) verwendet. Im ersten Schritt wurden 350 µl des RNA-Reagenz 350 µl TRI Reagent® hinzugefügt und bei 10.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Alle darauffolgenden Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls bei 10.000 x g für 30 Sekunden durchgeführt. Dem Überstand wurde anschließend 700 µl Ethanol beigefügt, kräftig durchmischt und in ein Collection Tube mit Zymo-Spin® IIC Column überführt. Um das RNA-Reagenz von DNA zu reinigen, wurde nach Hinzugabe von 400 µl RNA-Waschpuffer und einem Zentrifugationsschritt 5 µl DNase I und 75 µl DNA-Verdaupuffer beigemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit Direct-zol® RNA PreWash wurde 700 µl RNA-Waschpuffer hinzugefügt und für 2 Minuten zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren, wurden 25 µl DNase/RNase-freies H₂O beigemischt und anschließend zentrifugiert. Zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten RNA wurden die Proben mit einem NanoDrop photometrisch gemessen.

Für die quantitative PCR-Analyse wurde die aufbereitete RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA transkribiert. Hierzu wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet.

3.2.9.2 Quantitative PCR

Zur Quantifizierung der Genexpression von ausgewählten Genen wurde die Methode der qPCR verwendet. Bei diesem Messverfahren werden Nukleinsäuren exponentiell amplifiziert und mittels einer fluoreszierenden Substanz interkalierend markiert. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Menge der detektierten Gene und wird in das Verhältnis zu ubiquitär-exprimierten Haushaltsproteinen gesetzt.⁸⁶ In dieser Arbeit wurden die Haushaltsproteine m-HPRT und m-ACTB verwendet. Die qPCR wurde mit dem Power SYBR® Green Mastermix (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für die Reaktion wurden 8,92 µl Power SYBR® Green Mastermix, 9 µl RNase-freies H₂O und

0,08 µl Primer mit 1 µl cDNA (30 ng/µl) vermischt. Das Thermocycler-Programm wurde wie folgt eingestellt: 95 °C für 10 Minuten gefolgt von 95 °C für 15 Sekunden und 60 °C für 1 Minute für insgesamt 40 Amplifikationszyklen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm SDS RQ Manager (BioTad) nach der $\Delta\text{-}\Delta\text{-C}_t$ -Methode.

3.2.10 Massenspektrometrie (MS)

3.2.10.1 Zellernte für MS

Zur Zellgewinnung wurden für jedes Replikat drei 10 cm-Schalen der HSMP-Zelllinie mit induzierbarem aPKC^{iota}-*knockdown* sowie zwei 10 cm-Schalen der mMCD-Zelllinie mit siRNA-induziertem-*knockdown* verwendet. Die Zellen wurden mit Trypsin lysiert und anschließend mit 9 ml vorgekühltem Medium bei 1.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C herunter zentrifugiert. Es folgten zwei Waschrunde mit vorgekühltem PBS (10 ml, 1 ml), wobei der Überstand jeweils bei 1.000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert wurde. Im letzten Schritt wurde das gewonnene Zellpellet in Trockeneis mit vergällendem Alkohol (90% Ethanol) schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.10.2 Herstellung von Zelllysaten für MS

Das Zellpellet wurde in Urea-Puffer bestehend aus 8 M Urea und 50 mM Ammoniumbicarbonat und 10 µl Halt® Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail 100X (PPI) (Thermo Fisher Scientific) aufgelöst. Um die Zellen aufzubrechen, wurden die Proben anschließend für 1 Minute bei 10% sonifiziert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit für 45 Minuten und 4 °C wurde die Proteinkonzentration mit einem BCA Protein Assay Kit (Pierce) gemessen. Zur Reduktion der Proben wurden 5 mM DTT hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Proben mit 20 mM Iodacetamid (IAA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln behandelt. Je 100 µg Protein wurden im Verhältnis 1:100 mit 1 µl Trypsin verdaut. Am nächsten Tag wurde der Trypsinverdau mit 0,5% Ameisensäure (FA) gestoppt und auf einen pH-Wert unter 3 angesäuert.⁸⁷ Um die Proteine zu extrahieren, wurden Oasis HLB 1 cc Vac Cartridge 30 mg Säulen (Waters) verwendet. Jede Säule wurde zunächst mit Acetonitril (ACN) konditioniert und mit 0,1% FA equilibriert. Anschließend wurden die Proben

tröpfchenweise auf die Säulen geladen. Nach zweimaligem Waschschrift mit 0,1% FA wurden die Proben mit 0,1% FA und 50% ACN eluiert. Anschließend wurden die Proben im Speed Vac (Proteomics Core Facility Cologne) getrocknet und bis zum Phosphopeptide Enrichment bei -20 °C gelagert.

3.2.10.3 Phosphopeptide Enrichment für MS

Das Phosphopeptide Enrichment wurde durch R. Herzog (Nephrologisches Forschungslabor, Köln) unter Verwendung des High-Select® Fe-NTA Phosphopeptide Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Die lyophilisierten Peptidproben wurden hierzu in 200 µl Bindungs- und Waschpuffer durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 1.400 rpm und vortexen vollständig suspendiert. Der pH-Wert wurde mit Testpapier gemessen und ggf. mit FA 0,2% auf unter 3 gesenkt. Um die Phosphopeptide anzureichern, wurden Phosphopeptid-spezifische Harz-Säulen equilibriert. Zunächst wurde bei 1.000 x g für 30 Sekunden der Speicherpuffer abzentrifugiert. Die folgenden Zentrifugationsschritte wurden ebenfalls bei 1.000 x g für 30 Sekunden durchgeführt. Die Säulen wurden anschließend zweimalig mit 200 µl Bindungs- und Waschpuffer gereinigt und überschüssiger Puffer abzentrifugiert. Die Peptidproben wurden auf die Säulen geladen und vorsichtig mit der Quarzschicht alle 10 Minuten für insgesamt 30 Minuten Inkubationszeit suspendiert. Nachdem der Überschuss abzentrifugiert wurde, wurden die Säulen dreimalig mit 200 µl Bindungs- und Waschpuffer und einmalig mit 200 µl Pierce® Water LC-MS Grade gesäubert. Im letzten Schritt wurden zweimalig je 100 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und die Peptidproben durch Zentrifugation gewonnen. Um den Elutionspuffer zu entfernen wurden die Proben für 1 Stunde im Speed Vac (Proteomics Core Facility Cologne) bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 0,1% FA resuspendiert.

3.2.10.4 Phosphoproteomanalysen

Die nLC-MS/MS-Analyse des Phosphoproteoms wurde mit dem LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt und die Rohdaten mit MaxQuant v 1.6.11.0 in der Proteomics Core Facility Cologne analysiert.⁸⁸ Die bioinformatische Analyse wurde durch M. Höhne durchgeführt (Nephrologisches Forschungslabor,

Köln). Statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism® Version 7.05 (San Diego, CA) durchgeführt.

Zur Analyse der shRNA-aPKC^{iota}/mirNEG-Podozytenzelllinie wurden grundlegende Testkriterien ($p < 0,5$, $FC > 1,5$) und eine Falscherkennungsrate (FDR) von 0,2 sowie $s_0 = 0,1$ festgelegt. Die Enrichment Analysen nach Gene Ontology (GO)-Terms wurden für die Proteine der quantifizierten Phosphorylierungsstellen mit dem exakten Fisher-Test durchgeführt und alle mehrfachen Phosphorylierungsstellen eines Proteins auf ein Protein korrigiert. Die drei jeweils am stärksten angereicherten GO-Terms im aPKC^{iota}-*knockdown* und der Kontrolle wurden ausgewählt (Abb. 10B, 10C) und mittels Referenzdatenbanken (Mus musculus) UniProt (<https://www.uniprot.org>) und PhosphositePlus® (<https://www.phosphosite.org>)⁸⁹ sowie Microsoft Excel ausgewertet.

Bei der Analyse der klassischen Epithelzelllinie mit siRNA gegen aPKC^{iota}, wurde bei der Phosphoproteom Auswertung auf die FDR verzichtet und die Testkriterien auf $p < 0,5$ und $FC > 1,5$ eingeschränkt, da ansonsten nur eine Phosphorylierungsstelle quantifiziert worden wäre. Die Daten wurden ebenfalls mit den Referenzdatenbanken (Mus musculus) UniProt (<https://www.uniprot.org>) und PhosphositePlus® (<https://www.phosphosite.org>)⁸⁹ sowie mit Microsoft Excel analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Keine Inhibition von aPKC^{iota} durch chemische Inhibitoren ATG, ATM und PS432 in Podozytenzelllinie

Die aktuelle Studienlage beweist, dass der podozytenspezifische *knockout* von aPKC^{iota} mit schwerer glomerulärer Schädigung und vorzeitiger Letalität einhergeht, wobei die zugrunde liegenden Pathomechanismen bislang ungeklärt sind.²² In klassischen Epithelien verankert Par3A aPKC mit der Plasmamembran, während der podozytenspezifische Par3A-*knockdown* überraschenderweise keinen Phänotyp aufweist. Die in Podozyten vorherrschende Par3-Variante Par3B besitzt im Gegensatz zu Par3A keine aPKC-Bindedomäne und interagiert folglich nicht mit aPKC.²³ Um die zugrunde liegenden Mechanismen im Detail besser zu verstehen, testeten wir chemische Inhibitoren von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie, um spezifische Targets von aPKC^{iota} zu identifizieren.

In der Literatur sind verschiedene Inhibitoren (ATG, ATM, PS432) beschrieben, die anticanceröse Effekte durch Hemmung von aPKC^{iota} *in vitro* und *in vivo* von Lungenkrebszellen belegen. Da es sich um unterschiedliche Zelllinien handelt, musste zunächst überprüft werden, ob die effiziente Inhibition durch ATG, ATM und PS432 in der Podozytenzelllinie reproduziert werden kann.

Der erste getestete Inhibitor ATG ist eine Goldverbindung, der bei rheumatoider Arthritis in der klinischen Praxis bereits Anwendung findet. ATG blockiert die PB-1-Bindedomäne von aPKC^{iota} und verhindert die Interaktion zu Par6, während die Kinasedomäne von aPKC^{iota} unbeeinträchtigt bleibt.^{90,91} Durch die Blockade der PB-1-Domäne wird die Aktivierung von Rac1 verhindert und die nachgeschaltete Signalkaskade unterbrochen, die in nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) für das Tumorwachstum verantwortlich ist.^{91,92} Um zu testen, ob die Inhibition von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie reproduziert werden kann, wurden unterschiedliche Inkubationszeiträume und ATG-Konzentrationen validiert. Von den Zellkulturen wurden Lysate und Präzipitate von aPKC^{iota} hergestellt und nach SDS-Gelelektrophorese-Auftrennung mittels Western Blot auf spezifische aPKC-Phosphoserine analysiert, um die Kinaseaktivität zu überprüfen. Die Western Blot-Analysen zeigen keine Inhibition von aPKC^{iota} (Abb. 5).

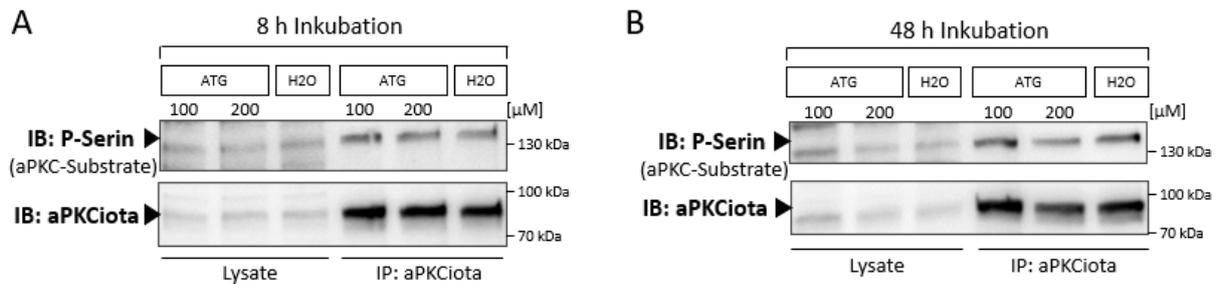


Abb. 5: Chemischer Inhibitor ATG inhibiert aPKC^{iota} in Podozytenzelllinie nicht

A Western Blot-Analyse von kultivierten Podozyten, die 8 Stunden mit ATG (100 μM, 200 μM) inkubiert wurden. Der Immunoblot zeigt keine erkennbaren Unterschiede in den Phosphoserinen (aPKC-Substrate) zwischen der Inhibition und der Kontrolle, während die Menge an aPKC^{iota} vergleichbar ist. **B** Western Blot-Ergebnisse der Podozytenzelllinie nach 48 Stunden Inkubation mit ATG (100 μM, 200 μM). Auch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden zeigt keine detektierbare Inhibition von aPKC^{iota}.

Im nächsten Schritt wurde der chemische Inhibitor ATM getestet, der hohe Ähnlichkeit zu ATG aufweist aber eine andere chemische Struktur besitzt. Neben dem klinischen Einsatz bei rheumatoider Arthritis ist ATM in Phase-I Studien bei Patienten mit Pankreas-, Lungen-, und Ovarialkrebs eingesetzt worden.⁹³ ATM blockiert die Bindungsstelle zu Par6, indem es mit Cystein in der PB1-Domäne von aPKC ein Addukt bildet.^{94,95} Um die optimalen Versuchsbedingungen zu validieren, wurden verschiedene Inkubationszeiträume und Konzentrationen von ATM getestet und mit Western Blot analysiert. Zusätzlich verwendeten wir ein PKC Kinase Activity Assay Kit, um die Kinaseaktivität noch sensitiver zu messen. Die Ergebnisse des Western Blots (Abb. 6A) und des PKC Kinase Activity Assays (Abb. 6B) zeigen keine Veränderungen in der Kinaseaktivität zwischen Inhibition mit ATM und Kontrolle.

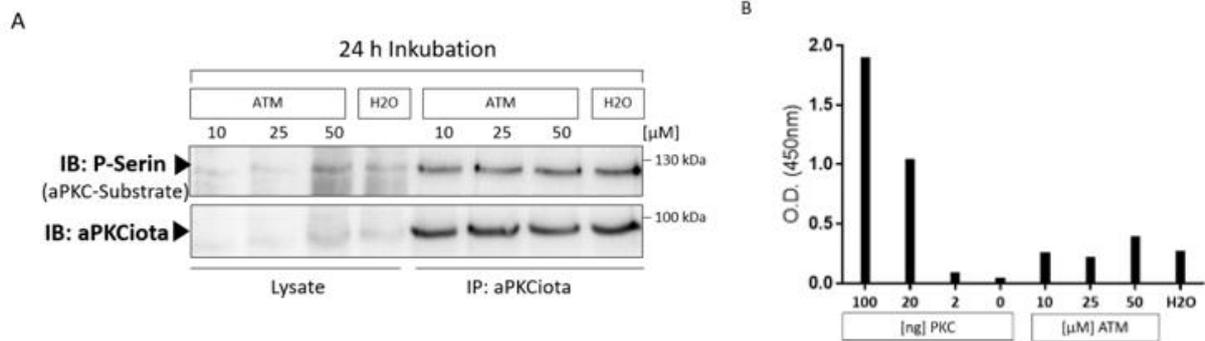


Abb. 6: Chemischer Inhibitor ATM inhibiert aPKC^{iota} in Podozytenzelllinie nicht

A Western Blot-Analyse von kultivierten Podozyten, die 24 Stunden mit ATM (10 μM, 25 μM, 50 μM) inkubiert wurden. Es sind keine Unterschiede in den Phosphoserinen zwischen Inhibition und Kontrolle erkennbar.

B Ergebnisse des PKC Kinase Activity Assays nach 48 Stunden Inkubation mit ATM. Die gemessene Kinaseaktivität unterscheidet sich nicht zwischen Inhibition und Kontrolle. Die Positivkontrolle mit aufgereinigter Proteinkinase C zeigt, dass die Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration detektiert wird.

Der dritte chemische Inhibitor PS432 ist im Gegensatz zu ATG und ATM ein allosterischer Inhibitor, der die Proliferation von NSCLC-Zellen effizienter reduziert als ATM.⁹³ PS432 bindet spezifisch an ein sogenanntes PIF-Pocket in der Kinasedomäne von aPKC und weist im Tiermodell weniger Nebeneffekte auf.⁹³ Mittels Western Blot wurden wiederum verschiedene Inkubationszeiträume und Konzentrationen von PS432 validiert (Abb. 7A) und das PKC Kinase Activity Assay analysiert (Abb. 7B). In der Western Blot-Analyse zeigen sich leichte Unterschiede in den aPKC-Phosphoserinen zwischen Inhibition und Kontrolle, was auf den unterschiedlichen Gehalt von aPKC^{iota} zurückzuführen ist (Abb. 7A). Der Immunoblot mit Tubulin, das in der Zelle ubiquitär vorhanden ist, bestätigt die abweichende Proteinmenge zwischen den Proben und belegt eine insuffiziente Inhibition durch PS432 (Abb. 7A). Im Einklang mit den Western Blot-Ergebnissen zeigt auch das PKC Kinase Activity Assay keine detektierbare Inhibition der Kinaseaktivität von aPKC^{iota} (Abb. 7B). Da die getesteten Inhibitoren ATG, ATM und PS432 sich nicht in der Podozytenzelllinie reproduzieren ließen, stoppten wir weitere Versuche mit den chemischen Inhibitoren.

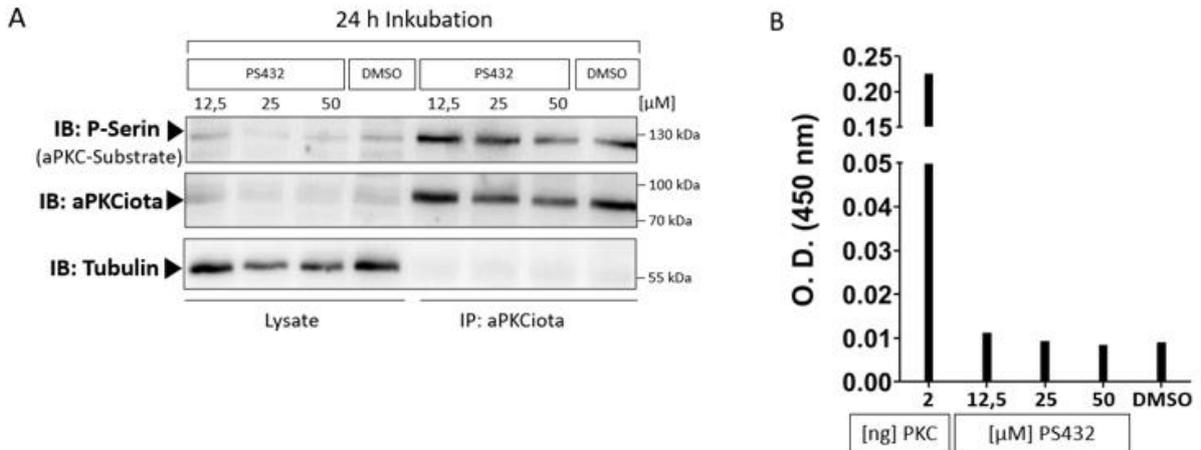


Abb. 7: Allosterischer Inhibitor PS432 inhibiert aPKC^{iota} in Podozytenzelllinie nicht

A Western Blot-Analyse einer Podozytenzelllinie, die 24 Stunden mit PS432 (12,5 μM, 25 μM, 50 μM) inkubiert wurde. Es sind leichte Unterschiede in den Phosphoserinen zwischen Inhibition und Kontrolle erkennbar, die jedoch in dem unterschiedlichen Gehalt von aPKC^{iota} begründet liegen. Dies bestätigt sich im Immunoblot mit Tubulin, dass ubiquitär in den Zellen vorhanden ist und den unterschiedlichen Zellgehalt zwischen den Proben aufzeigt. Der Western Blot belegt, dass PS432 aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie nicht inhibiert.

B Ergebnisse des PKC Kinase Activity Assays nach 24 Stunden Inkubation mit PS432. Die Kinaseaktivität von aPKC^{iota} wird durch den Inhibitor PS432 nicht inhibiert.

4.2 Herstellung und Validierung einer stabilen Podozytenzelllinie mit induzierbarem aPKC^{iota}-knockdown

Die spezifische Inhibition der Kinaseaktivität von aPKC^{iota} ließ sich in der Podozytenzelllinie nicht reproduzieren, sodass wir uns in einem zweiten Ansatz dazu entschieden, einen podozytenspezifischen *knockdown* von aPKC^{iota} zu generieren. Da der dauerhafte *knockdown* von aPKC^{iota} in kultivierten Podozyten für die Zellen letal ist, wurde eine im Nephrologischen Forschungslabor (Köln) bereits vorhandene stabile Podozytenzelllinie mit Doxycyclin induzierbarem aPKC^{iota}-*knockdown* verwendet, um die Auswirkungen der verringerten Genexpression zu untersuchen.⁸³ Der transiente *knockdown* von aPKC^{iota} wurde durch Hinzugabe von Doxycyclin induziert und die *knockdown*-Effizienz mittels Western Blot (Abb. 8A) analysiert. Die Western Blot-Ergebnisse zeigen einen deutlichen *knockdown* zwischen shRNA gegen aPKC^{iota} und

Kontrolle. Zur Quantifizierung der *knockdown*-Effizienz auf transkriptioneller Ebene wurde RNA aus der Podozytenzelllinie isoliert, in cDNA revers transkribiert und mittels qPCR-Verfahren (Abb. 8B) gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine Restexpression von aPKC^{iota} in Zellen mit shRNA gegen aPKC^{iota} von 10% gemessen.

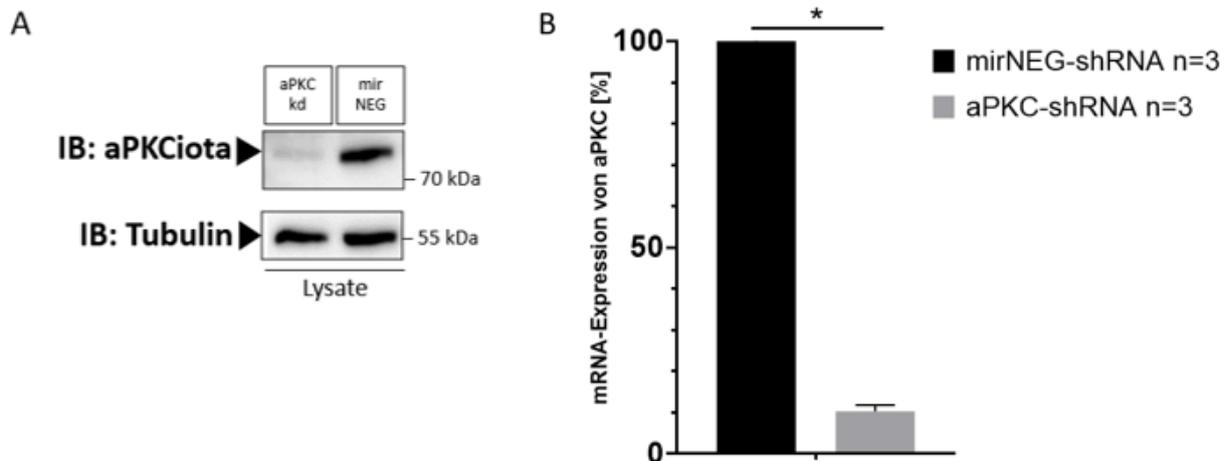


Abb. 8: Validierung der *knockdown*-Effizienz von aPKC^{iota} in stabiler Podozytenzelllinie mit shRNA gegen aPKC^{iota}/mirNEG und Tet-On System

A Western Blot-Analyse einer Podozytenzelllinie nach Doxycyclin-induziertem *knockdown* von aPKC^{iota}. Der Immunoblot zeigt einen effizienten *knockdown* von aPKC^{iota} im Vergleich zur Kontrolle mit mirNEG bei vergleichbarem Zellgehalt.

B Ergebnisse der qPCR nach Doxycyclin induziertem *knockdown* von aPKC^{iota} (n=3). Der abhängige Students t-test wurde angewendet, um die aPKC^{iota}-Expression in der stabilen Podozytenzelllinie mit shRNA gegen aPKC^{iota} und mirNEG zu vergleichen. Die noch vorhandene aPKC^{iota}-Expression hat sich in der stabilen Podozytenzelllinie auf 10% im Vergleich zur mirNeg-Kontrolle vermindert. *Zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen an (p<0,05).

4.3 Identifikation neuer aPKC^{iota}-Targets in Podozytenzelllinie mittels massenspektrometrischer Analyse

Die aktuelle Studienlage beweist, dass aPKC^{iota} für die Podozytenarchitektur und die Integrität des Nierenfilters unerlässlich ist.²² Da die zugrunde liegenden Mechanismen bislang ungeklärt sind, wurden die Phosphorylierungsmuster der aPKC^{iota}-*knockdown*

Podozytenzelllinie mit der Kontrolle verglichen, um neue Targets von aPKC^{iota} zu identifizieren. Zur Detektion neuer aPKC^{iota}-Targets wurde das Phosphoproteom der zuvor generierten Podozytenzelllinie shRNA aPKC^{iota}/mirNEG mit nLC-MS/MS gemessen und die erhobenen Daten durch M. Höhne (Nephrologisches Forschungslabor, Köln) bioinformatisch analysiert. Um die Phosphorylierungsmuster zwischen den Gruppen zu vergleichen, wurden 70 % der gültigen Werte, die mindestens in der aPKC^{iota}-*knockdown*- oder der Kontrollgruppe gemessen wurden, in die Analyse miteinbezogen (Abb. 9, FDR=0,2, s0=0,1). Die hierarchische Clusteranalyse zeigt eine klare Separation des Phosphoproteoms zwischen den aPKC^{iota}-*knockdown*-Proben und den Kontrollproben (Abb. 9A). In der Heatmap nach Z-Score Normierung wird im Unterschied hierzu die Abweichung vom Mittelwert standardisiert dargestellt und zeigt die differenziell regulierten Phosphosites zwischen shRNA aPKC^{iota} und Kontrolle. Insgesamt wurden 15.420 Phosphorylierungsstellen in 3.943 Proteinen gemessen, wovon 966 differenziell reguliert waren (Abb. 9C, 9D). Insgesamt 536 Phosphorylierungsstellen wurden im *knockdown* im Vergleich zur Kontrolle weniger gemessen. Die Anzahl der Proteine und damit potenziellen Targets von aPKC^{iota} liegt mit 383 deutlich darunter, da ein Protein an multiplen Phosphosites phosphoryliert werden kann. Die vermindert phosphorylierten Proteine sind vermutlich aPKC^{iota}-Targets oder Bestandteil einer nachgeschalteten Signalkaskade, die durch den *knockdown* von aPKC^{iota} unterbrochen wird. Im Gegensatz hierzu sind 430 Phosphorylierungsstellen im *knockdown* im Vergleich zur Kontrolle zusätzlich gemessen worden. Die vermehrt nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen wurden in Summe bei 325 Proteinen detektiert und deuten auf einen Kompensationsmechanismus in der Abwesenheit von aPKC^{iota} hin.

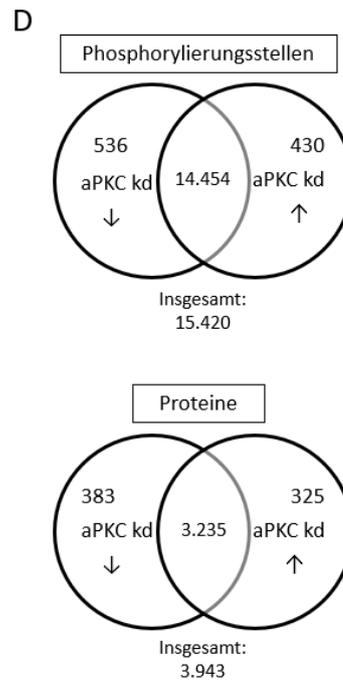
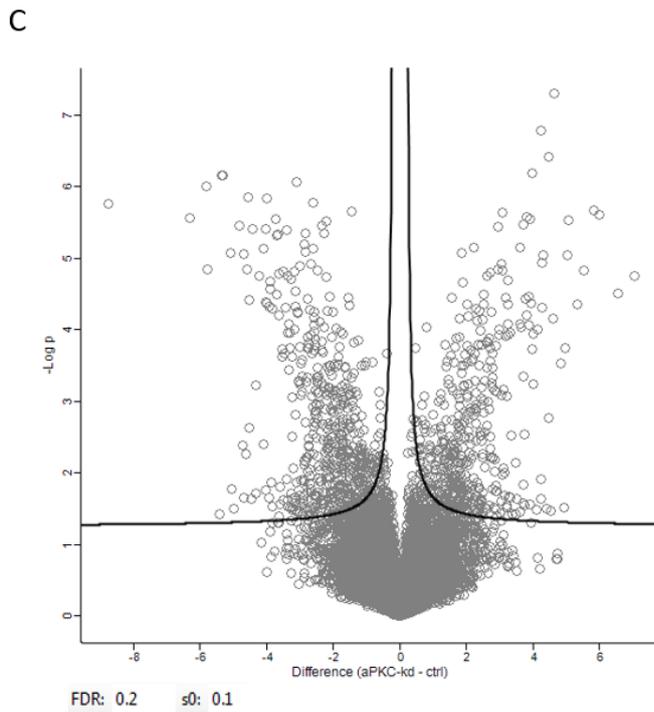
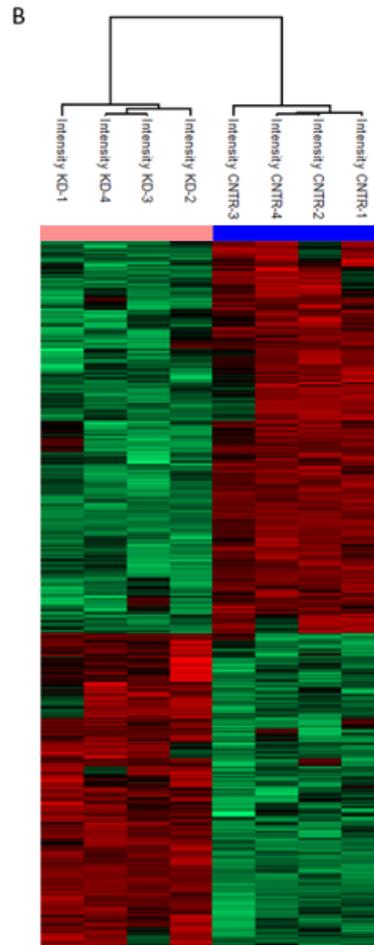
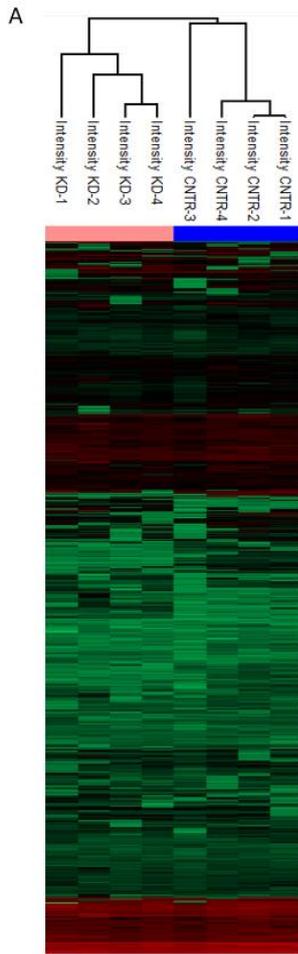


Abb. 9: Identifikation neuer aPKC^{iota}-Targets mittels massenspektrometrischer Analyse in Podozytenzelllinie

A Heatmap der aPKC^{iota}-*knockdown* Podozytenzelllinie im Vergleich zur Kontrolle (n=4). Die hierarchische Clusteranalyse zeigt eine deutliche Clusterbildung der Proben (Spalten) und der Phosphosites (Zeilen) zwischen *knockdown* und Kontrolle.

B Heatmap mit Z-Score Normierung zwischen aPKC^{iota}-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle. Der Z-Score differenziert standardisiert nach den Abweichungen vom Mittelwert, und zeigt die signifikant differenziell regulierten Phosphosites zwischen shRNA aPKC^{iota} und Kontrolle.

C Vulkanplot des Phosphoproteoms der shRNA-aPKC^{iota}/mirNEG-Podozytenzelllinie mit 70% gültiger Werte in mindestens einer der beiden Gruppen (*knockdown*- und Kontrollgruppe) (FDR=0,2, s0=0,1). Jeder Punkt im Vulkanplot repräsentiert eine Phosphorylierungsstelle. Der negative dekadische Logarithmus von jeder Phosphorylierungsstelle ist in Bezug zur Fold Change dargestellt ($p < 0,5$, FC > 1,5).

D Venn-Diagramme des Phosphoproteoms. Insgesamt wurden 15.420 Phosphorylierungsstellen in 3.943 Proteinen detektiert. 536 Phosphorylierungsstellen von insgesamt 383 Proteinen wurden weniger und 430 Phosphorylierungsstellen von insgesamt 325 Proteinen wurden mehr im aPKC^{iota}-*knockdown* gemessen.

Um das gemessene Phosphoproteom näher zu klassifizieren, wurde eine Enrichment-Analyse der differenziell regulierten Phosphorylierungsstellen im aPKC^{iota}-*knockdown* durchgeführt. Hierzu wurde der exakte Fisher-Test mit dem binären Logarithmus des Enrichment Faktors angewendet, um die signifikant erhöhten oder verminderten Gene Ontology (GO)-Terms im aPKC^{iota}-*knockdown* zu identifizieren (Abb. 10, FDR=0,2, s0=0,1). Die Enrichment Analyse wurde für assoziierte Terms pro Protein und nicht pro Phosphorylierungsstelle durchgeführt. Diese Vorgehensweise korrigiert die Tatsache, dass ein Protein multiple Phosphorylierungsstellen besitzen kann und das Ergebnis bei Mehrfachzählungen für einen Term verfälschen würde. Die Enrichment Analyse ergab, dass von den GO-Terms keine GO-Molecular Function (GOMF)- oder GO-Biological Process (GOBP)-Terms, sondern nur GO-Cellular Component (GOCC)-Terms angereichert sind.

Die vermindert nachgewiesenen Proteine/Phosphorylierungsstellen im *knockdown* (aPKC kd↓) im Vergleich zur Kontrolle sind potenzielle Targets von aPKC^{iota} oder einer nachgeschalteten Signalkaskade (in blau dargestellt, Abb. 10A, 10B). Insbesondere Proteine, die mit dem Chromosom (repräsentiert durch den GOCC-Term kondensiertes Kernchromosom), Aktinzytoskelett (GOCC-Term Stressfaser) sowie

Zellkontakten (GOCC-Term Zell-Zell Adherens Junction) assoziiert sind, sind in dieser Gruppe verstärkt vertreten (Abb. 10B).

Die im *knockdown* vermehrt nachgewiesenen Proteine/Phosphorylierungsstellen (aPKC kd \uparrow) im Vergleich zur Kontrolle könnten auf einen Kompensationsmechanismus in der Abwesenheit von aPKC^{iota} hindeuten (in grün dargestellt, Abb. 10A, 10C). In dieser Gruppe sind Proteine, die mit Zellkontakten (GOCC-Term Tight Junction) und dem basalen Anteil der Zelle (GOCC-Term basolaterale Plasmamembran) verbunden sind häufiger vertreten als in der Kontrollgruppe (Abb. 10C).

Proteine, die als integraler Bestandteil der Membran (in aPKC kd \uparrow GOCC-Term integraler Bestandteil der Plasmamembran) fungieren, sind in der vermehrt phosphorylierten Gruppe verstärkt vertreten. Interessanterweise sind hingegen Proteine, die in der vermindert phosphorylierten Gruppe mit diesem Term verknüpft sind (in aPKC kd \downarrow GOCC-Term integrale Komponente der Membran) in der Enrichment Analyse weniger vertreten (Abb. 10B, 10C). Die diesem Term zugeordneten Proteine sind auffallend häufig Transportproteine und Cadherine. Das Membranprotein Protocadherin-1 ist in beiden beschriebenen Gruppen (aPKC kd \uparrow , aPKC kd \downarrow) vertreten und mit Zelladhäsion assoziiert.^{96,97}

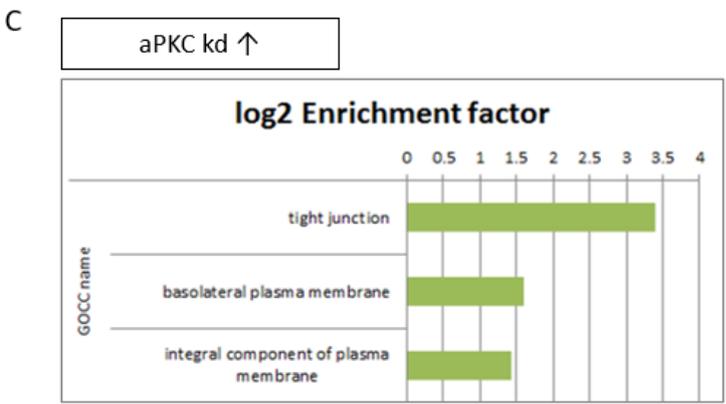
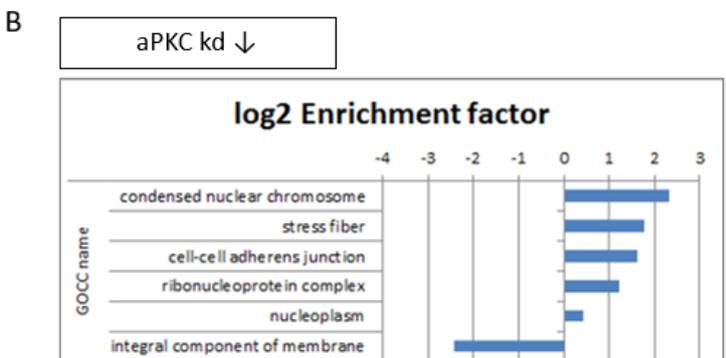
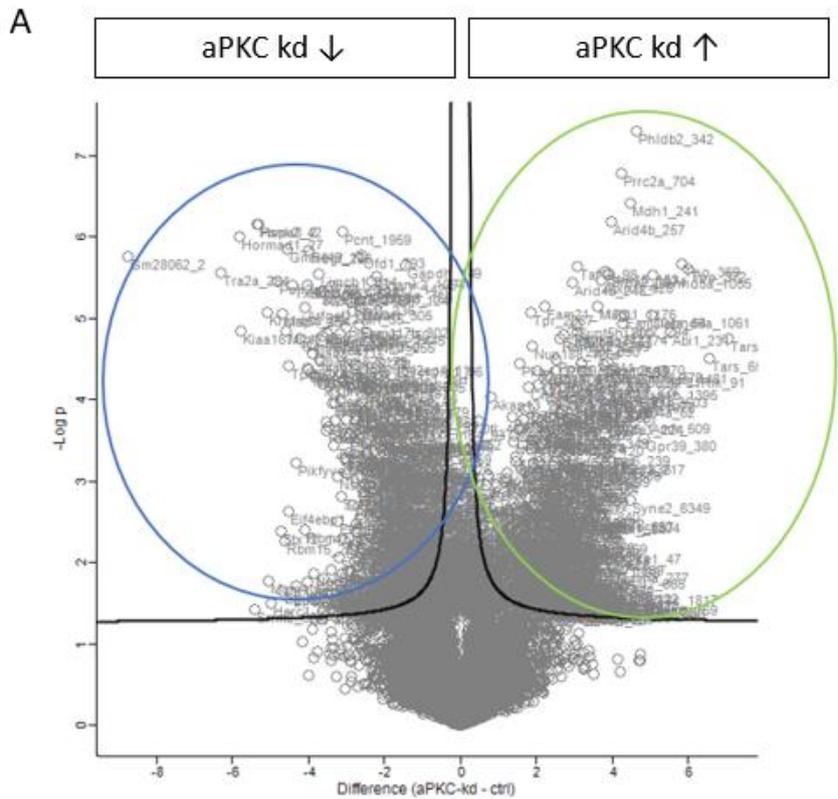


Abb. 10: Enrichment Analyse nach GO-Terms mit dem exakten Fisher-Test in Podozytenzelllinie

A Enrichment Analyse nach GO-Terms. Anwendung des exakten Fisher-Tests mit dem binären Logarithmus des Enrichment Faktors (FDR=0,2, s0=0,1). Die Auswertung ergab, dass nur GOCC-Terms und keine GOMF- oder GOBP-Terms angereichert sind.

B Enrichment Analyse der Proteine, deren Phosphorylierungsstellen im aPKC^{iota}-*knockdown* vermindert nachgewiesen wurden (blau dargestellt, FDR=0,2, s0=0,1). Die GOCC-Terms kondensiertes Kernchromosom, Stressfasern, Zell-Zell Adherens Junction, Ribonukleoproteine und Kernplasma sind in dieser Gruppe verstärkt vertreten. Der GOCC-Term integrale Komponente der Membran ist seltener vorhanden, als dies bei einer Normalverteilung zu erwarten wäre.

C Enrichment Analyse der Proteine, deren Phosphorylierungsstellen im aPKC^{iota}-*knockdown* vermehrt nachgewiesen wurden (grün dargestellt, FDR=0,2, s0=0,1). Die GOCC-Terms Tight Junction, basolaterale Plasmamembran und integrale Komponente der Plasmamembran sind hier verstärkt repräsentiert.

Insgesamt sind 22 Proteine den angereicherten GOCC-Terms kondensiertes Kernchromosom, Stressfasern und Zell-Zell Adherens Junction zugeordnet, die als mögliche Targets von aPKC^{iota} oder einer nachgeschalteten Signalkaskade identifiziert werden konnten. Die Proteine sind in der Literatur bislang nicht als Substrate von aPKC^{iota} beschrieben. Die Proteine Gamma-adducin (Add3)⁹⁸ und ZO-1⁹⁹ werden als Targets von Protein Kinase C (PKC) in der Literatur angeführt, ohne jedoch die Isoform von PKC näher zu spezifizieren. 25 Proteine hingegen sind als potenzieller Kompensationsmechanismus in der Abwesenheit von aPKC^{iota} vermehrt nachgewiesen worden und unter den GOCC-Terms Tight Junction, basolaterale Plasmamembran und integraler Bestandteil der Plasmamembran vertreten.

Insgesamt 14 interessante Kandidaten der genannten GOCC-Terms wurden im nächsten Schritt im Phosphoproteom-Datensatz auf weitere Phosphorylierungsstellen überprüft. Im aPKC^{iota}-*knockdown* wurden vier Proteine (MICAL-like protein 2 (Micall2), Synpo, LIM domain and actin-binding protein 1 (Lima1), Protein NDRG1 (NdrG1)) an multiplen Phosphorylierungsstellen vermindert nachgewiesen, während sechs Proteine (Synpo, Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog (Arvcf), NdrG1, ZO-1, Plakophilin-4 (Pkp4), Zonula occludens protein 2 (ZO-2)) an verschiedenen Phosphosites differenziell reguliert sind (Abb. 11, Tab. 14). Interessanterweise ist Synaptopodin an der Aminosäureposition 828 Serin im aPKC^{iota}-*knockdown* sowohl vermindert als auch vermehrt phosphoryliert

nachgewiesen worden. In der vermindert detektierten Phosphorylierungsstelle 828 Serin liegt eine Multiplicity von zwei vor, während die vermehrt nachgewiesene Phosphorylierungsstelle eine Multiplicity von drei aufweist (Tab. 14). Die Multiplicity berücksichtigt die Tatsache, dass ein Protein mit identischer Aminosäuresequenz unterschiedliche Phosphorylierungsmuster besitzen kann. Die unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster sind ein zusätzlicher Regulationsmechanismus innerhalb des Zellnetzwerkes, da Proteine durch Phosphorylierung spezifischer Phosphosites aktiviert oder inaktiviert werden können.

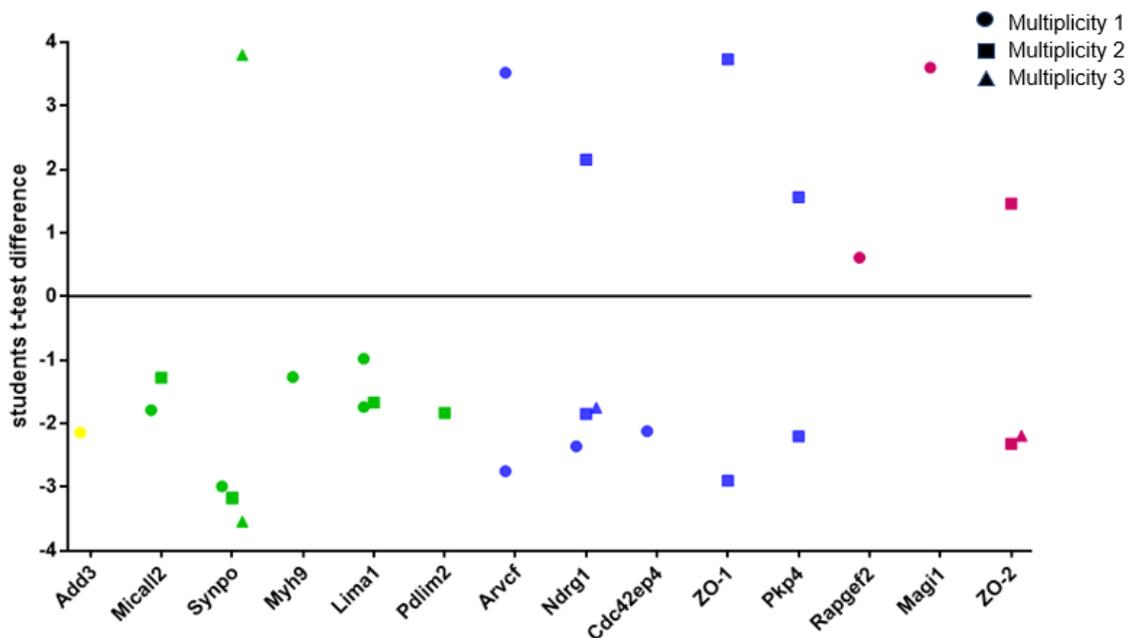


Abb. 11: Phosphorylierungsstellen interessanter Proteine der Enrichment Analyse in Podozytenzelllinie

Students t-test difference der Phosphorylierungsstellen interessanter Proteine, die mit den angereicherten GOCC-Terms (s. Abb. 10) assoziiert sind (gelb=kondensiertes Kernchromosom, grün=Stressfasern, blau=Zell-Zell Adherens Junction, magenta=Tight Junction). Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Phosphorylierungsstelle, wobei zu unterscheiden ist, ob ein Peptid bereits ein- oder mehrfach phosphoryliert vorliegt (repräsentiert durch die Multiplicity).

Tab. 14: Phosphosites interessanter Proteine aus der Enrichment Analyse in Podozytenzelllinie

Gen	Protein	Phosphosite	Multiplicity	Students t-test difference
Add3	Gamma-adducin	423	1	-2,14
Micall2	MICAL-like protein 2	67	1	-1,79
		572	2	-1,28
Synpo	Synaptopodin	521	1	-2,99
		824	2 /3	-3,16 /-3,54
		828	2 /3	-3,18 /3,8
Myh9	Myosin-9	1.170	1	-1,27
Lima1	LIM domain and actin-binding protein 1	15	1	-0,98
		371	2	-1,67
		609	1	-1,74
Pdlim2	PDZ and LIM domain protein 2	210	2	-1,83
Arvcf	Armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome homolog	267	1	3,52
		345	1	-2,75
Ndrg1	Protein NDRG1	328	2	-1,85
		332	1	-2,36
		335	3	-1,75
		340	2	2,15
Cdc42ep4	Cdc42 effector protein 4	11	1	-2,12
ZO-1	Tight junction protein ZO-1	313	2	3,73
		320	2	-2,90
Pkp4	Plakophilin-4	326	2	1,56
		336	2	-2,20
Rapgef2	Rap guanine nucleotide exchange factor 2	583	1	0,61
Magi1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	1.176	1	3,60
ZO-2	Tight junction protein ZO-2	147	2	1,46
		412	2/3	-2,32 /-2,19

Tabelle mit 14 Proteinen der Phosphosites, die im *knockdown* der Podozytenzelllinie differenziell reguliert sind unter Berücksichtigung der Multiplicity.

4.4 Generierung eines aPKC^{iota}-*knockdown* in Sammelrohrzellen mittels siRNA

Klassische Epithelien sind untereinander durch Tight und Adherens Junction verbunden. Podozyten bilden hingegen nur einen Zell-Zellkontakt aus, die Schlitzmembran, die sowohl Charakteristika von Tight als auch von Adherens Junction repräsentiert.^{11,19} Die strukturellen Unterschiede legen nahe, dass die drei

Hauptpolaritätskomplexe Par-, Scribble- und Crumbs-Komplex vermutlich stärker miteinander interagieren als in klassischen Epithelien.⁹ Die aktuelle Studienlage belegt zudem die elementare Bedeutung von aPKC^{iota} für die einzigartige Podozytenmorphologie und Integrität des Nierenfilters.^{22,67} Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass aPKC^{iota} in Podozyten im Gegensatz zu klassischen Epithelien nicht durch Par3A im Par-Komplex konserviert wird.⁹ Um die zugrunde liegenden Unterschiede zu quantifizieren, wurde zusätzlich zum Doxycyclin induzierbaren aPKC^{iota}-*knockdown* in der Podozytenzelllinie ein aPKC^{iota}-spezifischer *knockdown* in einer mIMCD-Zelllinie mittels transienter RNA-Interferenz induziert. Bei mIMCD-Zellen handelt es sich um klassische Epithelzellen aus dem Sammelrohr der Niere. Um den *knockdown* zu generieren, wurden die Sammelrohrzellen mit ON-TARGET^{plus} SMARTpool siRNA (Dharmacon) transfiziert. Die verwendete siRNA interferiert spezifisch mit der mRNA von aPKC^{iota} und verhindert die Translation in ein funktionsfähiges Protein. Als Kontrolle wurde zusätzlich unspezifische ON-TARGET^{plus} Non-targeting siRNA (Dharmacon) verwendet, um potenzielle Nebeneffekte zu identifizieren. Um die höchstmögliche *knockdown*-Effizienz zu ermitteln, wurden verschiedene Inkubationszeiträume mittels Western Blot validiert. Die Western Blot-Analyse zeigt einen deutlichen *knockdown* der Sammelrohrzelllinie, die mit spezifischer aPKC^{iota}-siRNA inkubiert wurden (Abb. 12). Da bereits ab 24 h ein effizienter *knockdown* erzielt wurde, legten wir diesen Inkubationszeitraum für die darauffolgende massenspektrometrische Analyse fest.

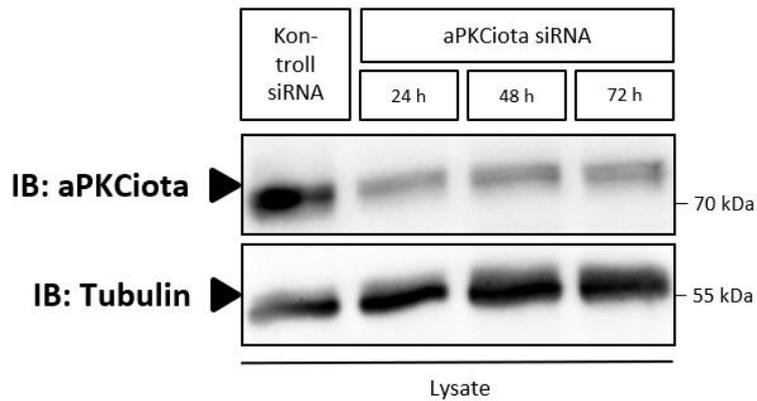


Abb. 12: Validierung der *knockdown*-Effizienz in Sammelrohrzelllinie mit siRNA gegen aPKC^{iota} und ungerichteter siRNA (Kontrolle)

Western Blot-Analyse zur Validierung der höchsten *knockdown*-Effizienz mit ungerichteter siRNA (5 µM, Inkubation für 24 h) im Vergleich zu aPKC^{iota}-siRNA (5 µM, Inkubation für 24 h, 48 h und 72 h). In allen Inkubationszeiträumen ist die Bande für aPKC^{iota} deutlich reduziert.

4.5 Keine signifikanten aPKC^{iota}-Targets durch massenspektrometrische Analyse in Sammelrohrzellen mit analogen Testgütekriterien

Zur Identifikation von aPKC^{iota}-Targets in der mit aPKC^{iota}- und ungerichteter siRNA inkubierten Sammelrohrzelllinie wurde das Phosphoproteom mit nLC-MS/MS analog zu zuvor gemessen. Die erhobenen Daten wurden durch M. Höhne (Nephrologisches Forschungslabor, Köln) bioinformatisch analysiert. Im Gegensatz zur MS-Analyse der aPKC^{iota}-*knockdown* Podozytenzelllinie wurde in dieser Analyse auf die FDR verzichtet, da ansonsten nur eine Phosphorylierungsstelle im Datensatz quantifiziert worden wäre. Die massenspektrometrischen Ergebnisse wurden mit weniger stringenten Testgütekriterien ($p < 0,5$, $FC > 1,5$) analysiert und die differenziell regulierten Proteine/Phosphorylierungsstellen ausgewertet. Aufgrund der abweichenden Testgütekriterien wurden die beiden MS-Analysen der Podozytenzelllinie und der Sammelrohrzelllinie nicht wie ursprünglich vorgesehen verglichen.

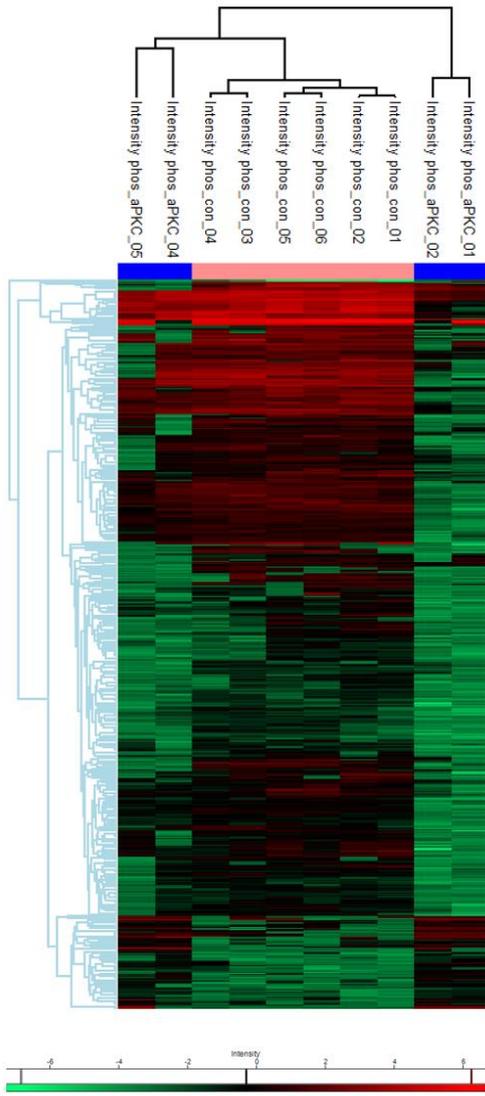
In die Auswertung wurden 66% der gültigen Werte, die mindestens in der siRNA aPKC^{iota}-*knockdown*- oder der Kontrollgruppe gemessen wurden, miteinbezogen

(Abb. 13, $p < 0,5$, $FC > 1,5$). Die hierarchische Clusteranalyse zeigt eine Gruppierung der Kontrollgruppen und eine Separation innerhalb der aPKC^{iota}-siRNA Proben in zwei Cluster (Abb. 13A). Die Heatmap mit Z-Score Normierung stellt die Abweichung vom Mittelwert der gemessenen Proben dar (Abb. 13B). Insgesamt wurden 17.632 Phosphorylierungsstellen gemessen, wovon 76 mehr und 505 Phosphorylierungsstellen weniger im siRNA-aPKC^{iota}-*knockdown* gemessen wurden (Abb. 13 C, 13D). Wie zuvor beschrieben sind die im *knockdown* vermindert detektierten Phosphorylierungsstellen potenzielle Targets von aPKC^{iota} oder einer nachgeschalteten Signalkaskade. Die vermehrt nachgewiesenen Phosphorylierungsstellen deuten hingegen auf einen Kompensationsmechanismus nach Ausschaltung von aPKC^{iota} hin.

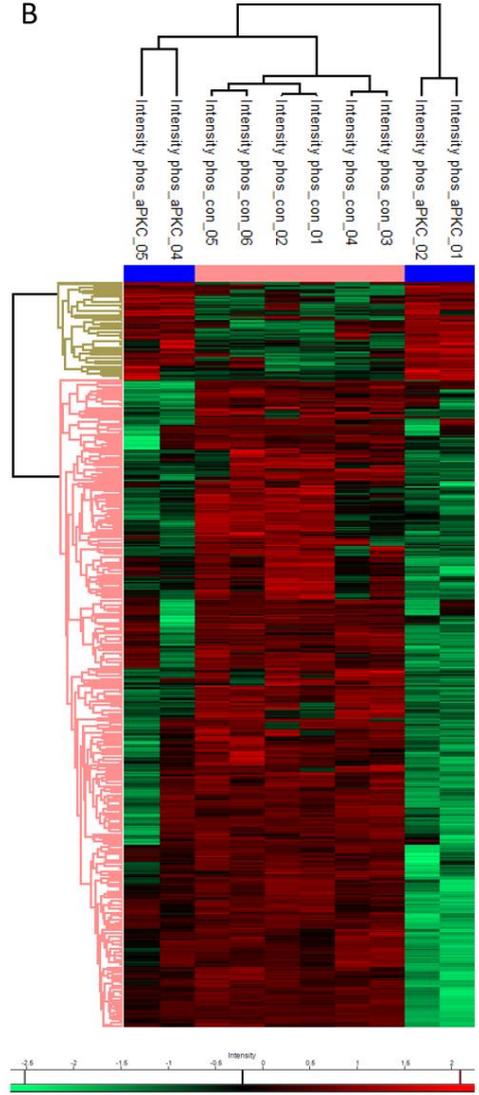
Im nächsten Schritt wurde eine Enrichment-Analyse der differenziell regulierten Phosphorylierungsstellen durchgeführt, um das detektierte Phosphoproteom zu kategorisieren. Der exakte Fisher-Test wurde angewendet, um zu überprüfen, ob bestimmte Annotationskategorien signifikant unter- oder überrepräsentiert sind. Im Unterschied zur Enrichment-Analyse der aPKC^{iota}-*knockdown* Podozytenzelllinie wurden keine GO-Terms, sondern nur Motive der Kinase in der vermehrt (dargestellt in orange) oder vermindert phosphorylierten (dargestellt in blau) Gruppe verstärkt nachgewiesen (Abb. 13E).

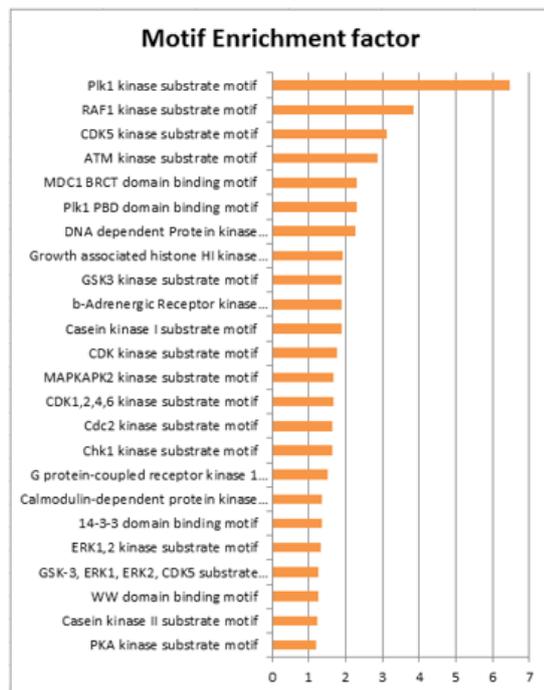
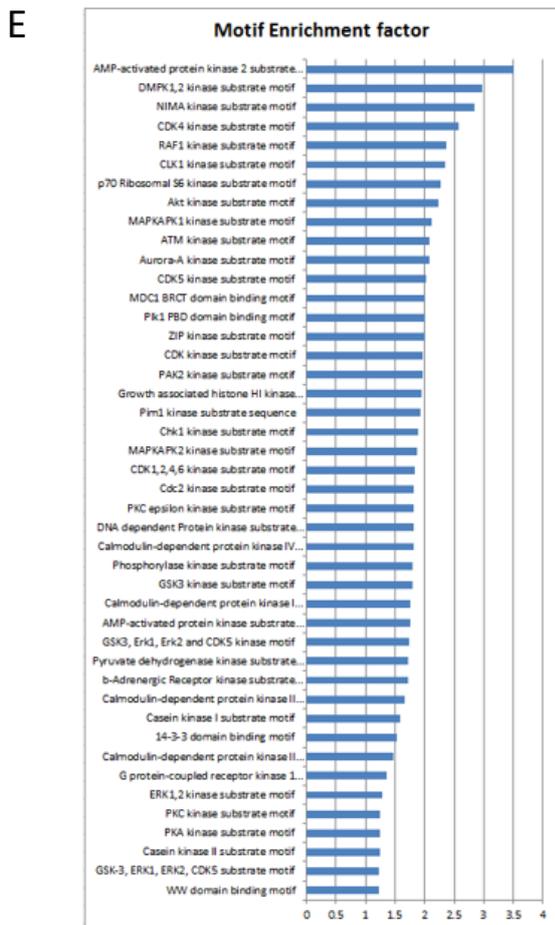
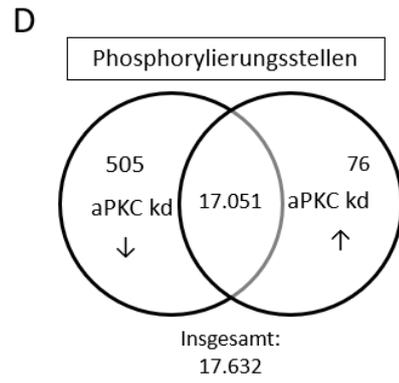
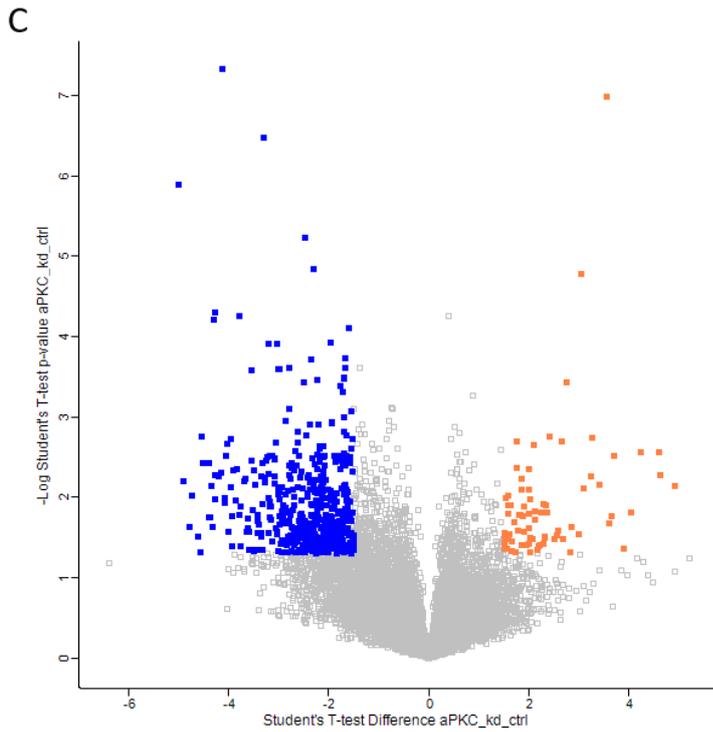
Zuletzt wurden 14 interessante Proteine identifiziert, die im Datensatz differenziell reguliert sind und mit Tight Junction (ZO-1, ZO-2, Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (Magi1)), dem Aktinzytoskelett (Pdlim2, Cdc42ep4, Rho-associated protein kinase 1 (Rock1), Myosin phosphatase Rho-interacting protein (Mrip), Talin-1 (Tln1), Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma (Cdc42bpg), Myosin light chain kinase, smooth muscle (Mylk), Rho guanine nucleotide exchange factor 17 (Arhgef17), Misshapen-like kinase 1 (Mink1)) und Zellpolarität (Scribble, Prkci) assoziiert sind (Abb. 13, Tab. 15). Die Proteine wurden auf weitere differenziell regulierte Phosphorylierungsstellen und die Multiplicity überprüft, die die Tatsache berücksichtigt, dass ein Peptid ein- oder mehrfach phosphoryliert vorliegen kann. Die Proteine Pdlim2, Cdc42bpg, ZO-1, ZO-2, Magi1 und Prkci sind in der Phosphoproteomanalyse der Podozytenzelllinie ebenfalls differenziell reguliert, aufgrund der unterschiedlichen Testgütekriterien sind diese Überschneidungen jedoch mit Vorbehalt zu betrachten und seien an dieser Stelle nur erwähnt.

A



B





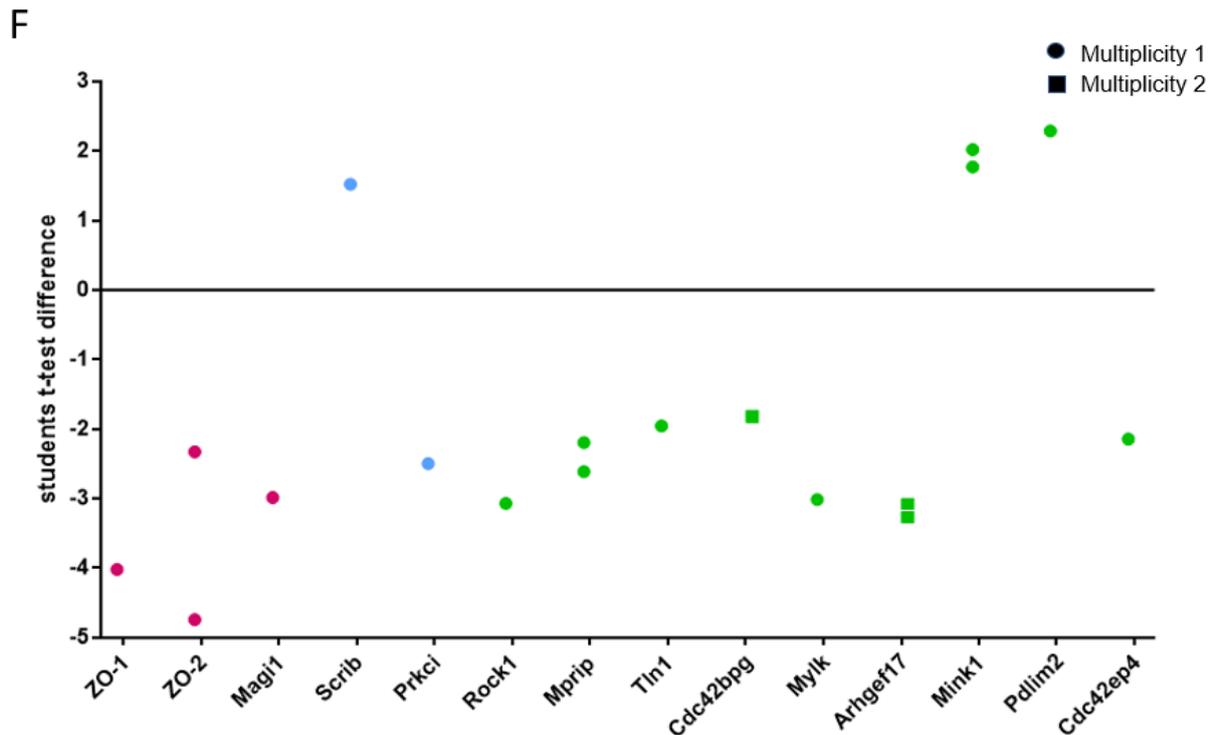


Abb. 13: aPKC^{iota}-Targets in Sammelrohrzelllinie mittels massenspektrometrischer Analyse

A Heatmap der siRNA aPKC^{iota}-*knockdown* Sammelrohrzelllinie (n=4) im Vergleich zur Kontrolle (n=6). Die hierarchische Clusteranalyse zeigt eine Clusterbildung der Kontrollproben und eine Separation der *knockdown*-Proben.

B Heatmap mit Z-Score Normierung zwischen aPKC^{iota}-*knockdown* im Vergleich zur Kontrolle. Die Abweichungen vom Mittelwert werden durch den Z-Score standardisiert dargestellt und zeigen eine Clusterbildung der Kontrollproben sowie eine Separation innerhalb der siRNA-aPKC^{iota}-Proben.

C Vulkanplot des Phosphoproteoms der siRNA-aPKC^{iota}/Kontrolle Sammelrohrzelllinie mit 66% gültiger Werte in mindestens einer der beiden Gruppen (*knockdown*- und Kontrollgruppe). Jeder Punkt im Vulkanplot repräsentiert eine Phosphorylierungsstelle. Der negative dekadische Logarithmus von jeder Phosphorylierungsstelle ist in Bezug zur Fold Change dargestellt ($p < 0,5$, $FC > 1,5$).

D Venn-Diagramme des Phosphoproteoms. Insgesamt wurden 17.632 Phosphorylierungsstellen detektiert, wovon 505 weniger und 76 Phosphorylierungsstellen mehr im aPKC^{iota}-*knockdown* gemessen wurden.

E Enrichment-Analyse mit dem exakten Fisher-Test. In blau dargestellt sind die Motive der Kinase, die in der vermindert nachgewiesenen *knockdown*-Gruppe angereicht sind. In orange sind hingegen die angereicherten Motive der Kinase aufgelistet, die im *knockdown* vermehrt detektiert wurden. Im Unterschied zur aPKC^{iota}-*knockdown* Podozytenzelllinie sind keine GO-Terms verstärkt repräsentiert.

F Students t-test difference der Phosphorylierungsstellen interessanter Proteine (magenta=Tight Junction, hellblau=Zellpolarität, grün=Aktinzytoskelett). Jeder Datenpunkt repräsentiert eine Phosphorylierungsstelle, wobei zu unterscheiden ist, ob ein Peptid bereits ein- oder mehrfach phosphoryliert vorliegt (repräsentiert durch die Multiplicity).

Tab. 15: Phosphosites interessanter Proteine in Sammelrohrzelllinie

Gen	Protein	Phosphosite	Multiplicity	Students t-test difference
ZO-1	Tight junction protein ZO-1	175	1	-4,021
ZO-2	Tight junction protein ZO-2	421	1	-2,329
		960	1	-4,742
Magi1	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1	1.359	1	-2,986
Srib	Scribble	735	1	1,521
Prki	Protein kinase C iota type	563	1	-2,497
Rock1	Rho-associated protein kinase 1	1.341	1	-3,069
Mprip	Myosin phosphatase Rho-interacting protein	270	1	-2,613
		502	1	-2,193
Tln1	Talin-1	1.641	1	-1,956
Cdc42bpg	Serine/threonine-protein kinase MRCK gamma	1.514	2	-1,819
Mylk	Myosin light chain kinase, smooth muscle	611	1	-3,015
Arhgef17	Rho guanine nucleotide exchange factor 17	1.711	2	-3,259
		1.714	2	-3,086
Mink1	Misshapen-like kinase 1	784	1	1,769
		920	1	2,019
Pdlim2	PDZ and LIM domain protein 2	199	1	2,289
Cdc42ep4	Cdc42 effector protein 4	140	1	-2,145

Tabelle mit 14 Proteinen der Phosphosites, die im *knockdown* der Sammelrohrzelllinie differenziell reguliert sind unter Berücksichtigung der Multiplicity.

5. Diskussion

5.1 Potenzielle Targets von aPKC^{iota} in Podozytenzelllinie

Forschungen der letzten Jahre konnten aPKC^{iota} als essenzielles Polaritätsprotein für die Integrität der Podozytenmorphologie und die Funktionalität des Nierenfilters identifizieren.^{22,67} In klassischen Epithelien wird aPKC durch das Gerüstprotein Par3A mit der Plasmamembran verbunden, während der podozytenspezifische *knockout* von Par3A überraschenderweise phänotypisch unauffällig bleibt.⁹ Die in Podozyten vorherrschende Par3-Variante Par3B besitzt darüber hinaus keine aPKC-Bindedomäne. Die Resultate führten zur Zielsetzung dieser Arbeit, bislang unbekannte Targets von aPKC^{iota} in Podozyten zu identifizieren und mit den aPKC^{iota}-Targets in klassischen Epithelien zu vergleichen.

Neben der elementaren Bedeutung für die glomeruläre Filtrationsbarriere ist aPKC Gegenstand intensiver Forschung in der Onkologie. Die Kinase aPKC ist in den meisten soliden Tumoren überexprimiert im Vergleich zum Normalgewebe¹⁰⁰ und Ausgangspunkt verschiedener Signalwege, die zum unkontrollierten Tumorwachstum beitragen.^{91,95} Stallings-Mann und Kollegen (2006) konnten *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten in NSCLC-Zellen zeigen, dass ATG und ATM durch Blockade der PB1-Domäne die Interaktion zwischen aPKC^{iota} und dem Adaptermolekül Par6 inhibiert.⁹¹ Die Par6 vermittelte Aktivierung von Rac1 durch aPKC^{iota} wird somit unterbrochen und das Tumorwachstum gehemmt.⁹¹ Arencibia und Kollegen (2017) entwickelten darüber hinaus den allosterischen Inhibitor PS432, der an das PIF-Pocket in der Kinasedomäne von aPKC^{iota} bindet und somit das Tumorwachstum inhibiert.⁹³ In der Podozytenzelllinie konnte keine Inhibition der Kinaseaktivität von aPKC^{iota} durch ATG, ATM oder PS432 reproduziert werden.

In NSCLC-Zellen führt der durch ATG und ATM herbeigeführte Interaktionsverlust zwischen aPKC und Par6 zur Inhibition von aPKC.^{91,95} Die Blockade der nachgeschalteten Rac1-Pak-Mek-Erk-Signalkaskade erfasst nur einen Teil der aPKC-Kinaseaktivität, da nicht die Kinasedomäne, sondern lediglich die PB1-Domäne inhibiert wird.⁹¹ Darüber hinaus belegt die aktuelle Studienlage, dass aPKC Gewebespezifische Funktionen erfüllt,¹⁰⁰ was die Übertragbarkeit zwischen verschiedenen Zelllinien herabsetzen könnte. In Tumorzelllinien ist aPKC zudem überexprimiert im Vergleich zum Normalgewebe.¹⁰⁰ Aktuell laufende Studien legen nahe, dass Lgl2 als

zentraler Interaktionspartner von aPKC^{iota} fungiert und könnten ein weiterer Beleg für die einzigartigen Polaritätssignalwege in Podozyten sein (unveröffentlicht, Dr. Sybille Köhler). Die fehlende aPKC^{iota}-Inhibition durch ATG, ATM und PS432 in der Podozytenzelllinie könnte folglich in anderen Interaktionspartnern oder Kompensationsmechanismen im Vergleich zu klassischen Epithelien begründet liegen. Eine weitere Ursache könnte in technischen Aspekten begründet liegen, da die Kinaseaktivität von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie nicht detektiert wurde. Weitere Validierungen sowie eine Quantifizierung der Kinaseaktivität in der Podozytenzelllinie sind erforderlich, um die chemischen Inhibitoren in der Podozytenzelllinie erneut zu testen. Wir verzichteten darauf, die aPKC^{iota}-Inhibition in den bereits publizierten Zellreihen zu reproduzieren, da mit den shRNA-*knockdown* Experimenten eine erfolgversprechende Alternative zur Identifikation neuer aPKC^{iota}-Targets in der Podozytenzelllinie zur Verfügung stand.

Im zweiten Ansatz wurden mittels shRNA-induzierten *knockdown* von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie (FDR=0,2, s0=0,1) neue Targets von aPKC^{iota} identifiziert, von denen interessanterweise zahlreiche Proteine mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind. Schädigungen an den Podozyten sind durch Veränderungen des strukturegebenden Aktinzytoskeletts charakterisiert,^{12,13} das u.a. durch den aPKC-Par-Komplex etabliert wird. Micall2,¹⁰¹ Myh9,¹⁰² Lima1¹⁰³ und Pdlim2¹⁰⁴ sind am Aufbau von Aktinfilamenten beteiligt, während eine reduzierte Add3-Expression in einem Verlust von Stressfasern resultiert und die Ausbildung von *Foot Process Effacement* begünstigt.¹⁰⁵ ZO-1 fungiert darüber hinaus als Gerüstprotein zwischen dem Aktinzytoskelett und der Schlitzmembran.¹¹ Der podozytenspezifische Verlust von ZO-1 führt zu Proteinurie und Glomerulosklerose und demonstriert die wesentliche Bedeutung von ZO-1 für die Integrität des Nierenfilters.¹⁰⁶ Neben dem Schlitzmembranprotein Neph1 interagiert ZO-1 mit Arvcf.¹⁰⁷ Arvcf, Ndr1, Cdc42ep4, Pkp4 und Synpo sind wiederum an Signaltransduktionsprozessen durch Rho-GTPasen beteiligt.^{44,108,109} Studien der letzten Jahrzehnte konnten zeigen, dass Rho-GTPasen u.a. eine zentrale Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts erfüllen.^{23,110,111} Die Ergebnisse sind in Einklang mit der aktuellen Studienlage, dass aPKC^{iota} ein elementarer Regulator des Aktinzytoskeletts ist.^{23,112}

Ein weiterer Regulationsmechanismus in der Zellmaschinerie wird durch multiple Phosphorylierungsmuster innerhalb eines Proteins etabliert, wodurch sich die Funktion

eines Proteins grundlegend verändern kann. Unter den identifizierten aPKC^{iota}-Targets wird dies beispielhaft an Synaptopodin deutlich, das mit einer unterschiedlichen Multiplicity sowohl vermindert als auch vermehrt nachgewiesen werden konnte (S828 aPKC kd \uparrow Multiplicity 3, aPKC kd \downarrow Multiplicity 2). Die Dechiffrierung der Phosphorylierungsmuster innerhalb des Signalnetzwerkes stellt eine Herausforderung zukünftiger Forschungen dar. Zusammenfassend zeigt sich, dass ein komplexes Zusammenspiel von Signalkaskaden und Regulationsmechanismen für die Funktionalität des Nierenfilters erforderlich ist.

Immortalisierte Podozytenzelllinien haben einen wichtigen Beitrag zur Entschlüsselung der physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen des Nierenfilters geleistet. Aufgrund von Limitationen der Zellkultur-Studien wird die Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse aus *in-vitro*-Studien auf Podozyten *in vivo* immer wieder kontrovers diskutiert. Die Expression Podozyten-spezifischer Gene ist in der Zellkultur verringert und unterscheidet sich zudem zwischen undifferenziertem und differenziertem Stadium.⁸⁷ Zusätzlich zu den durchgeführten Zellkultur-Studien sollten daher *in-vivo*-Studien mit den interessanten Kandidaten fortgesetzt werden, um die Bedeutung der potenziellen Targets von aPKC^{iota} *in vivo* zu verifizieren.

5.2 Mögliche Kompensationsmechanismen in der Abwesenheit von aPKC^{iota} in Podozytenzelllinie

Podozyten durchlaufen bei glomerulärer Schädigung eine Art Dedifferenzierung und nehmen die Morphologie von klassischen Epithelien an.¹¹³ Es kommt zudem zu einer Translokation der basolateralen Zellkontakte und zur Ausbildung von Tight Junctions, wie sie in frühen Entwicklungsstadien der Podozyten beobachtet werden.¹¹³ Möglicherweise stellt die Hochregulation der Zell-Zellkontakte während glomerulärer Schädigung einen Verankerungsmechanismus dar, um den drohenden Zellverlust zu verhindern. Die im shRNA-induzierten *knockdown* von aPKC^{iota} vermehrt nachgewiesenen Proteine/Phosphorylierungsstellen des MS-Phosphoproteoms könnten in potenzielle Kompensationsmechanismen in Abwesenheit von aPKC^{iota} involviert sein. Die unter den angereicherten GOCC-Terms Tight Junction, basolaterale Plasmamembran und integraler Bestandteil der Plasmamembran repräsentierten Proteine könnten darauf schließen lassen, dass durch den *knockout*

von aPKC^{iota} die beschriebenen morphologischen Änderungen in den Podozyten angestoßen werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Limitationen in Zellkultur-Studien sollten *in-vivo*-Studien mit den interessanten Kandidaten fortgesetzt werden, um die Bedeutung der identifizierten aPKC^{iota}-Targets im lebenden Organismus zu überprüfen.

5.3 aPKC^{iota}-*knockdown* in Sammelrohrzellen mittels siRNA möglicherweise nicht suffizient genug

Das Polaritätsprotein aPKC^{iota} konnte als elementarer Akteur zur Etablierung der komplexen Podozytenarchitektur und Funktionalität der glomerulären Filtrationsbarriere identifiziert werden.²² Der aktuelle Forschungsstand deutet klar daraufhin, dass sich die Polaritätssignalwege zwischen Podozyten und klassischen Epithelien unterscheiden. Um potenzielle Targets in Sammelrohrzellen der Niere zu identifizieren, wurde mit analogen Testgütekriterien des shRNA-induzierten *knockdown* von aPKC^{iota} in der Podozytenzelllinie (FDR=0,2, s0=0,1) nur eine Phosphorylierungsstelle detektiert. Obwohl die Western Blot-Ergebnisse den *knockdown* von aPKC^{iota} durch die verwendete siRNA zeigen, könnte der *knockdown* für die phosphoproteomische Analyse nicht suffizient genug gewesen sein. Die RNA-Interferenz ist eine fest etablierte Methode zum Gen-Silencing, deren Effizienz jedoch durch mangelnde Spezifität, vorzeitigem Abbau sowie verminderter Aufnahme der siRNA in die Zelle herabgesetzt sein kann.⁸⁴ Eine weitere mögliche Ursache der fehlenden Resultate könnte im unterschiedlichen Expressionsmuster von aPKC-Isoformen begründet liegen. In der verwendeten Sammelrohrzelllinie (mIMCD) wird aPKC^{zeta} fast dreifach höher exprimiert als aPKC^{iota}.¹¹⁴ Es ist denkbar, dass die Isoform aPKC^{zeta} die fehlende Kinaseaktivität von aPKC^{iota} kompensieren kann. Weitere Validierungen der siRNA gegen aPKC^{iota} sind notwendig, um die *knockdown*-Effizienz zu detektieren und zu maximieren.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Webster AC, Nagler E V., Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet* 2017; **389**: 1238–52.
- 2 Fox CS, Matsushita K, Woodward M, *et al.* Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: A meta-analysis. *Lancet* 2012; **380**: 1662–73.
- 3 Levey AS, De Jong PE, Coresh J, *et al.* The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: A KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int* 2011; **80**: 17–28.
- 4 Girndt M. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. *Internist* 2017; **58**: 243–56.
- 5 Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, *et al.* Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension* 2003; **42**: 1050–65.
- 6 Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, *et al.* Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: A population-level cohort study. *Lancet* 2012; **380**: 807–14.
- 7 Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**: 1382–91.
- 8 Lüllmann-Rauch R. Histologie Verstehen - Lernen - Nachschlagen, 1. Auflage. Stuttgart: Thieme, 2003.
- 9 Koehler S, Tellkamp F, Niessen CM, *et al.* Par3A is dispensable for the function of the glomerular filtration barrier of the kidney. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2016; **311**: F112–9.
- 10 Reiser J, Wei C, Möller CC, *et al.* Neph-Nephrin Proteins Bind the Par3-Par6-Atypical Protein Kinase C (aPKC) Complex to Regulate Podocyte Cell Polarity. *J Biol Chem* 2008; **283**: 23033–8.
- 11 Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte.

- Physiol Rev* 2003; **83**: 253–307.
- 12 Kerjaschki D. Caught flat-footed : podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. 2001; **108**. DOI:10.1172/JCI200114629.The.
 - 13 Schiffer M, Teng B, Gu C, *et al.* Pharmacological targeting of actin-dependent dynamin oligomerization ameliorates chronic kidney disease in diverse animal models. 2015; **21**. DOI:10.1038/nm.3843.
 - 14 Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 3005–15.
 - 15 Shirato I. Podocyte Process Effacement In Vivo. 2002; **246**: 241–6.
 - 16 Henrique D, Schweisguth F. Cell polarity: The ups and downs of the Par6/aPKC complex. *Curr Opin Genet Dev* 2003; **13**: 341–50.
 - 17 Wilson PD. Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2011; **1812**: 1239–48.
 - 18 Martin-belmonte F, Perez-moreno M. Epithelial cell polarity , stem cells and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**. DOI:10.1038/nrc3169.
 - 19 Schell C, Wanner N, Huber TB. Glomerular development - Shaping the multi-cellular filtration unit. *Semin Cell Dev Biol* 2014; **36**: 39–49.
 - 20 Hartleben B, Widmeier E, Wanner N, *et al.* Role of the polarity protein Scribble for podocyte differentiation and maintenance. *PLoS One* 2012; **7**: 1–10.
 - 21 Humbert PO, Dow LE, Russell SM. The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes? *Trends Cell Biol* 2006; **16**: 622–30.
 - 22 Haller H, Becker JU, Huber TB, *et al.* Loss of Podocyte aPKC η Causes Polarity Defects and Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2009; **20**: 798–806.
 - 23 Koehler S, Odenthal J, Ludwig V, *et al.* Scaffold polarity proteins Par3A and Par3B share redundant functions while Par3B acts independent of atypical protein kinase C/Par6 in podocytes to maintain the kidney filtration barrier. *Kidney Int* 2021; published online Dec. DOI:10.1016/j.kint.2021.11.030.
 - 24 Kohjima M, Noda Y, Takeya R, Saito N, Takeuchi K, Sumimoto H. PAR3 β , a

- novel homologue of the cell polarity protein PAR3, localizes to tight junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299**: 641–6.
- 25 Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* 2015; **209**: 199–210.
- 26 Stein JH, Fadem SZ. The Renal Circulation. *JAMA* 1978; **239**: 1308–12.
- 27 Julian BA, Suzuki H, Suzuki Y, Tomino Y, Novak J. NIH Public Access Proteomics for the Detection of Biomarkers of Disease. 2010; **3**: 1029–43.
- 28 Rassow J. Biochemie der Niere. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, eds. 4. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2016. DOI:10.1055/b-003-129341.
- 29 Lawrence MG, Altenburg MK, Sanford R, *et al.* Permeation of macromolecules into the renal glomerular basement membrane and capture by the tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**: 2958–63.
- 30 Madrazo-Ibarra A, Vaitla P. Histology, Nephron. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020.
- 31 Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD. Glomerular permselectivity: Barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol* 1978; **3**: 455–60.
- 32 López JI, Larrinaga G, Kuroda N, Angulo JC. The normal and pathologic renal medulla: A comprehensive overview. *Pathol Res Pract* 2015; **211**: 271–80.
- 33 Garg P, Holzman LB. Podocytes: Gaining a foothold. *Exp Cell Res* 2012; **318**: 955–63.
- 34 Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, *et al.* Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol* 2000; **157**: 1905–16.
- 35 Kawachi H, Koike H, Kurihara H, *et al.* Cloning of rat nephrin: Expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 2000; **57**: 1949–61.
- 36 Mccarthy KJ. Morphogenesis of the glomerular filter: The synchronous assembly and maturation of two distinct extracellular matrices. *Microsc Res Tech* 1997; **39**: 233–53.

- 37 Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, *et al.* Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 1996; **122**: 3537–47.
- 38 Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab Invest* 1988; **59**: 673–82.
- 39 Choi HJ, Lee BH, Cho HY, *et al.* Familial focal segmental glomerulosclerosis associated with an ACTN4 mutation and paternal germline mosaicism. *Am J kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2008; **51**: 834–8.
- 40 Welsch T, Endlich N, Kriz W, Endlich K. CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; **281**: F769-77.
- 41 Shih NY, Li J, Karpitskii V, *et al.* Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science (80-)* 1999; **286**: 312–5.
- 42 Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. 1997; **139**: 193–204.
- 43 Asanuma K, Reiser J, Mundel P, *et al.* Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of a -actinin in an isoform-specific manner Find the latest version : Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. 2012. DOI:10.1172/JCI200523371.1188.
- 44 Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin Is Dispensable for Normal Podocyte Homeostasis but Is Protective in the Context of Acute Podocyte Injury. *J Am Soc Nephrol* 2020; : ASN.2020050572.
- 45 Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, *et al.* Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; **1**: 575–82.
- 46 Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; **10**: 1–8.

- 47 Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstädt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003; **17**: 115–7.
- 48 Jain V, Feehally J, Jones G, Robertson L, Nair D, Vasudevan P. Steroid-resistant nephrotic syndrome with mutations in NPHS2 (podocin): report from a three-generation family. *Clin Kidney J* 2014; **7**: 303–5.
- 49 Huber TB, Simons M, Hartleben B, *et al.* Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet* 2003; **12**: 3397–405.
- 50 Huber TB, Schmidts M, Gerke P, *et al.* The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* 2003; **278**: 13417–21.
- 51 Butt L, Unnersjö-Jess D, Höhne M, *et al.* A molecular mechanism explaining albuminuria in kidney disease. *Nat Metab* 2020; **2**: 461–74.
- 52 Roignot J, Peng X, Mostov K. Polarity in mammalian epithelial morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; **5**: 1–15.
- 53 Chen J, Zhang M. The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Exp Cell Res* 2013; **319**: 1357–64.
- 54 Assémat E, Bazellières E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D. Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 2008; **1778**: 614–30.
- 55 Kempthues KJ, Priess J, Cheng NS, Morton D. Identification of Genes Required for Cytoplasmic Localization in C-Elegans. *J Cell Biochem* 1988; **52**: 20.
- 56 Levitan DJ, Boyd L, Mello CC, Kempthues KJ, Stinchcomb DT. par-2, a gene required for blastomere asymmetry in *Caenorhabditis elegans*, encodes zinc-finger and ATP-binding motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 6108–12.
- 57 Guo S, Kempthues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; **81**: 611–20.
- 58 Watts JL, Morton DG, Bestman J, Kempthues KJ. The *C. elegans* par-4 gene

- encodes a putative serine-threonine kinase required for establishing embryonic asymmetry. *Development* 2000; **127**: 1467–75.
- 59 Joberty G, Petersen C, Gao L, Macara IG. The cell-polarity protein Par6 links Par3 and atypical protein kinase C to Cdc42. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 531–9.
- 60 Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat Cell Biol* 2000; **2**: 540–7.
- 61 Nagai-Tamai Y, Mizuno K, Hirose T, Suzuki A, Ohno S. Regulated protein-protein interaction between aPKC and PAR-3 plays an essential role in the polarization of epithelial cells. *Genes to Cells* 2002; **7**: 1161–71.
- 62 Pieczynski J, Margolis B. Protein complexes that control renal epithelial polarity. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2011; **300**.
DOI:10.1152/ajprenal.00615.2010.
- 63 Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Ozaki H, Kita T, Tsukita S. Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol* 2001; **154**: 491–7.
- 64 Garrard SM, Capaldo CT, Gao L, Rosen MK, Macara IG, Tomchick DR. Structure of Cdc42 in a complex with the GTPase-binding domain of the cell polarity protein, Par6. 2003; **22**: 1125–33.
- 65 Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* 2008; **88**: 1341–78.
- 66 Hong Y. aPKC: The Kinase that Phosphorylates Cell Polarity [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2018; **7**: 1–8.
- 67 Hartleben B, Widmeier E, Suhm M, *et al.* aPKC γ/ℓ and aPKC ζ contribute to podocyte differentiation and glomerular maturation. *J Am Soc Nephrol* 2013; **24**: 253–67.
- 68 Gunaratne A, Thai BL, Di Guglielmo GM. Atypical protein kinase C phosphorylates Par6 and facilitates transforming growth factor β -induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 2013; **33**: 874–86.
- 69 Golub O, Wee B, Newman RA, Paterson NM, Prehoda KE. Activation of Discs

- large by aPKC aligns the mitotic spindle to the polarity axis during asymmetric cell division. *Elife* 2017; **6**. DOI:10.7554/eLife.32137.
- 70 Sotillos S, Díaz-Meco MT, Caminero E, Moscat J, Campuzano S. DaPKC-dependent phosphorylation of Crumbs is required for epithelial cell polarity in *Drosophila*. *J Cell Biol* 2004; **166**: 549–57.
- 71 Betschinger J, Mechtler K, Knoblich JA. The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature* 2003; **422**: 326–30.
- 72 Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, *et al.* Mammalian Lgl Forms a Protein Complex with PAR-6 and aPKC Independently of PAR-3 to Regulate Epithelial Cell Polarity. *Curr Biol* 2003; **13**: 734–43.
- 73 Dong W, Zhang X, Liu W, *et al.* A conserved polybasic domain mediates plasma membrane targeting of Lgl and its regulation by hypoxia. *J Cell Biol* 2015; **211**: 273–86.
- 74 Suzuki A, Akimoto K, Ohno S. Protein kinase C $\lambda/1$ (PKC $\lambda/1$): A PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *J Biochem* 2003; **133**: 9–16.
- 75 Larsen L, Ataliotis P, Kioussis D, *et al.* Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci* 2006; **88**: 5096–100.
- 76 Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: Past, present, and future. *Kidney Int* 2007; **72**: 26–36.
- 77 Rauchman MI, Nigam SK, Delpire E, Gullans SR. An osmotically tolerant inner medullary collecting duct cell line from an SV40 transgenic mouse. *Am J Physiol - Ren Fluid Electrolyte Physiol* 1993; **265**: 416–24.
- 78 GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 1949; **177**: 751–66.
- 79 Rehm H. *Der Experimentator Proteinbiochemie/Proteomics*, 5. Auflage. München: Elsevier GmbH, 2006.
- 80 Mruk DD, Cheng CY. Enhanced chemiluminescence (ECL) for routine

- immunoblotting. *Spermatogenesis* 2011; **1**: 121–2.
- 81 Koyyada R, Latchooman N, Jonaitis J, Ayoub SS. Naltrexone Reverses Ethanol Preference and Protein Kinase C Activation in *Drosophila melanogaster*. 2018; **9**: 1–7.
- 82 Sanger F, Nicklen S. DNA sequencing with chain-terminating. 1977; **74**: 5463–7.
- 83 T. Das A, Tenenbaum L, Berkhout B. Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther* 2016; **16**: 156–67.
- 84 Dana H, Chalbatani GM, Mahmoodzadeh H, *et al.* Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. 2017; **13**: 48–57.
- 85 Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, *et al.* 3' UTR seed matches , but not overall identity , are associated with RNAi off-targets. 2006; **3**: 199–204.
- 86 Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, *et al.* Amplification efficiency : linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. 2009; **37**. DOI:10.1093/nar/gkp045.
- 87 Brinkkoetter PT, Ising C, Kann M, *et al.* Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am J Physiol Physiol* 2016; **311**: C404–17.
- 88 Mann M. individualized p . p . b . -range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. 2008; **26**: 1367–72.
- 89 Hornbeck P V, Kornhauser JM, Tkachev S, *et al.* PhosphoSitePlus : a comprehensive resource for investigating the structure and function of experimentally determined post-translational modifications in man and mouse. 2012; **40**: 261–70.
- 90 Fields AP, Frederick LA, Regala RP. Targeting the oncogenic protein kinase C α signalling pathway for the treatment of cancer. *Biochem Soc Trans* 2007; **35**: 996–1000.
- 91 Weems C, Fields AP, Murray NR, Stallings-Mann M, Regala RP, Jamieson L. A Novel Small-Molecule Inhibitor of Protein Kinase C α Blocks Transformed Growth of Non–Small-Cell Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 1767–74.

- 92 Regala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP. Atypical protein kinase Ct plays a critical role in human lung cancer cell growth and tumorigenicity. *J Biol Chem* 2005; **280**: 31109–15.
- 93 Schmithals C, Oellerich T, Biondi RM, *et al.* An Allosteric Inhibitor Scaffold Targeting the PIF-Pocket of Atypical Protein Kinase C Isoforms. *ACS Chem Biol* 2017; **12**: 564–73.
- 94 Butler AM, Inman KS, Buzhardt MLS, *et al.* A small molecule inhibitor of atypical protein kinase C signaling inhibits pancreatic cancer cell transformed growth and invasion. *Oncotarget* 2015; **6**. DOI:10.18632/oncotarget.3812.
- 95 Erdogan E, Lamark T, Stallings-Mann M, *et al.* Aurothiomalate inhibits transformed growth by targeting the PB1 domain of protein kinase Ci. *J Biol Chem* 2006; **281**: 28450–9.
- 96 Frank M, Kemler R. Protocadherins. *Curr Opin Cell Biol* 2002; **14**: 557–62.
- 97 Redies C, Heyder J, Kohoutek T, Staes K, Van Roy F. Expression of protocadherin-1 (Pcdh1) during mouse development. *Dev Dyn* 2008; **237**: 2496–505.
- 98 Matsuoka Y, Li X, Bennett V. Adducin is an in vivo substrate for protein kinase C: Phosphorylation in the MARCKS-related domain inhibits activity in promoting spectrin-actin complexes and occurs in many cells, including dendritic spines of neurons. *J Cell Biol* 1998; **142**: 485–97.
- 99 Jurkiewicz D, Michalec K, Skowronek K, Nałęcz KA. Tight junction protein ZO-1 controls organic cation/carnitine transporter OCTN2 (SLC22A5) in a protein kinase C-dependent way. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2017; **1864**: 797–805.
- 100 Reina-Campos M, Diaz-Meco MT, Moscat J. The Dual Roles of the Atypical Protein Kinase Cs in Cancer. *Cancer Cell* 2019; **36**: 218–35.
- 101 Zhu L-Y, Zhang W-M, Yang X-M, *et al.* Silencing of MICAL-L2 suppresses malignancy of ovarian cancer by inducing mesenchymal-epithelial transition. *Cancer Lett* 2015; **363**: 71–82.
- 102 Cechova S, Dong F, Chan F, Kelley MJ, Ruiz P, Le TH. MYH9 E1841K

- mutation augments proteinuria and podocyte injury and migration. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**: 155–67.
- 103 Maul RS, Song Y, Amann KJ, Gerbin SC, Pollard TD, Chang DD. EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilizing filaments. *J Cell Biol* 2003; **160**: 399–407.
- 104 Sistani L, Dunér F, Udumala S, *et al.* Pdlim2 is a novel actin-regulating protein of podocyte foot processes. *Kidney Int* 2011; **80**: 1045–54.
- 105 Gao W, Liu Y, Fan L, *et al.* Role of γ -adducin in actin cytoskeleton rearrangements in podocyte pathophysiology. *Am J Physiol - Ren Physiol* 2021; **320**: F97–113.
- 106 Itoh M, Nakadate K, Matsusaka T, Hunziker W, Sugimoto H. Effects of the differential expression of ZO-1 and ZO-2 on podocyte structure and function. *Genes to Cells* 2018; **23**: 546–56.
- 107 Kausalya PJ, Phua DCY, Hunziker W. Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5503–15.
- 108 Nahorski MS, Seabra L, Straatman-Iwanowska A, *et al.* Folliculin interacts with p0071 (plakophilin-4) and deficiency is associated with disordered rhoa signalling, epithelial polarization and cytokinesis. *Hum Mol Genet* 2012; **21**: 5268–79.
- 109 Zhang D, Tang N, Liu Y, Wang EH. ARVCF expression is significantly correlated with the malignant phenotype of non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog* 2015; **54**: E185–91.
- 110 Asano-Matsuda K, Ibrahim S, Takano T, Matsuda J. Role of rho gtpase interacting proteins in subcellular compartments of podocytes. *Int J Mol Sci* 2021; **22**. DOI:10.3390/ijms22073656.
- 111 Steichen C, Hervé JC, Hauet T, Bourmeyster N. Rho GTPases in kidney physiology and diseases. *Small GTPases* 2021; : 1–21.
- 112 Worthmann K, Leitges M, Teng B, *et al.* Def-6, a novel regulator of small

GTPases in podocytes, acts downstream of atypical protein kinase C (aPKC)
λ1. *Am J Pathol* 2013; **183**: 1945–59.

- 113 Herman-Edelstein M, Thomas MC, Thallas-Bonke V, Saleem M, Cooper ME, Kantharidis P. Dedifferentiation of immortalized human podocytes in response to transforming growth factor- β : A model for diabetic podocytopathy. *Diabetes* 2011; **60**: 1779–88.
- 114 Chen L, Chou C-L, Knepper MA. A Comprehensive Map of mRNAs and Their Isoforms across All 14 Renal Tubule Segments of Mouse. *J Am Soc Nephrol* 2021; **32**: 897–912.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung der Podozytenentwicklung (modifiziert nach Hartleben und Kollegen, 2012) ²⁰	17
Abb. 2: Glomeruläre Schlitzmembran und der Par-Komplex	20
Abb. 3: Schematische Darstellung der Zellpolaritätskomplexe in klassischen Epithelzellen (modifiziert nach Martin-Belmonte und Kollegen, 2011) ¹⁸	22
Abb. 4: Polaritätsproteine des Par-Komplexes (modifiziert nach Pieczynski und Kollegen, 2011) ⁶²	23
Abb. 5: Chemischer Inhibitor ATG inhibiert aPKC ^{iota} in Podozytenzelllinie nicht.....	51
Abb. 6: Chemischer Inhibitor ATM inhibiert aPKC ^{iota} in Podozytenzelllinie nicht	52
Abb. 7: Allosterischer Inhibitor PS432 inhibiert aPKC ^{iota} in Podozytenzelllinie nicht. 53	
Abb. 8: Validierung der <i>knockdown</i> -Effizienz von aPKC ^{iota} in stabiler Podozytenzelllinie mit shRNA gegen aPKC ^{iota} /mirNEG und Tet-On System	54
Abb. 9: Identifikation neuer aPKC ^{iota} -Targets mittels massenspektrometrischer Analyse in Podozytenzelllinie	57
Abb. 10: Enrichment Analyse nach GO-Terms mit dem exakten Fisher-Test in Podozytenzelllinie	60
Abb. 11: Phosphorylierungsstellen interessanter Proteine der Enrichment Analyse in Podozytenzelllinie	61
Abb. 12: Validierung der <i>knockdown</i> -Effizienz in Sammelrohrzelllinie mit siRNA gegen aPKC ^{iota} und ungerichteter siRNA (Kontrolle)	64
Abb. 13: aPKC ^{iota} -Targets in Sammelrohrzelllinie mittels massenspektrometrischer Analyse	68

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Laborbedarf	27
Tab. 2: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	29
Tab. 3: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien	31
Tab. 4: Liste der verwendeten Kits und Assays.....	32
Tab. 5: Liste der verwendeten Plasmide.....	33
Tab. 6: Liste der verwendeten Bakterienstämme	33
Tab. 7: Liste der verwendeten Zelllinien	33
Tab. 8: Liste der verwendeten Primer.....	34
Tab. 9: Liste der verwendeten Antikörper	34
Tab. 10: Liste der verwendeten Geräte	35
Tab. 11: Liste der benutzten Software	37
Tab. 12: Zusammensetzung eines SDS-Polyacrylamid-Gels	39
Tab. 13: Enhanced Chemiluminescence (ECL).....	41
Tab. 14: Phosphosites interessanter Proteine aus der Enrichment Analyse in Podozytenzelllinie	62
Tab. 15: Phosphosites interessanter Proteine in Sammelrohrzelllinie	69