

---

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Molekularbiologische Standardmethoden, Chemikalien, Kits und Geräte

Die im Folgenden nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden wurden aus den Laborhandbüchern von Sambrook et al. (1989) und Ausubel et al. (1987) übernommen (Ausubel, 1987; Sambrook, 1989). Diese Methoden waren: Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Maßstab, Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen, Dephosphorylierung linearisierter DNA, Auffüllen- bzw. Abdauen überstehender DNA-Enden, Ligationsreaktionen, PCR und RT-PCR, Transformation von Bakterien und die Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen. Nach Angaben der Hersteller wurden durchgeführt: Die Plasmid-DNA-Präparationen in quantitativem Maßstab (Qiagen), die Elution von DNA aus Agarosegelen (GFX-Gelelution, Amersham), Bradfordreaktion (Protein Detection Reagent, Biorad) Chemolumineszenzreaktion (ECL-Detection-Kit, Amersham) und die DNA-Sequenzierung (Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit, Amersham). Soweit nicht anders angegeben wurden Chemikalien von Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Biochrom (Berlin) und Sigma (Deisenhofen), Enzyme von Boehringer Mannheim (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) und Fermentas (St. Leon-Rot) und Oligonukleotide von BioTeZ (Berlin) und MWG (Ebersberg) bezogen. Die verwendeten Geräte waren: Luminometer (Lumat LB9507, Berthold), ELISA-Reader Ultramark (Biorad), DNA-Sequencer 4200 (LiCor), ChemiImager 4400 (AlphaInnotech) Minifuge RF (Heraeus Sepatech), Zentrifuge 5402 (Eppendorf), Zentrifuge Variofuge 3.0R (Heraeus), Zentrifuge J2-21 (Beckman) mit Rotoren JA-10 und JA-12 und Ultrazentrifuge TL-100 (Beckman) mit Rotor TLA100.3.

### 5.2 Bakterienstämme

Es wurden ausschließlich konjugationsdefiziente K12-Sicherheitsstämme von *E. coli* verwendet:

XL1 Blue [*F'*, *Tn10* (*tetr*), *proAB*<sup>+</sup>, *lacIq*, *(lacZ)M15*, *supE44*, *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *relA1*, *gyrA96*] (Stratagene, Heidelberg);

SCS110 [*rpsL*(Strr), *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, (*lac-proAB*), [F'*traD36 proAB lacIqZ.M15*]] (Stratagene).

### 5.3 Verwendete Plasmide

pBABEpuro (Morgenstern and Land, 1990)

pBAT (Nose et al., 1988)

pBluescript II SK+ (Stratagene) wurde für DNA-Klonierungsschritte eingesetzt.

pcDNA3.1+ (Invitrogen)

pcDNA3.1-(Myc/His) (Invitrogen)

pcDNA-FLAG/pcDNA-HA sind modifizierte pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen), bei denen ein FLAG bzw. HA-Epitop 5' der Klonierungsstelle inseriert wurde. Beide wurden zur Expression der angegebenen cDNAs in Zellkultur verwendet.

pEGFP-C2 (Clontech)

pGAD (Clontech)

pGBKT7 (Clontech)

pGBT9 (Clontech)

Maus-Ret9 cDNA (Pachnis et al., 1993)

Ratte-Shank3-cDNA (Boeckers et al., 1999b)

### 5.4 Klonierung der Shank-Mutanten

Zur Klonierung der Shank3-Deletionsmutanten Shank3-NT und Shank3-Pro1 wurden die entsprechenden Fragmente mittels PCR amplifiziert und in pcDNA-Flag über NotI/XbaI eingesetzt. Es wurden die folgenden Primer verwendet: Shank3-NT 5'-GTA ATA TTG CGG CCG CGT CGA CAC AGC ACA GAC AAG G-3' und 5'-G ATA ATC TAG AGT CGA CCG ACG ACT ATC CTC C-3'), Shank3-Pro1 5'-GTA ATA TTG CGG CCG CGT CGA CCC TAT GAC AGC CTC AC-3' und 5'-G ATA ATC TAG AGT CGA CAA GGA AAT GGT TCT TG-3'). Shank3-Pro2 wurde durch Verdau von Shank3-Pro1 mit HindIII und Re-Ligation des Vektors erzeugt. Shank3-PDZ wurde von Jan Grimm in einem Hefe-2-Hybrid-Screen aus einer cDNA-Bibliothek (Hollenberg) isoliert und über die Schnittstel-

len NotI/NotI in pcDNA-Flag umgesetzt. Alle PCR-Fragmente wurden nach Einfügen in ihren Zielvektor sequenziert.

Die Expression von Shank3 in MDCK-Zellen wurde durch RT-PCR unter Verwendung der SuperScript II Reversen Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Verwendete Primer: Shank3 vorwärts 5'-CCG AAG CGG AAA CTT TAC-3', revers 5'-ACC CTT CCC TCC CAG AAA CC-3'.

## 5.5 Klonierung der Ret-Mutanten

Die Maus Ret9 cDNA (Pachnis et al., 1993) wurde als XbaI-Sall Fragment in den Expressionsvektor pBAT kloniert. In dieses Konstrukt wurden ein interner Myc-Tag sowie die Punktmutationen für Ret9 KM und Ret9 FA eingeführt. Der interne Myc-Tag wurde in der Juxtamembranregion zwischen Aminosäure 678 und 679 mittels PCR insertiert. Der C-Terminus von Ret9 (Aminosäure 679-1072) wurde mit PCR amplifiziert und dabei eine XbaI Schnittstelle am 5'-Ende eingeführt (Primer 5'-CAT ATC TAG ACA GGG CTT CCC AAT C-3' und 5'-CAT AGT CGA CCT AGA ATC TAG TAA ATG C-3' für Myc-Ret9 bzw. 5'-CAT AGT CGA CCT AGG CTC TAG TAA ATG C-3' für Myc-Ret9FA). Nach einsetzen des Ret9 C-Terminus in pBAT über XbaI-Sall wurde ein Oligonucleotid Linker der einen doppelten Myc-Tag enthält (5'-CTA GAG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGG-3' und 5'-CTA GCC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCT-3') XbaI/XbaI vor den C-Terminus kloniert, so dass die 3' XbaI Stelle des Linkers nicht wieder geschnitten werden kann. Anschließend wurde der mittels PCR mit den Primern 5'-CAT ATC TAG AAT GGC GAA AGC GAC-3' und 5'-CAT ATC TAG AGC AGA AGG TCA TTT CC-3' amplifizierte Ret N-Terminus (Aminosäuren 1-678) über die Schnittstellen XbaI/XbaI vor den Myc-Tag eingesetzt.

Ret9 K758M wurde von Jan Grimm zur Verfügung gestellt (Grimm, 2001). Die Mutation Ret9 F1072A wurde mittels PCR mit den Primern 5'-CTG CCT ATG TGA GCG GTG GAG GC-3' und 5'-TTT TCA GCT GCT AGG CTC TAG TAA ATG-3' eingeführt. Das PCR Fragment wurde über die flankierenden Schnittstellen NcoI und Sall in den Ret9 CT

eingesetzt. Das C-terminale Fragment von Ret51 wurde mittels RT-PCR aus RNA von Neuro2a-Zellen mit den Primern 5'-CTG CCT ATG TGA GCG GTG GAG GC-3' und 5'-TTT TCA GCT GTT AGC TAT CAA ATG TG -3' amplifiziert und über die Schnittstellen NcoI und Sall in den Ret9 C-Terminus eingesetzt.

Zur Klonierung der Ret51 Mutante Ret51-9 wurden über PCR die 6 C-terminalen Aminosäuren aus Ret9 an Ret51 angefügt und das PCR Fragment (5'-CTG CCT ATG TGA GCG GTG GAG GC -3' und 5'-GAT TGT CGA CCT AGA ATC TAG TAA ATG CAT GGC TAT CAA ATG TGT CC-3') über NcoI/Sall in Ret51 eingesetzt.

Die Ret9 Mutanten Ret9 F1072D, Ret9-51CT, Ret9  $\Delta$ 2, Ret9  $\Delta$ 4, Ret9 T1070A F1072P, Ret9 T1070Y wurden mittels PCR mit den reversen Primern 5'-GTA TGC GTC GAC CTA GTC TCT AGT AAA TGC ATG TG-3', 5'-GTA TGC GTC GAC CTA GCT ATC AAA TGT TGC ATG TGA AAT TCT ACC ATA G-3', 5'-GTA TGC GTC GAC CTA AGT AAA TGC ATG TGA AAT TC-3', 5'-GTA TGC GTC GAC CTA TGC ATG TGA AAT TCT ACC ATA G-3', 5'-GTA TGC GTC GAC CTA CGG TCT AGC AAA TGC ATG TG-3', 5'-CAT AGT CGA CCT AGA ATC TAT AAA ATG CAT GTG-3' und dem vorwärts Primer 5'-CTG CCT ATG TGA GCG GTG GAG GC -3' amplifiziert und über die Schnittstellen NcoI/Sall in den Hefe-Vektor pGBKT7 eingesetzt. Fragmente aus den Konstrukten Ret9, Ret51 und Ret9 F1072A wurden ebenfalls über die Schnittstellen NcoI/Sall in pGBKT7 übertragen.

Die Fusions Konstrukte aus Ret9 und Shank3 wurden wie folgt kloniert: der Ret9 C-Terminus wurde durch ein PCR Fragment mit den flankierenden Schnittstellen NcoI/NotI ersetzt, das kein Stopcodon nach Aminosäure 1072 enthält. Die Ret cDNA wurde anschließend aus pBAT über KpnI/NotI in pcDNA3.1+ übertragen. Die Shank3 Deletionsmutanten Shank3-NT, Shank3-Pro1 und Shank3-Pro2 wurden über NotI/XbaI zusammen mit dem Fragment Ret9 KpnI/NotI in pcDNA3.1+ (KpnI/XbaI) in einer Tripel-ligation zusammengefügt. Alle PCR-Fragmente wurden nach Einfügen in ihren Zielvektor sequenziert.

Die Expression der Ret Konstrukte in stabilen MDCK-Zelllinien wurde durch RT-PCR unter Verwendung der SuperScript II Reversen Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

durchgeführt. Verwendete Primer: Ret9 und Ret9 FA vorwärts 5'-CAA GTG GAT GGC AAT TGA GTC C-3', revers 5'-GTA AAT GCA TGT GAA ATT CTA CC-3'; Ret51 und Ret51-9 revers 5'-GTT AGC ATA TAC ACT ATC ATT TGC-3'; Ret9-Shank3-NT revers 5'-GCA GGG TCG TCA ATG CTC-3'; Ret9-Shank3-Pro1 revers 5'-GCC GAG CAC TAT CCT CTG-3'; Ret9-Shank3-Pro2 und Ret9-Shank3-Pro2 YF revers 5'TCC AGT AGG GAT GCC AGC-3';

## 5.6 Hefe-2-Hybrid-System

Die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* L40 [MATa, his3, trp-901, leu2-3,112, ade2, LYS2:::(lexAop)4-HIS3, URA3:::(lexAop)8, lacZ, gal4, gal80] erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (Ito et al., 1983). L40-Hefen wurden über Nacht in 25 ml YPD Medium [20 g/l Pepton; 10 g/l Hefeextrakt (Difco); 2 % Glucose] kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben in 150 ml YPD auf eine OD600 von 0,2 verdünnt. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD600=0,5-0,6) wurden die Hefen bei 1000xg pelletiert, einmal mit TE (0,1M Tris-HCl; 10mM EDTA, pH 7.5) gewaschen und in 1,5 ml 0,1M LiAc/1xTE resuspendiert. Je 50 µl der Zellsuspension wurden mit 200 ng der jeweiligen Hefeexpressionsvektoren (pGBKT7 und pGBT9), 50 µg Lachsspermien-Träger-DNA und 300µl 0,1M LiAc/40% PEG3850/1xTE vermischt und 30 Min. bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 35µl DMSO zugegeben, die Transformationsansätze 15 Min. bei 42°C inkubiert, kurz auf Eis abgekühlt und die Hefen pelletiert. Das Pellet wurde in TE resuspendiert und die Hefen jeweils auf Selektionsmedium [-TL (ohne Tryptophan und Leucin) und -THULL (ohne Tryptophan, Histidin, Uracil, Leucin und Lysin)] plattiert und nach 2-5 Tagen Wachstum fotografiert.

## 5.7 Zellkultur und Transfektion

HEK293 (human embryonic kidney 293, eine humane, embryonale Nierenepithelzelllinie, transformiert mit Adenovirus 5; ATCC-Nr. CRL 1573), Neuro2a-Zellen (eine murine Neuroblastomzelllinie; ATCC-Nr. CCL 131) und MDCK-Typ-II-Zellen (Madin Darby Canine Kidney), eine Hunde-Nierenepithelzelllinie; ATCC-Nr. CRL-2285) wurden in Dulbecos Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (Sigma) und 4,5 g/l Glucose, RK13 Zellen (eine Kanninchen-Nierenzelllinie; ATCC-Nr. CCL-37)

in DMEM mit 10% FCS, 1,5 g/l Glucose und nicht-essentiellen Aminosäuren (NEAA; Invitrogen Life Tech) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte kultiviert und transfiziert. Im Abstand von drei Tagen wurden die Zellen durch Trypsinbehandlung (0,5mM EDTA; 2% Trypsin, Merck, in PBS) abgelöst und 1:10 verdünnt. Zum Einfrieren wurden die Zellen für 5 Min. bei 300x g sedimentiert, in DMEM mit 60% FCS und 10% DMSO resuspendiert, bei -80°C langsam eingefroren und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Transfektion von HEK293 und Neuro2a-Zellen wurde nach der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode durchgeführt. Eine Mischung aus 10µg Plasmid-DNA in 450µl Wasser und 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> wurde tropfenweise zu 500µl 2xHBS Puffer (280mM NaCl; 10mm KCl; 1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 50mM HEPES; pH 7,05) gegeben und durch gleichzeitiges vortexen vermischt. Die Zellen wurden 5h mit dem Präzipitat in Zellkulturmedium inkubiert, einmal mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 48 Std. kultiviert.

MDCK Zellen und RK13 Zellen wurden mit Lipofectamin PLUS oder Lipofectamin 2000 (Invitrogen Life Tech) nach Protokoll des Herstellers transfiziert.

Für die Erzeugung stabiler Zelllinien wurden MDCK-Zellen nach der Transfektion der entsprechenden Konstrukte für 4 Wochen mit 1,2 mg/ml G418 oder 1,25 µg/ml Puromycin in Wachstumsmedium selektiert. Zellklone wurden nach ca. 2 Wochen vereinzelt und auf Funktion im Tubulogenese-Experiment und Expression auf RNA-Ebene untersucht.

## **5.8 Immunpräzipitation und Immunoblot**

Zur Präparation der Zelllysate wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in Protein-Lysepuffer mit Protease- und Phosphataseinhibitoren (150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM TRIS-HCl, pH 7,5; 1% Triton X-100; 1 mM PMSF, 1 TU Aprotinin, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 µM Pepstatin A, 25 mM Natriumfluorid) aufgenommen. Die Suspension wurde für 15 Min. bei 4°C rotiert und 15 Min. bei 20.000g und 4°C zentrifugiert. Für die Detektion von phosphorylierter Erk-MAPK und phosphoryliertem Akt wurden ca. 1·10<sup>5</sup> MDCK-Zellen pro Well in 6-Well-Schalen ausgesät und mit 100 µl pro Well lysiert und die Lysate nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Für die Im-

munpräzipitation wurden ca.  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro 10 cm Schale ausgesät, 400  $\mu$ l Lysepuffer verwendet und 50  $\mu$ l des Zelllysats mit reduzierendem Dissoziationspuffer (0,3 M Tris-HCl, pH 6,8; 6% SDS; 12 mM EDTA; 6%  $\beta$ -Mercaptoethanol; 30% Glycerin; 0,03% Bromphenolblau) versetzt und für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Zur Immunpräzipitation wurden die Zelllysate mit 1-2  $\mu$ g des entsprechenden Antikörpers versetzt und 2 Std. bei 4°C rotiert. Nach Zugabe von 15  $\mu$ l Protein-A-Sepharose (PAS CL-4B, Pharmacia) oder Protein-G-Sepharose (PGS CL-4B, Pharmacia) in Lysepuffer wurden die Lösungen erneut für 30 Min. bei 4°C rotiert, 3x in Protein-Lysepuffer gewaschen, die Immunkomplexe bei 9.000g sedimentiert und in reduzierendem Dissoziationspuffer für 5 Min. bei 95°C erhitzt. Die Trennung der Proteingemische erfolgte nach Laemmli (Laemmli, 1970) in denaturierenden Polyacrylamidgelen mit 4%-igem Sammelgel (4% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% Ammoniumpersulfat; 0,1% TEMED) und 7-15%-igem Trenngel (7-15% Acrylamid/Bisacrylamid 29:1; 300 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED). Die Elektrophorese wurde bei 40 mA pro Gel in Laemmli-Elektrophoresepuffer (2,5 mM Tris-HCl pH 8,3; 19,2 mM Glycin; 0,2% SDS) durchgeführt. Transfer der Proteine auf PVDF-Membran (Millipore) erfolgte in Semi-Dry-Elektrotransfer-Apparaturen (Biorad) für 1 Std. bei 250 mA. Dazu wurden die Membranen kurz in Methanol aktiviert, Gele und Membranen in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl; pH 8,3; 192 mM Glycin; 20% Methanol) equilibriert, luftblasenfrei übereinander gelegt und zwischen die Elektroden gebracht. Die Membranen wurden dann in PBS gewaschen, 1 Std. in 3% Trockenmilch in PBS blockiert und für 3 Std. oder über Nacht mit dem entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBT (PBS/0,2% Tween) wurde die Membran für 1 Std. mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper in PBS/3% Trockenmilch inkubiert, 3x in PBT gewaschen und die Immunkomplexe mittels Chemolumineszenzreaktion (ECL-Detection-Kit, Amersham) detektiert. Zur densitometrischen Analyse der Phospho-Erk-MAPK-, Erk-MAPK-, Phospho-Akt- und Akt-Immunoblots wurde das Programm TINA 2.08e (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) verwendet.

Zur Ko-Immunpräzipitation von endogenem Ret9 mit endogenem Shank3 aus Maus-Nieren wurden zwei Nieren in Homogenisationspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM NaCl) mechanisch homogenisiert und anschließend in CHAPS-Lysepuffer (1% CHAPS; 10 mM Tris pH 7,5; 10 mM NaCl) lysiert und für 20 Min. bei 4°C zentrifugiert. Die Im-

munpräzipitation erfolgte wie oben angegeben mit Meerschweinchen-anti-Shank3 Antiserum, gefolgt von SDS-PAGE und Immunoblot.

Folgende Antikörper wurden zur Immundetektion oder -präzipitation eingesetzt: Maus-anti-FLAG (Sigma), Maus-anti-HA (12CA5, Boehringer Mannheim), Ziege-anti-Ret9 (C19, Santa Cruz), Ziege-anti-Ret51 (C20, Santa Cruz), Ziege-anti-Myc (A14, Santa Cruz), Kanninchen-anti-Shank3 und Meerschweinchen-anti-Shank3 (Bockmann et al., 2002), Maus-anti-Grb2 (Upstate Biotechnologie), Maus-anti-Shp-2 (Transduction Laboratories), Maus-anti-Phospho-Erk1/2 (Sigma), Maus-anti-gesamt-Erk1/2 (Transduction Laboratories), Kanninchen-anti-phospho-Akt (Cell Signalling), Maus-anti-gesamt-Akt/PKB1 $\alpha$  (Transduction Laboratories), Peroxidase-gekoppelter anti-Ziege-Antikörper, Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Antikörper und Peroxidase-gekoppelter anti-Kanninchen-Antikörper (Jackson Immunoresearch).

## 5.9 Immunfluoreszens

Gefrorene, 10  $\mu$ m dicke Schnitte von Maus-Embryonen am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung wurden 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert, 3x 5 Min. in eiskaltem PBS gewaschen und unspezifische Antikörper-Bindungsstellen für 30 Min. bei Raumtemperatur mit 5% FCS, 0,5% Triton X100 in PBS blockiert. Die Inkubation der primären Antikörper gegen Shank3, sowie der Cy2 konjugierten sekundären Antikörper und dem DNA-Farbstoff DAPI erfolgte für je 1 Std. bei Raumtemperatur unterbrochen von 3x 5 Min. Waschen mit eiskaltem PBS. Nach weiteren 3x Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Schnitte in Mowiol (Calbiochem) eingebettet und anschließend am Fluoreszenzmikroskop Zeiss-Axiophot unter Verwendung eines Zeiss 40x F-Fluar Objektivs und einer Diagnostic Instruments SPOT-RT-Monochrome CCD-Kamera fotografiert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Adobe Photoshop Bildanalysesoftware optimiert.

Die primären Retina Ganglion Zellen RGC wurden mit Unterstützung von Karl Nögler aus der Retina neugeborener Ratten präpariert und über mehrere Immunadsorbitionsschritte von nicht-neuronalen Zellen getrennt (Barres et al., 1988; Meyer-Franke et al., 1995). Die RGC wurden in Zellkulturschalen (35mm Falcon, Becton & Dickinson, Heidelberg) ausge-

sät, die zuvor mit Poly-D-Lysin (PDL; 30–70 kDa; 100 µg/ml; Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und Humanem Merosin (2 µg/ml; Gibco) beschichtet wurden. Als Wachstumsmedium wurde Serumfreies Neurobasal Medium (Meyer-Franke et al., 1995) mit B27 (Gibco), „Human brain-derived neuro-trophic factor“ (BDNF; 25 ng/ml; PeproTech/TEBU, Frankfurt am Main), „Rat ciliary neurotrophic factor“ (CNTF; 10 ng/ml; PeproTech/TEBU, Frankfurt am Main), Forskolin (10 µM; Sigma), Glutamin (2 mM; Gibco), Insulin (5 µg/ml; Sigma), *N*-Acetylcystein (60 µg/ml; Sigma), Penicillin (100 units/ml; Gibco), Progesteron (62 ng/ml; Sigma), Putrescin (16 µg/ml; Sigma), Natriumselenit (40 ng/ml; Sigma), Rinder Serumalbumin (BSA; 0.1 mg/ml; Sigma), Streptomycin (100 µg/ml; Gibco), Triiodothyronin (40 ng/ml; Sigma) and Transferrin (0.1 mg/ml; Sigma). Das Wachstumsmedium wurde nach drei Tagen gewechselt und die RGC nach weiteren drei Tagen fixiert. Hierzu wurden die Zellen 2x mit eiskaltem PBS gewaschen, 30 Min. mit 3% Formaldehyd und 0,3% Triton-X100 fixiert. Nach erneutem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die RGC mit spezifischen Antikörpern gegen Shank3 und Ret (R&D Systems) 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert, 3x mit eiskaltem PBS gewaschen und nachfolgend mit sekundären Cy2- bzw Cy3-konjugierten Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die RGC in Mowiol (Calbiochem) eingebettet und am Floureszenzmicroskop Zeiss-Axiophot unter Verwendung eines Zeiss 40x F-Fluar Objektivs und einer Diagnostic Instruments SPOT-RT-Monochrome CCD-Kamera fotografiert. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Adobe Photoshop Bildanalysesoftware optimiert.

### **5.10 *In Vitro* Tubulogenese**

Im Tubulogenese Experiment wurden 100 µl einer dreidimensionalen (3D) Kollagenmatrix (1,5 mg/ml Vitrogen100 (Nutacon BV, Niederlande), 2,2 g/ml NaHCO<sub>3</sub>, 10% FCS, 20 mM Hepes in DMEM) in 48 Well Zellkulturplatten vorgelegt und 1 Std. bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte fest werden lassen. Hierauf wurden ca.  $1 \times 10^2$  Zellen als Einzelzellen, in eine 3D-Kollagenmatrix eingesät, gegeben, diese fest werden lassen und für 5 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte in DMEM, 10% FCS kultiviert. Nachfolgend wurde mit 25 ng/ml GDNF (Prepro Tech) und 250 ng/ml GFR $\alpha$ 1 (R&D Systems) oder 10 U HGF/SF (Sachs et al., 1996) stimuliert und weitere 5 Tage kultiviert. Die Zellen wurden zum Fotografieren einmal 10 Min in eiskaltem PBS gewaschen und dann in 4% Formalde-

hyd fixiert und aufbewahrt. Fotos wurden mit einem Zeiss-Axiovert-135 Mikroskop, unter Verwendung eines Zeiss 10x Achroplan Objektivs und einer Jenoptik ProgRes 3012mf Kamera aufgenommen. Kontrast und Helligkeit wurden mit der Adobe Photoshop Bildanalysesoftware optimiert.

## 5.11 Abkürzungen

### Allgemeine Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E	Tag der Embryonalentwicklung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum
g	Gravitationskonstante
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl
GTP/GDP	Guanosin-triphosphat/Guanosin-diphosphat
HA	Hämagglutinin
HBS	HEPES-buffered saline
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2- Ethansulfonsäure
IP	Immunpräzipitation
kDa	kilo Dalton
LB	Luria Bertani
M	mol/l
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	PSD-95, Dgl, ZO-1
PEG	Polyethylenglykol

---

PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
SV40	Simian virus 40
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminoethan
UB	ureteric bud
Vol	Volumen
w/v	Masse pro Volumen

### **Abkürzungen von Proteinnamen**

Abp1	Actin Binding Protein 1
Akt/PKB	Protein Kinase B
CortBP	Cortactin Binding protein
CREB	cAMP Response Element Binding Protein
Dgl	Discs Large
Dok	Downstream of Tyrosine Kinase
EGF	Epithelial Growth Factor
EphR	Ephrin-Receptor
Erk	Extra Cellular Stimulus Regulated Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FRS-2	FGF Receptor Substrate-2
Gab1	Grb2 Associated Binder 2
GDNF	Glia Cell Line Derived Neurotrophic Factor
GFR $\alpha$	GDNF-Family Receptor $\alpha$
GKAP	Guanylate Kinase Anchoring Protein
Grb2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
GRIP	Glutamate Receptor Interacting Protein
HGF/SF	Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor

---

IP3-Rezeptor	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat-Rezeptor
IRSp53	Insulin Receptor Substrate 53 kDa
JNK	Jun N-Terminal Kinase
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MEK	MAPK/Erk-Kinase
Met	Hepatocyte Growth Factor Receptor
Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor- $\kappa$ B
PAK	p21 Activated Kinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK1	3-Phosphoinositide Dependent Kinase
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PIX	PAK-Interacting Exchange Factor
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
ProSAP	Proline rich Synapse Associated Protein
PSD-95	Postsynaptic-Density 95 kDa
RasGAP	Ras-GTPase Activating Protein
Ret	Rearranged during Transformation
SH2/SH3	Src Homology Domain 2 and 3
Shank	SH3 and Ankyrin repeats containing Protein
Shc	Src homology 2 domain containing
Shp-2	SH2-containing phosphotyrosine phosphatase 2
Sos	Son of Sevenless
Trk	Neurotrophic tyrosine kinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZO-1	Zona Occludens-1