

ラット腎虚血再灌流モデルにおける CD2AP 発現の検討

東京女子医科大学 医学部 第四内科学 (主任: 二瓶 宏教授)

ニシムラ サヨコ スギウラ ヒデカズ ヨシダ タクミ ツチヤ ケン ニヘイ ヒロシ
西村佐代子・杉浦 秀和・芳田 工・土谷 健・二瓶 宏

(受理 平成 16年 10月 5日)

CD2AP Expression after Ischemic Reperfusion Injury in the Rat

Sayoko NISHIMURA, Hidekazu SUGIURA, Takumi YOSHIDA, Ken TSUCHIYA and Hiroshi NIHEI

Department of Medicine IV, Tokyo Women's Medical University, School of Medicine

CD2-associated protein (CD2AP) is a ubiquitously expressed 80-kDa intracellular protein, and is speculated to act as an intracellular signaling pathway between plasma membrane proteins and cytoskeleton proteins. CD2AP contains three SH3 domains and a coil-coiled domain, motifs that are important in protein-protein interactions. We have utilized an established rat model of ischemic renal injury to investigate CD2AP expression by quantitative real-time PCR for 10 days following ischemia. CD2AP expression increased by up to 4-fold after reperfusion for 6-24 h. Immunoblotting and immunostaining with a polyclonal CD2AP antibody demonstrated a significant increase in CD2AP expression. These results suggest that CD2AP expression increased during the cell proliferation following renal ischemia and that CD2AP may be involved in the process of cell repair and/or differentiation following injury. We also investigated the expression of genes categorized to apoptosis and cell proliferation in M1 cells transfected with full-length CD2AP cDNA. Quantitative real-time PCR showed decreased expression of B-Raf, caspase 12, and CDC2. In conclusion, the results of this study demonstrated that CD2AP expression is significantly up-regulated in adult rat kidney following ischemia-reperfusion injury and that CD2AP might play an important role in the process of cell repair and/or differentiation by suppressing apoptosis and cell proliferation.

Key words: renal ischemia reperfusion injury, CD2 associated protein, apoptosis, cell proliferation

緒 言

CD2-associated protein (CD2AP) はリンパ球などに存在する CD2 の cytoplasmic site と結合する蛋白として同定された分子で、接着分子である CD2 の機能を増強する役割を果たしていると考えられている。また、CD2AP の構造は 3 つの SH3 domain, proline rich lesion, そして coil-coil domain からなり、いずれもその他の蛋白と結合し機能を発揮することが指摘されている¹⁾。

最近、糸球体上皮細胞の構成蛋白が次々に明らかにされ、その特性が解明されつつあるが、nephrin²⁾, podocin³⁾, ACTN-4⁴⁾, などの糸球体上皮細胞の新しい構成蛋白に対して、CD2AP が関連蛋白として報告されている。さらに、尿細管蛋白で、多発性嚢胞腎の起因蛋白である polycystin-2⁵⁾との関連も報

告されている。これらの蛋白はいずれも細胞骨格に関する機能蛋白であることが特徴である。

糸球体上皮細胞では、CD2AP のノックアウトマウスが、ネフローゼ症候群を呈することが報告されたが、尿細管での働きについての情報はきわめて限られている⁶⁾。CD2AP 自体は腎臓の糸球体上皮細胞に限らず、尿細管細胞にも発現しているが、その生理的意義や役割については、まだ不明な点が多い。近年、*in vitro* で尿細管細胞における CD2AP の局在や細胞骨格因子としての役割が報告されている⁷⁾。

今回、我々は尿細管の障害を誘発する腎虚血再灌流障害 (IRI) モデルを用いて、腎尿細管障害における CD2AP の役割について検討した。さらに、腎皮質集合管細胞由来の培養細胞で CD2AP を過剰発現し、関連する遺伝子群の検索を行った。

対象および方法

1. 実験動物とラットの腎虚血再灌流障害 (IRI) モデルの作製

対象として体重 200~250g, 12 週齢雄のウィスターラット (J1a, 東京) を用いた。ペントバルビタール (大日本製薬, 東京) を 50mg/kg 腹腔内投与麻酔下で開腹し, 両腎門部を剥離し, 血管クランプを用いて両側の腎動脈を 60 分間完全閉塞させた後開放し, 腎臓を再灌流した群を IRI 群とした。コントロールとして開腹のみ行い閉腹した群を sham 群とした。

再灌流前, 6・12 時間後, 1・3・10 日後に採血を行い, 血清クレアチニン (Cr) を測定後, 腎臓を摘出し, 液体窒素で急速凍結後 -80°C で保存し, RNA を抽出した。摘出した腎臓の一部は中性緩衝ホルマリン液で固定し, もう一部の腎臓は 4°C の 4% パラホルムアルデヒド (PFA) に 24 時間浸透させ固定し, OCT compound に包埋し急速凍結した。

すべての動物実験は東京女子医科大学動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 03-07), NIH の実験動物の使用ガイドラインに準拠して施行した。

2. 免疫組織学的検討

15% の中性緩衝ホルマリン液で固定した標本は, パラフィン包埋後 3μm の厚さの切片を作製し, HE 染色で病理組織学的検討を行った。

また, 腎組織の凍結切片を用いて, 免疫組織学的に検討した。0.15%BSA 加 PBS で 15 分間インキュベートした後, 2,000 倍に希釈した抗 CD2AP ラビットポリクローナル抗体 (anti-CD2AP Ab, Dr. Somlo より供与) を使用し, 室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後, 二次抗体として FITC 標識抗ラビット IgG 抗血清 (Alexa Fluor 488 rabbit anti-goat IgG (H+L), Molecular Probes, 東京) を用い, 蛍光抗体間接法による免疫組織染色を行った。

3. 蛋白の調製と Western blotting 法

各々の腎臓 1/2 および M1 培養細胞をサンプルとして, homogenization buffer (20mM Tris buffer pH 7.5, 1mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 10μg/ml aprotinin, 2 mM DL-dithiothreitol, 1% polyoxyethylene sorbitan monolaurate, 1mM ethylenediamine tetraacetate) でホモジェナイズした後, 5,000rpm 10 分間遠心し上清を分離した。蛋白濃度を測定し, 100μg と sample buffer とを混合し, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE: Readygels J, BIO-RAD Japan, 東京) で電

Table 1 Gene profiles, apoptosis and cell proliferation molecules

Symbol	Acc. No.	Symbol	Acc. No.
14-3-3beta	AF058797	FADD	U43184
Art1	NM09652	FASANT	M83649
APAF1	NM009684	FKHR	AF126056
ASK1	AB006787	FODA	X12801
ATF3	NM007498	GADD45	L28177
ATF4	M94087	GAS	M21828
Bad	NM007522	Gsk3b	NM019827
Bax	NM007527	Hif1a	NM010431
Bcl2	NM009741	ICAD-L	AB009375
Bcl-w	NM007537	Ikbke	NM019777
Bcl-XL	NM009743	IKKbeta	AF026524
Bid	NM007544	JNK1	AB005663
Bid3	NM007545	LAMINNA	J04064
BimEL	AF032459	Mafb	XM110688
B-Raf	M64429	MCL-1	U35623
CAD	AB009377	Mdm2	U47934
Casp12	NM009808	MEK	L02526
Casp3	NM009810	MKK7	U93030
Casp6	NM009811	NFKB1	NM008689
Casp7	NM007611	NIK	U88984
Casp8	XM129752	p16INK4	NM009877
Casp9	NM015733	p19	U20497
Ccnd1	NM007631	p21	U24173
CDC2	X16461	p27kip	NM009875
CDC25A	U27323	p53	M13872
CDK2	NM016756	p90RSK	XM123003
CHK1	AF016583	PARP	AF072521
c-Maf	AK033026	PDK1	AF086625
Cradd	NM009950	P13K	AB008792
CREB	M95106	PKC-alpha	M25811
CYCE	X75888	RAIDD	AJ224738
CYCLA	Z26580	Rb1	NM009029
CYCLB	X58708	Ripk1	NM009068
Cyts	NM007808	Stat1	NM009283
DPI	X72310	Stat3	BC019168
E2F1A	L21973	TRAF2	L35303
ERK1	Z14249	Wee1	NM009516

気泳動を行った。ゲルを PVDF 膜に転写後, blocking buffer (3% スキムミルク/PBS) で 1 時間ブロックし, 一次抗体液 anti-CD2AP Ab を 3% スキムミルク/0.3% Tween 20/PBS に 2,000 倍希釈して使用した。PBS で洗浄後, 二次抗体 horseradish peroxidase-conjugated, goat anti rabbit IgG (Dako Cytomation Glostrup, Denmark) を一次抗体と同様に希釈して使用した。洗浄後, バンドは ECL (Amersham Biosciences Piscataway, NJ, USA) を用いて可視化し, densitometry を用いて, 比較的に定量化した。

4. 細胞培養と CD2AP 過剰発現の方法

M1 細胞 (ATCC) は 10%FCS/F12/DMEM 培地 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) を基礎培地と

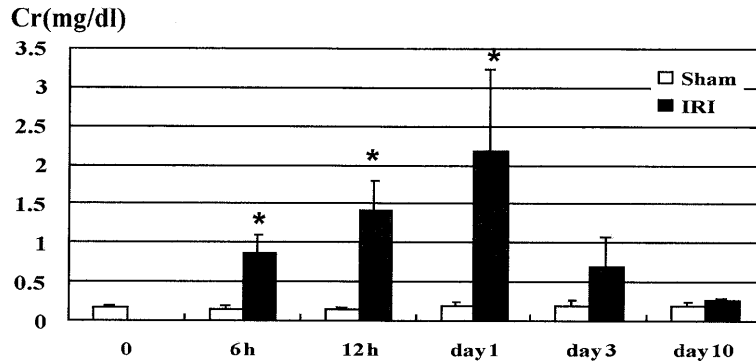


Fig. 1 Serum concentrations of creatinine
Serum creatinine (mg/dl) was significantly increased in IRI rats. Data was given as mean \pm SD (n=5). *p<0.05 compared with sham operation rat.

し、細胞は5%CO₂ 37°Cの条件下で培養した。

CD2AP full length は、mouse kidney total RNA (BD Biosciences Clontech Palo Alto, CA, USA) を用い RT-PCR 法により cDNA を作製し、pcDNA3.1 vector (Invitrogen) にサブクローニングした。この CD2AP 遺伝子およびコントロールの pcDNA3.1 は 50%confluent になった M1 細胞に lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて強制発現をし、24 時間後に RNA および蛋白を抽出した。

5. RNA の調製と real-time PCR 法

CD2AP mRNA 発現の評価のためラットの塩基配列から primer を以下のように設計、作製した。ラット CD2AP primer, forward; 5'-TGG TAG CCA GGA ACT CAA AAG-3', reverse; 5'-TGG AGA ATG TCC ACC ATT GA-3'.

さらに、CD2AP の過剰発現による発現遺伝子 profile の変化を検討した。その際に、あらかじめ Table 1 のような細胞外マトリックス、アポトーシスなどに関わる既知の遺伝子群の real time PCR 用の primer セットを作製した。

ラットの腎臓および M1 細胞は TRIzol を用い、プロトコールに準じて mRNA の抽出を行い、実験に用いるまで -20°C で保存した。それぞれ腎臓および M1 細胞の total RNA (2 μ g) を鋳型とし、Superscript II (Invitrogen) を用い、逆転写酵素反応 (RT) を行い cDNA を合成した。Real time PCR は各々の cDNA を鋳型とし、SYBR green PCR 反応液 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、PRISM 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems) で反応を施行した。mRNA のレベルは GAPDH を用いて標準化した。

6. 統計学的処理

数値は平均 \pm 標準誤差で示した。群間の変化は unpaired Student's test で検討した。p<0.05 を統計学的に有意とした。

結 果

1. IRI 群の血清クレアチニン (Cr)

Fig. 1 に IRI 群および Sham 群における血清 Cr を虚血再灌流後 day 0 から経時的に示した。IRI 群の血清 Cr は 6h から day 1 まで経時的に徐々に上昇を認め、その後 day 10 には正常値まで低下した。これらは Sham 群の血清 Cr と比較して有意差が認められた。

2. IRI モデルラットにおける CD2AP 発現の検討

1) CD2AP の mRNA レベルでの発現

IRI 群および Sham 群各々の腎臓の CD2AP の mRNA 発現を real-time PCR 法により検討した。mRNA の発現は対象とした Sham 群に比較して 6h から有意に増加し day 1 まで持続した。day 3 までにはその発現は Sham 群と同程度まで低下した (Fig. 2)。

2) CD2AP の蛋白レベルでの発現

さらに、各々の腎臓での CD2AP 蛋白の発現を検討した (Fig. 3)。ラット腎臓における CD2AP はマウス同様約 85kDa のサイズにバンドが検出された。IRI 群腎臓における CD2AP の発現は Sham 群の蛋白発現量に比べて 6 および 12 h では約 2 倍、day 1 では約 3.5 倍まで増加しその peak に達した。その後も day 3, 10 でも依然として約 3 倍の CD2AP 発現量の増加が観察された。各蛋白発現量は Sham 群に比較して有意に増加していた (p<0.05)。

3. 病理組織学的検討

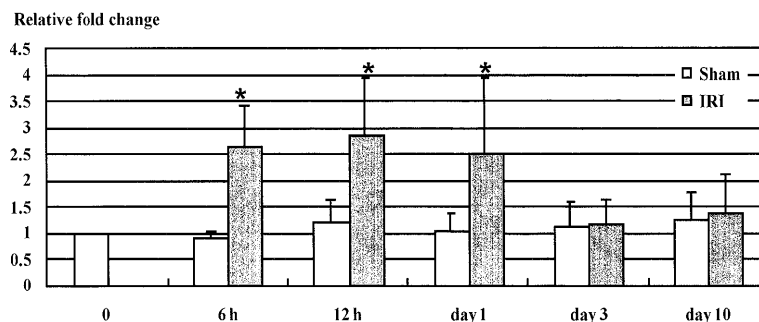


Fig. 2 Regulation of CD2AP mRNA expression in the ischemic reperfusion kidney

CD2AP expression was increased in the post-ischemic reperfusion kidney by up to 4-fold at 6-24 h. The peak in expression was at 24 h after ischemia reperfusion and the expression returned to normal range within 3 days after reperfusion.

n = 5, *p < 0.05 compared with sham operation rat.



B. Relative ratio of CD2AP expression

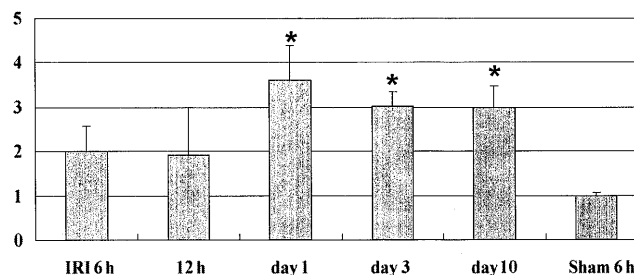


Fig. 3 Regulation of CD2AP protein expression in the ischemic reperfusion kidney

CD2AP expression was increased in the ischemic reperfusion kidney by up to 3.5-fold at 6 h to day 10. The peak in expression was at 24 h after ischemia reperfusion.

n = 6, *p < 0.05 compared with sham operation rat.

1) HE 染色

IRI 群の腎組織標本の HE 染色を Fig. 4A に示した。day 0 に比較し day 1 では尿細管上皮細胞(主に近位)の腫脹, brush border の乱れと消失, 空砲変性や脂肪滴の出現が観察され, 急性尿細管壊死(ATN)像を呈していた。その他, 間質の浮腫, 好中球やリンパ球など様々な細胞浸潤や赤血球円柱の形成なども観察された。day 3 の HE 染色標本では依然として尿細管腔内に赤血球円柱がみられ, 細胞分裂像や暗調でやや大きい核を有する細胞の密在など上皮細胞の再生像が観察されたが, day 10 ではほぼ

正常化した。

2) 免疫組織学的検討

Sham 群腎組織において CD2AP は糸球体の podocyte および近位・遠位尿細管上皮細胞・集合管に強く発現を認め, メサンギウム細胞, 内皮細胞は陰性であった。これらの発現の局在はマウスでの CD2AP 発現部位と同様であった。12h, day 1, 3 いずれも CD2AP の発現の局在に変化は認めなかったが, Sham 群に比較して尿細管での CD2AP の発現の増加は明らかであった (Fig. 4B)。

4. CD2AP を強制発現した M1 細胞におけるア

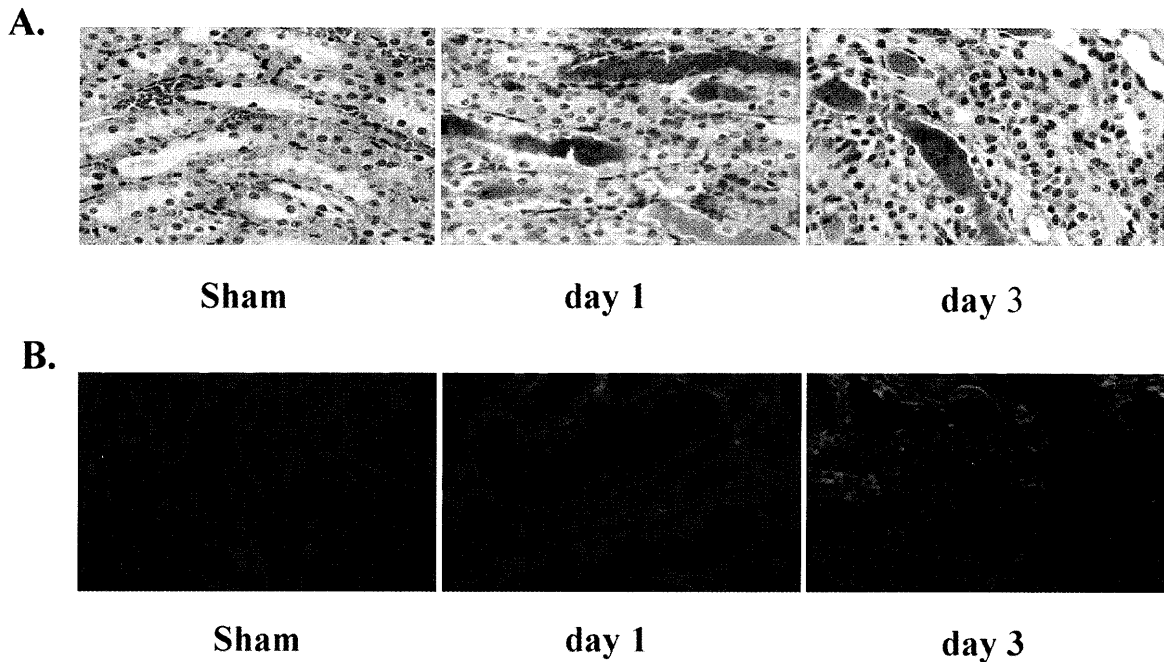


Fig. 4 HE staining (A) and immunohistochemistry using anti-CD2AP antibody (B) of the rat kidney following ischemia ($\times 200$)

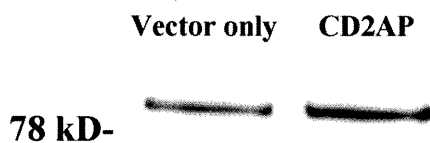


Fig. 5 Western blotting of CD2AP over-expressing M1 cells

ポトーシス, 細胞増殖関連遺伝子発現の検討

CD2AP が強制発現されているかどうかを確認するために SDS-PAGE で, 実際の CD2AP の蛋白レベルを Western blotting で示した (Fig. 5). コントロールとしては vector のみを CD2AP full length と同条件下で強制発現した M1 細胞を使用した. 約 85kDa の所に CD2AP のバンドは検出され, CD2AP を強制発現した M1 細胞で CD2AP の発現量が多いことが確認された. CD2AP を強制発現した M1 細胞およびコントロールにおいて, 各種のアポトーシス, 細胞増殖に関連する遺伝子の primer set を用いた real-time PCR 法を施行し, それらの mRNA レベルでの発現を検討した (Table 1).

アポトーシス関連遺伝子として 8 種類の遺伝子, Bcl-2, B-Raf, caspase 12, caspase 3, caspase 8, CHK1, Fas, PDK1 でコントロールと比較して mRNA レベルでの発現が減少していた. また, 細胞

増殖関連遺伝子のうち CDC2 がコントロールと比較して同様に減少していた (Table 2).

考 察

CD2AP は約 85kDa の細胞質内蛋白で, T 細胞およびナチュラルキラー細胞の特異的な膜蛋白である CD2 の cytoplasmic site と結合し, 相互作用をする蛋白として同定された. CD2AP は T 細胞と抗原提示細胞との細胞間接着を安定化させる機能を持ち, 細胞骨格の調節を行うものと考えられている. さらに CD2AP は血球, リンパ球系にとどまらず, 広くその発現が確認された. また, CD2AP の構造上, 異なる domain は, それぞれに異なる蛋白との結合能を持つとされている. すなわち CD2AP は多くの他の蛋白の関連蛋白となり得る構造を持ち, 様々な役割を担う可能性が示唆される.

特に腎臓では, 糸球体上皮細胞での局在が指摘され, Shih らの報告によると, CD2AP ノックアウトマウスは生後 1~2 週は正常で, その後蛋白尿の出現を認め, ネフローゼ症候群を発症し, 6~7 週までに腎不全により死に至るとされている⁶⁾. CD2AP との関連蛋白として挙げられるのは先の nephrin, podocin などの糸球体上皮の細胞骨格蛋白に加え, アポトーシス関連遺伝子である P13K⁸⁾, AKT, Bcl2 family の一つである Bad も, CD2AP の機能を考え

Table 2 The altered genes in CD2AP over-expressing M1 cells

Symbol	Acc. No.	Definition of altered genes
Regulation apoptosis		
Bcl2	NM009741	Mus musculus B-cell leukemia/lymphoma 2 (Bcl2), mRNA
B-Raf	M64429	Mouse B-raf oncogene mRNA, complete cds
caspase 12	NM009808	Mus musculus caspase 12 (Casp12), mRNA
caspase 3	NM009810	Mus musculus caspase 3, apoptosis related cysteine protease, mRNA
caspase 8	XM129752	Mus musculus caspase 8 (Casp8), mRNA
CHK1	AF016583	Mus musculus checkpoint kinase Chk1 (Chk1) mRNA, complete cds
Fas	M83649	Mus musculus Fas antigen mRNA, complete cds
PDK1	AF086625	Mus musculus phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1 mRNA
Cell proliferation factor		
CDC2	X16461	Mouse cdc2 mRNA for CDC2 kinase

る上でも重要と考えられる。

Huberらは、糸球体上皮細胞において nephrin, podocin とともに CD2AP は P13K/AKT-dependent signal transduction に関与すると報告している⁹⁾。また、他の関連蛋白としては、proto-oncoprotein : c-Cbl¹⁰⁾¹¹⁾, F-actin¹²⁾, cortactin¹³⁾や actin-capping protein : CAPZ¹⁴⁾などや、また細胞骨格への直接的な作用も報告されている⁷⁾。

一方、CD2AP の腎での局在部位は糸球体上皮細胞以外に、遠位尿細管上皮細胞、集合管に強く発現しているが、その作用は依然明らかではない¹⁵⁾。こうした報告から、CD2AP は腎尿細管においても、骨格蛋白やあるいは機能蛋白との相互作用を持つことは十分想定される。

そこで、今回我々はラット腎虚血再灌流モデルを用いて、腎尿細管障害における CD2AP 遺伝子の発現について検討した。さらに、腎皮質集合管細胞由来の M1 細胞に CD2AP を強制発現し、アポトーシス関連遺伝子および細胞増殖関連遺伝子の発現を観察した。現在 IRI では、アポトーシスを含む細胞死とその修復、増殖の過程と、炎症機転の大きな二つがその進行に関与するとされている¹⁶⁾¹⁷⁾。今回は、尿細管由来の細胞での発現量を過剰発現することで、*in vitro* の系で細胞自体の障害および修復過程に関わる因子に焦点を絞り、直接的な CD2AP に関連すると推測される遺伝子を検討した。

IRI モデルラットにおける CD2AP の発現は、mRNA が 6 h からすでに上昇し、day 1 から day 10 まで蛋白レベルでの増加が観察された。mRNA の発現の時相に対して、蛋白発現が持続したことは、Western blotting は蛋白量の反映で、必ずしも産生過程を示していないことも、この要因と考えられる。

さらに、組織の修復過程では、過剰発現した蛋白が remodeling など、何らかの機能的意義を有していることも推測し、その結果として CD2AP の蛋白発現量の持続を示したと考えられた。

一般的に、IRI モデルにおける急性腎不全の経過において重要なメカニズムは、細胞骨格の調節と細胞膜の polarity の調節であるといわれており、最近の研究ではそれらが同時期に起こっていない可能性が報告されている。Waldらは、腎虚血再灌流障害モデルラットにおける実験系で day 3 には brush border の F-actin などは大部分回復するのに対し、day 8 あるいはそれ以降まで γ -tubulin のシグナルは確認されず、細胞膜の polarity の回復は遅れていると報告している¹⁸⁾。IRI 後に血清 Cr が正常化し、病理学的に細胞障害の回復を認める時期にも何らかの因子および蛋白が機能的意義をもって過剰発現している可能性が示唆される。しかしながら、CD2AP の過剰発現の正確な意義は今後の検討が必要である。

IRI モデルの経過中回復期における CD2AP 蛋白の発現増加は、CD2AP が細胞の修復および再生の過程に関与する可能性が示唆された。さらに、CD2AP がその他の骨格蛋白やあるいは機能蛋白との相互作用を持つ可能性も示唆された。

IRI モデルにおいて CD2AP の誘導が認められたことから、我々は尿細管由来の M1 細胞を用いて CD2AP を強制発現することで、その発現レベルが変化する関連遺伝子を検索した。実際には、real-time PCR 法を用いて、あらかじめ用意した primer set でアポトーシスおよび細胞増殖に関連する遺伝子の発現の変化を検討した。

CD2AP を強制発現した細胞では、8 種類のアポトーシス関連遺伝子で低下が観察され、CD2AP は

これらの遺伝子を抑制することで、細胞の修復および再生に関与することが示唆された (Table 2). 特に低下が著しかった B-Raf¹⁹⁾, caspase 12²⁰⁾ 両者とも細胞のアポトーシスに関連する遺伝子で、Raf family に属する B-Raf は Ras の標的蛋白質であり、さらにその下流では MAPK ERK kinase (MEK), extracellular signal-regulated kinase (ERK) を介して mitogen-activated protein kinase (MAPK) に至るシグナル伝達カスケードの存在が知られている²¹⁾²²⁾.

CD2AP は、Ras のもう一つの標的遺伝子である PI3K から AKT, Bad に至る系²³⁾のみならず、Ras から Raf, ERK に至る系とも直接的に関与する可能性が示唆された。また、caspase 12 は、哺乳類に 14 個ある caspase の内小胞体に特異的なアポトーシスに関与するとされ、さらに最近では小胞体ストレスにも Bcl-2 family が関与するとされている²⁴⁾。

また、CDC2 遺伝子は細胞周期における M (分裂) 期制御にかかわる蛋白質キナーゼの代表であり、G2 から M 期の移行期に特異的に活性化され、M 期の後期には不活化される²⁵⁾²⁶⁾。CD2AP は CDC 遺伝子を抑制することで細胞周期の調節により、腎虚血再灌流障害における防御に関与する可能性が示唆された。

糸球体上皮細胞に発現する CD2AP はスリット膜に裏打ちしている細胞骨格蛋白と位置付けされるが、尿細管細胞での CD2AP の局在は細胞膜のみならず、大部分は細胞質内である⁶⁾。細胞質では perinuclear pattern を示し、M1 細胞では小胞体のマーカーである protein disulfide isomerase (PDI) や多発性嚢胞腎の蛋白、polycystin-2 との colocalization も報告されている²⁷⁾。一つの事例として、多発性嚢胞腎では、polycystin の異常とともに、その進行にアポトーシスが関与していることが指摘されているが、CD2AP が polycystin の相互関係、アポトーシス関連遺伝子を介して嚢胞発生過程に関与している可能性も推測される。

尿細管細胞における CD2AP の役割を明らかにすることは、尿細管、間質の本来の生理機能に加えて、病態生理の機序解明に多くの情報をもたらすものと考えられる。

結 語

今回、腎虚血再灌流急性腎不全モデルラットにおいて、CD2AP はその発現の増加を認め、アポトーシス関連遺伝子を抑制することにより細胞修復および再生に関与する可能性が考えられた。さらに、培養

細胞における CD2AP の強制発現により、その作用に関与すると推測される幾つかの候補遺伝子が同定された。

稿を終えるにあたり、抗 CD2AP 抗体を提供して頂いた Dr. Xin Tian, Dr. Stephan Somlo (Yale University, USA) に深謝いたします。また、坪井真由子、寺岡敦子 研究補助員の協力を感謝いたします。

本研究費の一部は学術振興会科学研究費若手研究 (B) (西村佐代子, 課題番号 15790442) および基盤研究 (C) (土谷 健, 課題番号 15590862) によった。

文 献

- 1) Dustin LM, Olszowy WM, Holdorf DA et al: A novel adapter protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* **94**: 667-677, 1998
- 2) Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M et al: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* **1**: 575-582, 1998
- 3) Boute N, Gribouval O, Roselli S et al: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* **24**: 349-354, 2000
- 4) Kaplan JM, Kim SH, North KN et al: Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* **24**: 251-256, 2000
- 5) Mochizuki T, Wu G, Hayashi T et al: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* **272**: 1339-1342, 1996
- 6) Shih NY, Li J, Karpitskii V et al: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**: 312-315, 1999
- 7) Lehtonen S, Zhao F, Lehtonen E: CD2-associated protein directly interacts with the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**: F734-F743, 2002
- 8) Gout I, Middleton G, Adu J et al: Negative regulation of PI 3-kinase by Ruk, a novel adaptor protein. *EMBO J* **19**: 4015-4025, 2000
- 9) Huber TB, Hartleben B, Kim J et al: Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* **23**: 4917-4928, 2003
- 10) Kirsch KH, Georgescu MM, Shishido T et al: The adapter type protein CMS/CD2AP binds to the proto-oncogenic protein c-Cbl through a tyrosine phosphorylation-regulated Src homology 3 domain interaction. *J Biol Chem* **276**: 4957-4963, 2001
- 11) Kowanetz K, Szymkiewicz I, Haglund K et al: Identification of a novel proline-arginine motif involved in CIN85-dependent clustering of Cbl and down-regulation of epidermal growth factor receptors. *J Biol Chem* **278**: 39735-39746, 2003

- 12) **Welsch T, Endlich N, Kriz W et al:** CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F769–F777, 2001
- 13) **Lynch DK, Winata SC, Lyons RJ et al:** A cortactin-CD2-associated protein (CD2AP) complex provides a novel link between epidermal growth factor receptor endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**: 21805–21813, 2003
- 14) **Hutchings NJ, Clarkson N, Chalkley R et al:** Linking the T cell surface protein CD2 to the actin-capping protein CAPZ via CMS and CIN85. *J Biol Chem* **278**: 22396–22403, 2003
- 15) **Li C, Ruotsalainen V, Tryggvason K et al:** CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: 785–792, 2000
- 16) **Nony PA, Schnellmann RG:** Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 905–912, 2003
- 17) **Noiri E, Nakao A, Uchida K et al:** Oxidative and nitrosative stress in acute renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol* **281**: F948–F957, 2001
- 18) **Wald AF, Figueroa Y, Oriolo SA et al:** Membrane repolarization is delayed in proximal tubules after ischemia-reperfusion: possible role of microtubule-organizing centers. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**: F230–F240, 2003
- 19) **Davies H, Bignell GR, Cox C et al:** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**: 949–954, 2002
- 20) **Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al:** Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**: 98–103, 2002
- 21) **Bar-Sagi D, Hall A:** Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* **103**: 227–238, 2000
- 22) **Downward J:** Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 49–54, 1998
- 23) **Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E et al:** Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature* **385**: 544–548, 1997
- 24) **Wei MC, Zong WX, Cheng E et al:** Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**: 727–730, 2001
- 25) **Nigg EA:** Cellular substrates of p34 (cdc2) and its companion cyclin-dependent kinases. *Trends Cell Biol* **3**: 296–301, 1993
- 26) **Ookata K, Hisanaga S, Bulinski JC et al:** Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34cdc2 kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol* **128**: 849–862, 1995
- 27) **Lehtonen S, Ora A, Olkkonen VM et al:** In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type 2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2. *J Biol Chem* **275**: 32888–32893, 2000