

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

Die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sinja Ohlsson

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie ist der führende Grund für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz in industrialisierten Ländern und tritt mit einer Prävalenz von 30-40% bei Patienten mit Diabetes mellitus auf. Eine genomweite Assoziationsstudie identifizierte das *FRMD3* Gen, welches für das Protein 4.1O kodiert, als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie. Auch Untersuchungen an Zebrafischen mit einer Deletion des 4.1O Orthologs zeigten, dass der Verlust des 4.1O Orthologs zu einer abnormalen Podozytenfunktion mit großer Proteinurie führten. Das Protein 4.1O ist ein Mitglied der Proteinfamilie 4.1. Bei den Mitgliedern der Proteinfamilie 4.1 handelt es sich um Adapterproteine zwischen Membranproteinen und dem subkortikalen Aktin-Zytoskelett sowie Organisatoren des Zytoskelettes. Ein Expressionsnachweis des Proteins 4.1O gelang bislang nur aus Normalgewebe des Ovars und aus fetalem Skelettmuskel, Thymus und Gehirn.

Um die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten *in vitro* zu untersuchen, wurde eine konventionelle PCR zur Detektion des 4.1O Transkripts aus humanem Nierengewebe, humanen Podozyten und HEK293T-Zellen sowie Co-Immunopräzipitationen, Biotin-Assays und *Pulldown*-Assays cotransfizierter HEK293T-Zellen durchgeführt.

Mit der vorliegenden Arbeit gelang es erstmalig, die Expression des Proteins 4.1O in der humanen Niere und humanen Podozyten nachzuweisen. Weiterhin konnten Interaktionen mit bekannten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran wie Nephrin, NEPH1 und GLEPP1 sowie Interaktionen mit bekannten Proteinen des podozytären Zytoskelettes wie Aktin und IQGAP1 nachgewiesen werden. In Funktionsstudien zeigte sich, dass das Protein 4.1O unter hyperosmolaren Bedingungen die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 hemmte und keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte. Des Weiteren schwächte das Protein 4.1O unter hyperosmolaren Bedingungen die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 und verminderte die Phosphorylierung der Tyrosine Y1217, Y1176 und Y1193 von Nephrin.

Das Protein 4.1O konnte somit als ein neues Adapterprotein des Podozyten identifiziert werden, welches vermutlich ebenfalls eine lokale Organisation des Zytoskelettes übernehmen könnte. Es scheint nicht nur eine Bedeutung für die glomeruläre Schlitzmembran einerseits und das podozytäre Zytoskelett andererseits zu haben, sondern ist vielmehr verantwortlich für die strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen beiden Anteilen. Die Interaktion mit IQGAP1 ließ zudem auf eine Rolle in der Zellmigration schließen. Im Bezug auf die glomeruläre Schlitzmembran besaß das Protein 4.1O unter hypersomolaren Bedingungen eine protektive Funktion, da es die Interaktion von Nephrin und β -arrestin2 verminderte, die Funktion von Podocin ersetzte und keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte.

Abkürzungsverzeichnis

4.1	Bande 4.1 Protein	IP	Immunopräzipitation
4.1O	ovary type	kDa	Kilo-Dalton
4.1R	red blood cell type	LD-Motive	leucin riche Motive
4.1G	general type	LMA	low melting Agarose
4.1N	neuronal type	M	Molarität (mmol/l)
4.1B	brain type	mA	Milliampere
AA	Aminosäure	MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
Abb.	Abbildung	MCP1	Monocyten chemotaktisches Protein 1
APC	adenomatous polyposis coli	mM	Millimolar (mmol/L)
APS	Ammoniumperoxidisulfat	mol	Basiseinheit Stoffmenge
bp	Basenpaar	n	Stichprobenumfang
BSA	Bovine Serum Albumin	nck	non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1
CD2AP	CD2-associated protein	NEPH	Kin of IRRE-like protein 1
CIP	Phosphatase, Calf Intestinal	NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
CTerminus	Carboxy-Terminus	NPHS	Nephrin precursor homo sapiens
CTD	C-terminale Domäne	n.s.	nicht signifikant
cyt	zytoplasmatisch	NTerminus	AminoTerminus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	OD	Optische Dichte
DNA	Desoxyribonukleinsäure	p	kurzer Chromosomenarm
DTT	1,4-Dithiothreitol	p	Signifikanzwert
EC	Extrazellularraum	PBS	phosphate buffered saline
ECL	Elektrochemilumineszenz	PC3	Epitheliale Zell-Linie
ECV304	Epitheliale Zell-Linie	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
EDTA	Ethylenediamine-Tetraacetid	PKC	Proteinkinase C
eIF3	eukaryotic initiation factor 3	PM	Plasmamembran
F./ M2	flag tag/ Antikörper gegen F.	PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
FAD	FERM-adjacent-Domäne	PTPH	Rezeptor Membran Protein Tyrosin Phosphatase
FAK	Focal Adhesion Kinase	q	langer Chromosomenarm
FBS	Fetal Bovine Serum	RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem
Fc-Teil	kristallisierbares Fragment eines Antikörpers	RNA	Ribonukleinsäure
FERM	4.1-Ezrin-Radixin-Moesin	RP	Rückwärtsprimer
FP	Vorwärtsprimer	Rpm	rounds per minute
FRMD3	FERM-domain-containing 3	SABD	Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung	SDS	Sodium dodecyl Sulfat
GBM	Glomeruläre Basalmembran	SFK	src family Kinasen
GFP	grün fluoreszierendes Protein	SHD	src-homology-Domäne
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	slg	surface immunoglobulin
GLEPP1	glomerular epithelial protein 1	SNP	single nucleotide polymorphism
GST	Glutathion-S-Transferase	T	Threonin
HEBS	HEPES Buffered Saline	TGFβ	transforming growth factor β
HEK	Human Embryonic Kidney Cells	TNF	Tumornekrosefaktor
HRP	horseradish peroxidase	U	Umdrehungen
IC	Intrazellularraum	V	Volt
IgA/G	Immunglobulin A/G	WT	Wildtyp
IL	Interleukin	Y	Tyrosin
ILK	Integrin-linked Kinase	ZNS	Zentrales Nervensystem
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	ZO-2	Zonula occludens Protein 2

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die glomeruläre Filterbarriere	1
1.2	Der Podozyt	2
1.2.1	Die glomeruläre Schlitzmembran	3
1.2.1.1	Die Proteine der glomerulären Schlitzmembran	4
1.2.1.1.1	Das Protein Nephrin	4
1.2.1.1.2	Die Proteinfamilie NEPH	5
1.2.1.1.3	Das Protein Podocin	6
1.2.1.1.4	Das Protein β -arrestin2	7
1.2.1.1.5	Das Protein GLEPP1	7
1.2.1.2	Das Modell der dynamischen Regulation der Schlitzmembran	8
1.2.2	Das podozytäre Zytoskelett	10
1.2.2.1	Die Proteine des podozytären Zytoskelettes	12
1.2.2.1.1	Das Protein Paxillin	12
1.2.2.1.2	Das Protein IQGAP1	13
1.2.2.1.3	Die Proteinfamilie Nck	13
1.3	Die Proteinfamilie 4.1	14
1.4	Bisherige Erkenntnisse über das Protein 4.1O	17
1.4.1	Expression des Protein 4.1O	17
1.4.2	FRMD3, ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie	18
1.4.2.1	Grundlagen der diabetischen Nephropathie	18
1.4.2.2	Genomweite Assoziationsstudie zur diabetischen Nephropathie	19
1.4.3	Deletion des 4.1 Orthologs im Zebrafisch führt zu einer abnormen Podozytenfunktion	19
2	Ziele der Arbeit	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.1.1	Chemikalien	22
3.1.2	Geräte	23
3.1.3	Spezielle Materialien	24
3.1.3.1	Herstellung und Vervielfältigung rekombinater DNA und RNA Isolierung	24
3.1.3.2	Zellkultur	26
3.1.3.3	Transfektion	26
3.1.3.4	Zellernte, Co-Immunopräzipitation, Biotin Assay und Pulldown Assay	27
3.1.3.5	Western Blot	28
3.2	Methoden	30
3.2.1	Herstellung und Vervielfältigung rekombinater DNA	30
3.2.1.1	PCR	30
3.2.1.2	Restriktionsenzymverdau	31
3.2.1.3	Ligation	32
3.2.1.4	Transformation	33
3.2.1.5	DNA-Präparation	33

3.2.2	<i>RNA Isolation</i>	34
3.2.3	<i>Zellkultur</i>	34
3.2.4	<i>Transfektion</i>	35
3.2.5	<i>Zellernte</i>	35
3.2.6	<i>Co-Immunopräzipitation</i>	36
3.2.7	<i>Pulldown-Assay</i>	36
3.2.8	<i>Biotin-Assay</i>	37
3.2.9	<i>Western Blot</i>	38
3.2.9.1	SDS Gelelektrophorese.....	38
3.2.9.2	Tank-Blotting.....	39
3.2.9.3	Immunmarkierung.....	39
3.2.10	<i>Auswertung</i>	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Expression von 4.10 in humanen Podozyten	41
4.2	Die Rolle des Proteins 4.10 für die glomeruläre Schlitzmembran	43
4.2.1	<i>Interaktionsstudien</i>	43
4.2.1.1	4.10 interagiert mit Nephrin.....	43
4.2.1.2	4.10 interagiert mit NEPH1.....	46
4.2.1.3	4.10 interagiert mit GLEPP1.....	47
4.2.1.4	4.10 bildet Homodimere.....	50
4.2.2	<i>Funktionsstudien</i>	51
4.2.2.1	4.10 hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter hyperosmolaren Bedingungen.....	51
4.2.2.2	4.10 hat keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin.....	53
4.3	Die Rolle des Proteins 4.10 für das podozytäre Zytoskelett	54
4.3.1	<i>Interaktionsstudien</i>	54
4.3.1.1	4.10 bindet an G-Aktin.....	54
4.3.1.2	4.10 interagiert nicht mit Paxillin.....	55
4.3.1.3	4.10 interagiert mit IQGAP1.....	56
4.3.2	<i>Funktionsstudien</i>	58
4.3.2.1	4.10 hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2.....	58
4.3.2.2	4.10 hemmt die Phosphorylierung von Nephrin Y1217 und Y1176/1193.....	59
5	Diskussion und Schlussfolgerung	61
5.1	FRMD3, ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie	61
5.2	Die Rolle des Proteins 4.10 für die glomeruläre Schlitzmembran	63
5.2.1	<i>Protein 4.10 interagiert mit Nephrin</i>	63
5.2.2	<i>Protein 4.10 interagiert mit NEPH1</i>	64
5.2.3	<i>Protein 4.10 interagiert mit GLEPP1</i>	64
5.2.4	<i>Protein 4.10 nimmt Einfluss auf die dynamische Regulation der glomerulären Schlitzmembran</i>	65
5.3	Die Rolle des Proteins 4.10 für das podozytäre Zytoskelett	71
5.3.1	<i>Protein 4.10 ist ein Adapterprotein zwischen glomerulärer Schlitzmembran und Aktinzytoskelett</i>	71
5.3.2	<i>Protein 4.10 interagiert mit GLEPP1</i>	72
5.3.3	<i>Protein 4.10 interagiert mit IQGAP1</i>	73

5.3.4	<i>Protein 4.1O und fokale Adhäsionen</i>	73
5.3.5	<i>Protein 4.1O ersetzt die Funktion von Nck2 und hat Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Nephrin</i>	74
5.4	Schlussfolgerung	76
6	Abbildungsverzeichnis	78
7	Literaturverzeichnis	80
8	Anhang	96

1 Einleitung

1.1 Die glomeruläre Filterbarriere

Die Hauptaufgaben der Nieren sind die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie die Regulation des Volumen-, Elektrolyt-, Mineral- und Säure-Base Haushaltes und des Blutdrucks. Die Nieren bestehen aus etwa 2 Millionen Nephronen, die wiederum je aus einem Glomerulum und dem dazugehörigen Tubulussystem gebildet werden. Das Glomerulum ist ein Kapillarknäul, welches von der Bowman-Kapsel umgeben ist. Es stellt den Ort der Filtration von ca. 180 l zell- und albuminfreier Plasmaflüssigkeit (Primärharn) pro Tag dar. Im nachfolgenden Tubulussystem erfolgt sowohl die Resorption des filtrierten Wassers und der darin gelösten Stoffe als auch die Sekretion bestimmter Stoffe in das Tubulussystem, so dass am Ende ca. 1,5 l Endharn/Tag erzeugt werden (Lüllmann-Rauch 2006, Schmidt 2007). Die Aufgabe des Glomerulums als Filterbarriere ist es somit, den Verlust von Plasmaproteinen über den Urin zu verhindern. Die Selektion der filtrierten Makromoleküle erfolgt zum einen anhand der Größe, zum anderen anhand der Form und elektrischen Ladung (Rennke and Venkatachalam 1977). Dabei werden negativ geladene Moleküle stärker zurückgehalten als neutrale oder positiv geladene Moleküle (Chang, Deen et al. 1975, Bohrer, Baylis et al. 1978, Rennke, Patel et al. 1978). Die glomeruläre Filterbarriere an sich ist dabei aus drei Schichten aufgebaut: fenestriertes Kapillarendothel, glomeruläre Basalmembran und podozytäre Fußfortsätze mit der glomerulären Schlitzmembran (Arkill, Qvortrup et al. 2014). Das Endothel der glomerulären Kapillaren ist fenestriert (70-100 nm Durchmesser) und besitzt eine Glykokalix aus negativ geladenen Sialoproteinen und Proteoglykanen (Avasthi and Koshy 1988). Jeansson und Haraldsson konnten 2006 zeigen, dass ein Verlust der endothelialen Glykokalix zu einer verminderten Ladungsselektivität führt (Jeansson and Haraldsson 2006).

Dem Endothel liegt als nächste Schicht des glomerulären Filters die glomeruläre Basalmembran (GBM) an. Sie wird vornehmlich aus vernetztem Kollagen Typ IV (Kefalides 1971) und Laminin gebildet. Kollagen Typ IV und Laminin werden wiederum über Nidogen untereinander vernetzt (Aumailley, Wiedemann et al. 1989). Des Weiteren sind die Heperansulfat-Proteoglykane Perlecan und Agrin für eine negative Ladung der GBM verantwortlich und führen so zu einer Ladungsselektivität (Kanwar and Farquhar 1979, Groffen, Ruegg et al. 1998).

Zahlreiche Studien und Reviews schreiben jedoch die entscheidende Rolle in der Funktion des glomerulären Filters der dritten Schicht zu. Diese wird durch Podozyten gebildet, zwischen deren Fußfortsätzen sich die glomeruläre Schlitzmembran befindet (Daniels 1993, Drumond and Deen 1994, Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Haraldsson and Sorensson 2004,

Tryggvason, Patrakka et al. 2006). Edward et al. zeigten 1999, dass die glomeruläre Schlitzmembran hauptsächlich für die Größenselektivität verantwortlich ist (Edwards, Daniels et al. 1999). Die Filtration größerer Proteine wie Ferritin wird zwar bereits durch die glomeruläre Basalmembran begrenzt, die glomeruläre Schlitzmembran verhindert jedoch den Übertritt kleinerer Proteine wie beispielsweise Albumin und stellt somit die finale größenselektive Barriere dar (Farquhar, Wissig et al. 1961, Graham and Karnovsky 1966, Venkatachalam, Cotran et al. 1970). Ebenso wie die Endothelzellen sind auch die Podozyten von einer anionischen Glykokalix bedeckt, die zusätzlich für eine Ladungsselektivität sorgt (Kerjaschki, Sharkey et al. 1984). Da sowohl der Podozyt als auch die glomeruläre Schlitzmembran für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind, werden Aufbau und Funktion im Folgenden genauer beschrieben.

1.2 Der Podozyt

Podozyten sind hochdifferenzierte epitheliale Zellen, deren Zellkörper der glomerulären Basalmembran anliegen und in den Harnraum des Glomerulums hinein ragen (McGregor 1929). Sie entsenden primäre Fortsätze, die sich um die glomerulären Kapillaren schlingen und wiederum zahlreiche sekundäre Fußfortsätze bilden. Die sekundären Fußfortsätze der benachbarten Podozyten verzahnen sich fingerartig miteinander, so dass nur schmale Schlitzze zwischen den Fußfortsätzen verbleiben (Arakawa 1971). Hier bilden extrazelluläre Strukturen die glomeruläre Schlitzmembran aus (Rodewald and Karnovsky 1974). Der Podozyt wird in drei Bereiche eingeteilt: die basale, die apikale/luminale und die laterale Membrandomäne (Kerjaschki 2001, Pavenstadt, Kriz et al. 2003).

Im Bereich der basalen Membrandomäne ist der Podozyt über Komplexe aus verschiedenen Adhäsionsproteinen mit der GBM vernetzt (Kerjaschki 2001). Ein wichtiges Beispiel ist das Protein Integrin $\alpha_3\beta_1$, welches die GBM über cytoplasmatische Proteine wie Paxillin, Talin und Vinculin an das Aktin-Zytoskelett des Podozyten bindet (Drenckhahn and Franke 1988, Kerjaschki, Ojha et al. 1989). Ein weiteres Beispiel sind die Dystrophin-Glykoprotein-Komplexe. Laminine der GBM werden über Dystroglykan und Utrophin an das Aktin-Zytoskelett gebunden (Raats, van den Born et al. 2000).

Im Bereich der lateralen Membrandomäne bildet sich die glomeruläre Schlitzmembran aus und stellt eine Trennlinie zwischen basalem und apikalem Bereich des Podozyten dar (Rodewald and Karnovsky 1974).

Die apikale/luminale Membrandomäne ist von einer anionischen Glykokalix aus Sialoproteinen und Proteoglykanen, wie beispielsweise Podocalyxin und Podoendin bedeckt (Huang and Langlois 1985, Sawada, Stukenbrok et al. 1986).

Die beschriebenen Zusammenhänge sind in Kapitel 1.2.2 *Das podozytäre Zytoskelett* mit einer Abbildung veranschaulicht (Abb. 3).

1.2.1 *Die glomeruläre Schlitzmembran*

Das erste Modell zum Aufbau der glomerulären Schlitzmembran entstand bereits 1974 durch die Untersuchungen von Rodewald und Karnovsky. Sie beschrieben die Schlitzmembran als eine poröse, reißverschlussähnliche Struktur zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten. Die Poren der Schlitzmembran wurden auf eine Größe von 4 x 14 nm geschätzt und lagen damit unter der Größe von Albumin (Rodewald and Karnovsky 1974). Heutzutage geht man davon aus, dass die glomeruläre Schlitzmembran ein hochspezialisierter, interzellulärer Zellkontakt ist, der aus einem dynamischen Multiproteinkomplex zwischen den gegenüberliegenden Fußfortsätzen gebildet wird (Abb. 1). Die Organisation der Schlitzmembran scheint darüber hinaus durch ein intrazelluläres Signalnetzwerk zu funktionieren, an dem eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine als Adapter zum Aktin-Zytoskelett des Podozyten oder als Signalmoleküle beteiligt sind (Benzing 2004, Huber and Benzing 2005, Tryggvason, Patrakka et al. 2006).

Ein grundlegendes Protein der Schlitzmembran ist Nephrin. Man geht davon aus, dass die extrazellulären Anteile von Nephrin im zentralen Bereich der Schlitzmembran überlappen und interagieren. Seitlich des zentralen Bereiches bilden sich so Poren zwischen den benachbarten Nephrinmolekülen eines Podozyten, durch die eine Filtration stattfindet (Tryggvason 1999, Khoshnoodi, Sigmundsson et al. 2003). Außerdem wurden fortlaufend weitere Proteine identifiziert, die an der Bildung der glomerulären Schlitzmembran beteiligt sind. Zu ihnen gehören unter anderem Proteine wie NEPH1,-2 und -3, CD2AP, Zonula Occludens 1 (ZO-1), P-Cadherin, Podocin, und FAT1 (Schnabel, Anderson et al. 1990, Reiser, Kriz et al. 2000, Inoue, Yaoita et al. 2001, Shih, Li et al. 2001, Roselli, Gribouval et al. 2002, Gerke, Huber et al. 2003, Sellin, Huber et al. 2003, Gerke, Sellin et al. 2005). Bei der Schädigung des Podozyten, Störung des Komplexes der glomerulären Schlitzmembran oder Verlust einzelner Proteine kommt es zu einer verminderten Integrität des Filters mit Verlust von Plasmaproteinen über den Urin (Laurens, Battaglia et al. 1995, Kestila, Lenkkeri et al. 1998, Donoviel, Freed et al. 2001). Vor allem die verminderte Expression von Nephrinmolekülen auf der Oberfläche des Podozyten scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Glomerulopathien mit Proteinurie zu spielen (Furness, Hall et al. 1999, Patrakka, Ruotsalainen et al. 2001, Kim, Hong et al. 2002). Das Symptom der Proteinurie ist somit in erster Linie ein Kennzeichen für eine Schädigung des Podozyten und der glomerulären Schlitzmembran und ein prognostischer Marker für den Verlauf einer Nieren-erkrankung

(Peterson, Adler et al. 1995). Des Weiteren geht eine Proteinurie mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer erhöhten Gesamtmortalität einher (Kalaitzidis and Bakris 2009, Klausen, Parving et al. 2009).

Die verschiedenen Proteine der glomerulären Schlitzmembran haben für diese Arbeit eine besondere Relevanz, weshalb sie im Folgenden ausführlich besprochen werden.

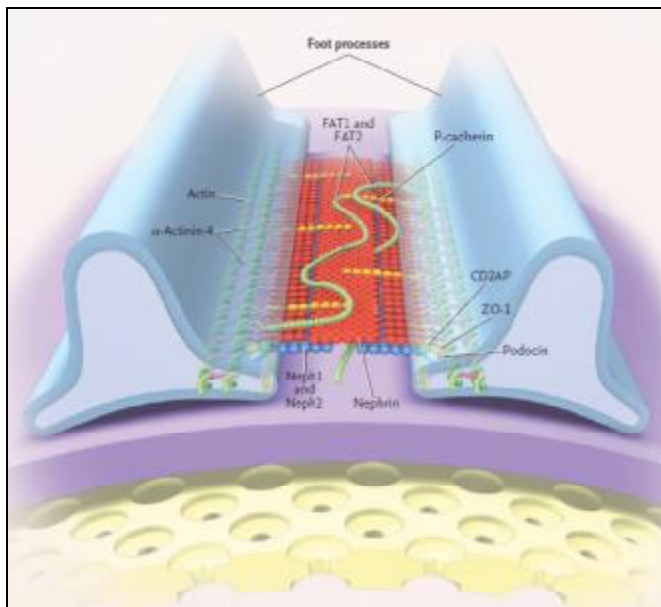


Abb. 1: Darstellung des Proteinkomplexes, welcher die glomeruläre Schlitzmembran bildet.

Die glomeruläre Schlitzmembran ist ein hochspezialisierter, interzellulärer Zellkontakt, der aus einem dynamischen Multiproteinkomplex zwischen den gegenüberliegenden Fußfortsätzen gebildet wird. Die extrazellulären Anteile von Nephrin überlappen und interagieren im zentralen Bereich der Schlitzmembran. Seitlich des zentralen Bereiches bilden sich so Poren zwischen den benachbarten Nephrinmolekülen eines Podozyten, durch die Filtration stattfindet. Die intrazellulären Anteile sind über Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Neben Nephrin sind weitere Proteine wie zum Beispiel Neph1 und 2, FAT1 und 2, P-Cadherin, CD2AP, ZO1 und Podocin an der Bildung der Schlitzmembran beteiligt. (Quelle: Tryggvason, K., Patrakka, J. & Wartiovaara, J. 2006. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354, 1387-401; Reproduced with permission from (scientific reference citation), Copyright Massachusetts Medical Society)

1.2.1.1 Die Proteine der glomerulären Schlitzmembran

1.2.1.1.1 Das Protein Nephrin

Kestilä et al. identifizierten 1998 das *NPHS1*-Gen auf Chromosom 19q13.1, welches für Nephrin codiert und legten so einen wichtigen Grundstein für das Verständnis der glomerulären Schlitzmembran (Kestilä, Lenkkeri et al. 1998). Autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im *NPHS1*-Gen führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (syn.

NPHS1) und damit zu massiver intrauteriner Proteinurie, dem Vollbild eines nephrotischen Syndroms bereits kurz nach der Geburt und einer Letalität innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Huttunen 1976, Kestila, Lenkkeri et al. 1998). Es folgten daraufhin Untersuchungen, die zeigen konnten, dass Nephrin in der Niere ausschließlich von Podozyten exprimiert wird und im Bereich der glomerulären Schlitzmembran lokalisiert ist (Holthofer, Ahola et al. 1999, Holzman, St John et al. 1999, Ruotsalainen, Ljungberg et al. 1999). Patrakka et al. fanden bei ihren Untersuchungen an 46 Patienten mit *NPHS1* Mutation einen Verlust von funktionellem Nephrin, wodurch keine normal ausgebildete Schlitzmembran nachweisbar war. Zudem waren die podozytären Fußfortsätze verschmolzen (Patrikka, Kestila et al. 2000).

Seither konnte Nephrin als ein 185 kDa schweres Typ I Transmembranprotein aus der Immunglobulin-Superfamilie beschrieben werden. Nephrin besteht aus einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, einer transmembranären Domäne und einer N-terminalen extrazellulären Domäne, die wiederum aus acht IgG-ähnlichen Domänen und einer proximal gelegenen Fibronektin Typ III-ähnlichen Domäne besteht (Kestila, Lenkkeri et al. 1998, Holzman, St John et al. 1999, Tryggvason 1999, Tryggvason, Patrakka et al. 2006). Die extrazellulären Domänen der gegenüberliegenden Nephrinmoleküle interagieren dabei homophil miteinander und bilden so die Grundstruktur der glomerulären Schlitzmembran (Gerke, Huber et al. 2003, Khoshnoodi, Sigmundsson et al. 2003). Der zytoplasmatische Anteil umfasst den Aminosäurebereich von 1087-1241. Es finden sich insgesamt neun Tyrosine, die durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung als Bindungsstellen für intrazelluläre Adapterproteine und Signalmoleküle dienen und dadurch intrazelluläre Signal-kaskaden beeinflussen (Benzing 2004).

1.2.1.1.2 Die Proteinfamilie NEPH

Die NEPH (Kind of IRRE-like protein 1)- Proteinfamilie umfasst die Transmembranproteine NEPH1, NEPH2 und NEPH3 (syn. Filtrin). Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu Nephrin auf und bestehen aus einer kurzen C-terminalen intrazellulären Domäne aus etwa 198-235 Aminosäuren, einer transmembranären Domäne und einer N-terminalen extrazellulären Domäne, die wiederum aus fünf IgG-ähnlichen Domänen aufgebaut ist. Sellin et al. konnten die Expression aller 3 Formen in der humanen Niere und humanen Podozyten nachweisen (Sellin, Huber et al. 2003). Für NEPH1 und 2 konnte je eine Homodimerisierung im Bereich der extrazellulären Domäne nachgewiesen werden, jedoch findet sich keine Interaktion zwischen NEPH1 und NEPH2 miteinander. Darüber hinaus bilden NEPH1 und 2 Heterodimere mit den extrazellulären Anteilen von Nephrin und sind Bestandteil der glomerulären Schlitz-

membran. Die Rolle von NEPH3 ist bisher ungeklärt (Gerke, Huber et al. 2003, Gerke, Sellin et al. 2005).

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung der NEPH-Familie für die glomeruläre Schlitzmembran lieferte Donoviel 2001, indem er zeigte, dass *NEPH1* *-/- knockout*-Mäuse eine deutliche Proteinurie und erhöhte perinatale Letalität gegenüber der Kontrolle aufwiesen (Donoviel, Freed et al. 2001).

1.2.1.1.3 Das Protein Podocin

Boute et al. identifizierte das 42 kDa schwere Protein Podocin, welches der Stomatin-Proteinfamilie angehört. Typisch für diese integralen Membranproteine ist ihre haarnadel-ähnliche Struktur, bei der sich sowohl das N-terminale als auch das C-terminale Ende intrazellulär befinden (Boute, Gribouval et al. 2000). Podocin wird durch das *NPHS2*-Gen auf Chromosom 1q25-q31 codiert. Autosomal-rezessive Mutationen in diesem Gen führen zu einer Unterform des hereditären steroid-resistenten nephrotischen Syndroms. Die Patienten entwickeln eine Proteinurie unmittelbar nach der Geburt und im Verlauf ein nephrotisches Syndrom mit Progredienz bis zur terminalen Niereninsuffizienz (Fuchshuber, Jean et al. 1995, Boute, Gribouval et al. 2000).

Weiterhin konnte durch Roselli et al. 2002 gezeigt werden, dass Podocin in der lateralen Membrandomäne des Podozyten, also im Bereich der Ansatzstelle der Schlitzmembran, exprimiert wird (Roselli, Gribouval et al. 2002). Podocin ist dabei im Bereich von „*lipid rafts*“ lokalisiert (Schwarz, Simons et al. 2001). *Lipid rafts* sind spezialisierte Mikrodomänen der Zellmembran, die eine spezielle Lipidzusammensetzung aufweisen und so eine Umgebung für wichtige zelluläre Prozesse zur Verfügung stellen (Kurzchalia and Parton 1999, Smart, Graf et al. 1999).

Podocin interagiert mit Proteinen wie Nephrin, CD2AP (Schwarz, Simons et al. 2001) und NEPH1 (Sellin, Huber et al. 2003) und hat eine entscheidende Funktion in der intrazellulären Signaltransduktion und Regulation der Schlitzmembran. Huber et al. zeigten 2003, dass Podocin Nephrin in den Bereich der *lipid rafts* rekrutiert und dadurch entscheidend für die Signalfunktionen von Nephrin ist (Huber, Simons et al. 2003). Podocin hat damit einen wesentlichen Anteil an der dynamischen Regulation der Schlitzmembran. Die Bindungsstelle für die Podocin/Nephrin Interaktion liegt im Bereich der Aminosäuren 1183-1208 von Nephrin (Quack, Rump et al. 2006).

1.2.1.1.4 Das Protein β -arrestin2

Das 46 kDa schwere Protein β -arrestin2 ist eines der vier Mitglieder der Arrestinfamilie. Neben β -arrestin1 und β -arrestin2 existieren noch visual-arrestin und cone-arrestin. Während visual arrestin und cone arrestin nur in der Retina und der Glandula pinealis vorkommen (Shinohara, Dietzschold et al. 1987, Craft, Whitmore et al. 1994, Smith 1996), werden die β -arrestine ubiquitär exprimiert (Lohse, Benovic et al. 1990, Attramadal, Arriza et al. 1992). Die β -arrestine sind unter anderem bekannt für ihre Interaktion mit G-Protein gekoppelten 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren und führen zu deren Desensibilisierung und Clathrin vermittelten Endozytose (Lohse, Benovic et al. 1990, Attramadal, Arriza et al. 1992, Laporte, Oakley et al. 1999, Claing, Chen et al. 2001).

Quack et al. konnten 2006 erstmals den Nachweis einer Expression von β -arrestin2 in humanen Podozyten erbringen und zeigten eine Interaktion von β -arrestin2 mit Nephrin. Die Bindungsstelle für β -Arrestin2 an Nephrin liegt dabei zwischen den Aminosäuren 1120-1125 (TGERDT) von Nephrin. Zusätzlich scheint die Aminosäuresequenz 1177-1208 durch die Phosphorylierung des Tyrosins 1193 von Nephrin eine regulatorische Funktion für die Interaktion mit β -arrestin2 zu haben. β -arrestin2 konnte als ein entscheidender Bestandteil in der Regulation der Schlitzmembran beschrieben werden (Quack, Rump et al. 2006).

1.2.1.1.5 Das Protein GLEPP1

Das 134 kDa schwere Protein GLEPP1 (glomerular epithelial protein 1 oder Ptp_{pro}) ist eine Rezeptor Membran Protein Tyrosin Phosphatase (RPTP), die im apikalen Bereich des Podozyten lokalisiert ist (Thomas, Wharram et al. 1994, Wiggins, Wiggins et al. 1995). Strukturell besteht GLEPP1 aus einer großen extrazellulären Domäne, die wiederum acht Fibronektin Typ III-ähnliche Domänen enthält, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Phosphatasedomäne (Thomas, Wharram et al. 1994). GLEPP1 scheint eine Rolle in der Funktion und Struktur der podozytären Fußfortsätze zu spielen. Yang konnte 1996 zeigen, dass GLEPP1 bereits frühzeitig in der Pathogenese von Nierenerkrankungen mit Schädigung des Podozyten vermindert exprimiert wird und daher als Marker für glomeruläre Schädigung eingesetzt werden könnte (Yang, Goyal et al. 1996). So konnte unter anderem für Erkrankungen wie die fokal-segmentale Glomerulosklerose, minimal-change Glomerulonephritis und die IgA Nephropathie eine verminderte GLEPP1 Expression nachgewiesen werden (Sharif, Goyal et al. 1998, Clement, Liu et al. 2007, Tian, Wang et al. 2007). Der Verlust von GLEPP1 führt dabei in *ptpro*^{-/-} knockout-Mäusen zu einer Veränderung des Podozyten

von einer oktopoiden hin zu einer amoeboiden Form sowie einer Reduktion der Nephrin Expression, Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und einer Tendenz zur Hypertonie (Wharram, Goyal et al. 2000). Ozaltin et al. identifizierten 2011 das *PTPRO*-Gen, welches für GLEPP1 kodiert, als ein Kandidatengen für das idiopathische nephrotische Syndrom (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Auch eine Blockade mit selektiven GLEPP1 Antikörpern führte in isolierten Glomeruli von Ratten und Kaninchen zu einer erhöhten Permeabilität für Albumin (Charba, Wiggins et al. 2009). Wie genau GLEPP1 diese Effekte auf die glomeruläre Schlitzmembran und das podozytäre Zytoskelett ausübt, ist bisher nicht geklärt.

1.2.1.2 Das Modell der dynamischen Regulation der Schlitzmembran

Die glomeruläre Schlitzmembran wird heutzutage nicht mehr bloß als ein statisches molekulares Sieb angesehen, sondern vielmehr als ein dynamischer und funktioneller Proteinkomplex. Ohlson et al. konnten beispielsweise 2001 zeigen, dass sich die Eigenschaften des glomerulären Filters mit zunehmender GFR und hydraulischem Druck verändern (Ohlson, Sorensson et al. 2001).

Der Proteinkomplex der glomerulären Schlitzmembran führt durch Rekrutierung von verschiedenen Signalkomponenten zu Signalübertragungen, welche die Biologie des Podozyten und die glomeruläre Funktion dynamisch steuern. Beispielsweise werden Zellüberleben, Zelldifferenzierung, Zytoskelettorganisation, Zellpolarität, Endozytose und Transkriptionen auf diese Weise reguliert (Benzing 2004, Huber and Benzing 2005, Quack, Rump et al. 2006).

Eine zentrale Rolle spielt dabei die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin. Nephrin ist ein Signalprotein, dessen Phosphorylierungsstatus die Bindung weiterer intrazellulärer Adapterproteine und Signalmoleküle ermöglicht und daher wiederum streng reguliert ist. Src-Kinasen wie Fyn führen zum Beispiel zu einer Nephrinphosphorylierung (Lahdenpera, Kilpelainen et al. 2003, Verma, Wharram et al. 2003). Voraussetzung dafür, dass Nephrin als Signalmolekül agieren kann und die Anlagerung weitere Komponenten der Signalübertragung ermöglicht wird, ist die Lokalisation in *lipid raft* Mikrodomänen. Eine entscheidende Rolle spielt dabei Podocin, welches an phosphoryliertes Nephrin bindet und so zu einer Rekrutierung von Nephrin in die lipid rafts führt und weitere Signalübertragungen ermöglicht (Simons, Schwarz et al. 2001, Huber, Simons et al. 2003).

Quack et al. stellten 2006 ein Modell zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran vor (Abb. 2). Es zeigt, dass der Phosphorylierungsstatus des Tyrosin 1193 (Y1193) von Nephrin eine zentrale Rolle für die Regulation der Schlitzmembran spielt. Eine extrazelluläre Bindung von Nephrin an ein gegenüberliegendes Nephrin- oder NEPH1 Mole-

kül im Sinne einer intakten Schlitzmembran führt zur Phosphorylierung von Nephrin Y1193 durch Src-Kinasen wie z.B. Yes. Diese Phosphorylierung von Nephrin Y1193 ermöglicht die Interaktion mit Podocin, welche zu einer Verankerung von Nephrin in der Zellmembran und zu einer verstärkten Signalfunktion von Nephrin führt. Verliert Nephrin hingegen die extrazellulären Bindungen, kommt es zu einer Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 und damit zur Beendigung der Nephrin/Podocin Interaktion. Stattdessen führt die Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 zu einer Interaktion von Nephrin mit β -arrestin2. Folge dieser Bindung ist eine Endozytose von Nephrin mit Beeinträchtigung der Integrität der Schlitzmembran und eine Beendigung der Signalfunktion von Nephrin (Quack, Rump et al. 2006).

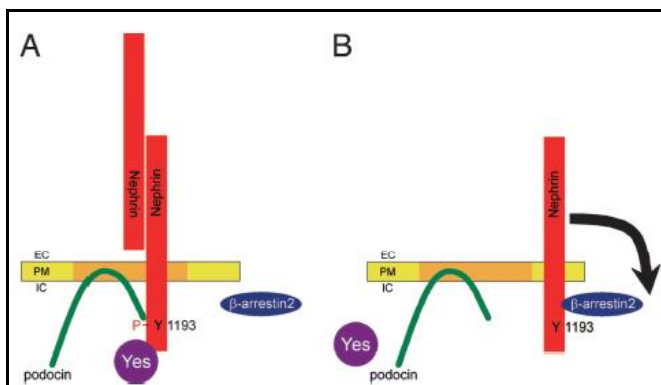


Abb. 2: Schematische Darstellung des Modells zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran.

(A) Die Homodimerisierung der Nephrin Moleküle benachbarter podozytärer Fußfortsätze führt zu einer Phosphorylierung des Tyrosins 1193 des intrazellulären Anteils von Nephrin durch die Src-Kinase Yes. Dies ermöglicht die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin. Auf diese Weise wird das Nephrin Molekül im Bereich der *lipid rafts* in der Zellmembran verankert. (B) Der Verlust der extrazellulären Bindungen der Nephrin Moleküle führt zu einer Dephosphorylierung des Tyrosins 1193 des intrazellulären Anteils von Nephrin. Die Interaktion mit Podocin wird daraufhin beendet und gleichzeitig eine Interaktion von β -Arrestin2 an Nephrin ermöglicht. Die Interaktion mit β -Arrestin2 führt zu einer Endozytose von Nephrin und zu einer verminderten Integrität der glomerulären Schlitzmembran. (Quelle: Quack, I., Rump, L. C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T. & Sellin, L. 2006. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. Proc Natl Acad Sci USA, 103, 14110-5; Copyright (2006) National Academy of Sciences, U.S.A.)

Auf dieser Grundlage konnten Quack et al. 2011 einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der diabetischen Nephropathie leisten. Hyperglykämie führte in zahlreichen Studien zu einer verminderten Nephrin Expression, durch die eine Mikroalbuminurie als Frühsymptom der diabetischen Nephropathie erklärt werden konnte. (Doublier, Salvidio et al. 2003, Koop, Eikmans et al. 2003, Kim, Li et al. 2007). Quack et al. konnten weiterhin zeigen, dass eine Hyperglykämie zu einer vermehrten Expression von Proteinkinase C α (PKC α) führt, welche an Nephrin bindet und zu einer Phosphorylierung der Threonine

1120 und 1125 führt. Die Aminosäuresequenz 1120-1125 gilt als Bindungsstelle für die β -arrestin2 Interaktion. Somit führen hyperglykämische Bedingungen zu einer vermehrten Phosphorylierung der Threonine 1120 und 1125 und damit zu einer verstärkten Bindung von β -arrestin2 an Nephrin. Die Interaktion zwischen β -arrestin2 und Nephrin wiederum leitet die Clathrin-vermittelte Endozytose von Nephrin ein, wodurch die Integrität der Schlitzmembran abnimmt. (Quack, Woznowski et al. 2011)

1.2.2 *Das podozytäre Zytoskelett*

Die Aufgabe des podozytären Zytoskelettes ist es einerseits die Stabilität, andererseits die dynamische Flexibilität des Podozyten zu gewährleisten, damit die Zell-Zellkontakte der Schlitzmembran und die Zell-Matrixkontakte zur glomerulären Basalmembran korrekt ausgebildet werden können (Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Faul, Asanuma et al. 2007). Im Bereich des Zellkörpers und der primären Fortsätze wird das Zytoskelett durch Mikrotubuli (24 nm) und Intermediärfilamente (10 nm) gebildet, während das Zytoskelett der sekundären Fußfortsätze vor allem auf Aktinfilamenten (7 nm) basiert (Andrews 1981, Vasmant, Maurice et al. 1984, Drenckhahn and Franke 1988). Die Aktinfilamente in den Fußfortsätzen sind in parallelverlaufenden Bündeln angeordnet, die über bivalente Moleküle wie α -actinin oder Dystrophin vernetzt sind. (Drenckhahn and Franke 1988, Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Faul, Asanuma et al. 2007). In allen drei Membrandomänen des Podozyten ist das Aktin-Zytoskelett durch spezielle Gruppierungen von Adapter- und Effektorproteinen mit den transmembranären Proteinen dieser Bereiche vernetzt und wird gleichzeitig in dieser Weise modifiziert und reguliert (Faul, Asanuma et al. 2007) (Abb. 3).

Im Bereich der lateralen Membrandomäne handelt es sich bei den Adapterproteinen beispielsweise um Nck (Jones, Blasutig et al. 2006, Verma, Kovari et al. 2006), IQGAP1 (Rigothier, Auguste et al. 2012) oder CD2AP (Welsch, Endlich et al. 2001, Lynch, Winata et al. 2003). Zusammen mit ihren Effektorproteinen organisieren sie die dynamische Polymerisation und Depolymerisation des Aktin-Zytoskelettes. Der Multiproteinkomplex der Schlitzmembran stellt also eine Art Sensor dar, der über Adapter- und Effektorproteine eine Anpassung des Aktin-Zytoskelettes des Podozyten an verschiedene Bedingungen ermöglicht, während andersherum ein intaktes podozytäres Zytoskelett unabdingbar für die Ausbildung der normalen Schlitzmembran ist (Kerjaschki 2001, Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Faul, Asanuma et al. 2007). Schädigungen des Podozyten führen daher zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes im Sinne eines dichten Netzwerkes aus verzweigten Aktinfilamenten. Morphologisch zeigen sich abgeflachte, verkürzte und verschmolzene Fußfortsätze, die ihre fingerartige Verflechtung mit benachbarten Fußfortsätzen verlieren. Entsprechend können die Zell-

Zellkontakte der Schlitzmembran und die Zell-Matrixkontakte zur GBM nicht normal ausgebildet werden und es kommt zum Verlust der Filterfunktion, was sich symptomatisch in Form einer Proteinurie äußert (Andrews 1975, Ryan, Rodewald et al. 1975, Seiler, Venkatachalam et al. 1975, Kerjaschki 1978, Kanwar and Rosenzweig 1982, Fries, Sandstrom et al. 1989, Kretzler, Koeppen-Hagemann et al. 1994, Shirato, Sakai et al. 1996, Smoyer, Mundel et al. 1997, Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Faul, Asanuma et al. 2007).

Im Bereich der basalen Membrandomäne ist das Aktin-Zytoskelett über fokale Adhäsionen mit der GBM vernetzt. Dabei spielen vor allem zwei Typen von Zell-Matrixkontakten eine Rolle: Integrin-Komplexe und Dystroglykan-Komplexe. Das transmembranäre Protein Dystroglykan vernetzt die GBM über Utrophin mit dem Aktin-Zytoskelett (Raats, van den Born et al. 2000). Ebenso binden Integrine Liganden in der GBM und sind intrazellulär über sogenannte „*focal adhesions associated*“ Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. „*Focal adhesions associated*“ Proteine umfassen etwa 180 Mitglieder wie beispielsweise Paxillin, Talin, Filamin, FAK (focal adhesion Kinase), Vincullin (Zaidel-Bar, Itzkovitz et al. 2007, Zaidel-Bar and Geiger 2010). Die fokalen Adhäsionen dienen aber nicht nur der strukturellen Verankerung, sondern regulieren die Dynamisierung von Aktin und damit einerseits die Zellstabilität und andererseits die Mobilität und Migration (Byers, Etoh et al. 1992, Dunlevy and Couchman 1993, Smilenov, Mikhailov et al. 1999, Petit, Boyer et al. 2000, Ballestrem, Hinz et al. 2001).

Zellkontakte und der Zellmigration erfolgt unter anderem durch Tyrosinphosphorylierung von Paxillin durch FAK (fokal adhesion kinase) und Src-Kinasen (Bellis, Miller et al. 1995, Schaller and Parsons 1995, Schaller and Schaefer 2001).

1.2.2.1.2 Das Protein IQGAP1

IQGAP1 ist ein 189 kDa schweres Mitglied der IQGAP Familie mit 3 Mitgliedern: IQGAP1, IQGAP2 und IQGAP3 (Weissbach, Settleman et al. 1994). Allgemein ist IQGAP1 ein Hauptregulator für die Cadherin-vermittelten Zellkontakte, Zellpolarisation und Zellmigration. Ruiz-Sáenz konnte 2011 zeigen, dass das Protein 4.1R in humanen Epithelzellen (ECV304- und PC3-Zellen) ebenfalls im Bereich des Leitsaumes migrierender Zellen zu detektieren ist und mit IQGAP1 interagiert und kolokalisiert. Dabei ist die FERM-Domäne des Protein 4.1R in die IQGAP1 Bindung involviert. Das Protein 4.1R führt zu einer Rekrutierung von IQGAP1 in den Bereich des Leitsaumes und ermöglicht so eine weitere Interaktion von IQGAP1 mit Aktin, APC und CLIP-170. Andersherum wird für die Lokalisation von 4.1R im Bereich des Leitsaumes kein IQGAP1 benötigt (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Im Jahr 2012 konnte Rigother et al. erstmals eine Expression von IQGAP1 im apikalen und lateralen Bereich humaner Podozyten nachweisen. Darüber hinaus zeigte sich eine Kolokalisation und Interaktion von IQGAP1 mit Proteinen der glomerulären Schlitzmembran, wie beispielsweise Nephrin, CD2AP, Podocin und Nck1/2. Auch im Podozyten konnten Interaktionen mit Aktin, α -actinin und β -catenin nachgewiesen werden und im Migrationsassay führte die Ausschaltung von IQGAP1 zu verminderter Migration. IQGAP1 scheint demnach durch seine Funktion als Adapterprotein sowohl eine Rolle in der Regulation des Zytoskelettes als auch in der Regulation der Schlitzmembran zu spielen (Rigother, Auguste et al. 2012).

1.2.2.1.3 Die Proteinfamilie Nck

Die wichtigsten Mitglieder der Nck (non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1) - Familie sind die beiden 47 kDa schweren Adapterproteine Nck1 (Nck α) und Nck2 (Nck β oder Grb4). Strukturell bestehen sie aus drei SH3-Domänen (Src-homology-3) und einer C-terminalen SH2-Domäne (Lehmann, Riethmüller et al. 1990, Jones, New et al. 2009). Die SH2-Domäne bindet an drei phosphorylierte Tyrosin-Motive (YDxV Motive) des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin. Diese YDxV Motive umfassen Tyrosin 1176, Tyrosin 1193 und Tyrosin 1217. Entscheidend für die Rekrutierung von Nck an Nephrin ist daher eine Phos-

phorylierung der Tyrosine durch SFKs (Src family kinases) wie Fyn. Die Bindung der SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosine von Nephrin ermöglicht, dass die SH3-Domänen zahlreiche Interaktionen mit verschiedenen Effektorproteinen eingehen können, die das Zytoskelett organisieren (Jones, Blasutig et al. 2006, Verma, Kovari et al. 2006, Blasutig, New et al. 2008).

Jones et al. zeigten 2009, dass ein Verlust von Nck1 und Nck2 in der Maus zu Proteinurie, Glomerulosklerose und veränderter Podozytenmorphologie führt. Der Verlust von nur einem der beiden Proteine scheint allerdings durch das jeweils andere ausgeglichen zu werden. Nck Adapterproteine sind somit essentiell für die Entwicklung der podozytären Architektur, die Organisation des Zytoskelettes und die Vernetzung von Nephrin mit dem Zytoskelett (Jones, New et al. 2009). Weiterhin konnten Jones et al. 2009 zeigen, dass unter dem Einfluss von Nck selbst die Phosphorylierung von Nephrin *in vitro* zunimmt. Zudem kommt es bei einer Abnahme von Nck *in vivo* zu einer starken Reduktion der Phosphorylierung von Nephrin (Jones, New et al. 2009). Das Modell von New et al. aus dem Jahre 2013 zeigt folgende Erklärung auf. Die Src Kinasen, insbesondere Fyn führen zu einer Phosphorylierung von Nephrin im Bereich der YDxV Motive und ermöglichen so eine Bindung der SH2 Domäne von Nck. Dadurch können die SH3 Domänen von Nck aktiviert werden und interagieren wiederum unter anderem mit Fyn. Durch diese Interaktion wird Fyn vermehrt aktiviert und kann somit die Phosphorylierung von Nephrin in Form einer positiven Rückkopplung verstärken. Da die Phosphorylierung von Nephrin eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung und Bindung weiterer Proteine spielt, kann Nck zusätzlich eine zentrale Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion des Podozyten zugeschrieben werden (New, Keyvani Chahi et al. 2013).

1.3 Die Proteinfamilie 4.1

Die Proteinfamilie 4.1 gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die in fünf Untergruppen bzw. Familien unterteilt werden. Neben der Familie der 4.1 Proteine finden sich die Familie der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin und Merlin) Proteine, Talin-ähnliche Proteine, PTPH (Proteintyrosinphosphatase) Proteine und NBL4 (novel band4.1-like4) Proteine. Die Gemeinsamkeit dieser Proteinfamilien besteht in einer N-terminal gelegenen FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne (Conboy, Kan et al. 1986, Gould, Bretscher et al. 1989, Rees, Ades et al. 1990, Funayama, Nagafuchi et al. 1991, Gu, York et al. 1991, Lankes and Furthmayr 1991, Yang and Tonks 1991, Sato, Funayama et al. 1992, Takeuchi, Kawashima et al. 1994).

Die Protein 4.1 Familie an sich besteht bei Vertebraten aus 5 homologen Mitgliedern: 4.1R, 4.1G, 4.1N, 4.1B und 4.1O. Das ursprüngliche Protein 4.1 und damit der Prototyp der 4.1 Familie wurde erstmals in der Membran von Erythrozyten nachgewiesen und wird heute als

Protein 4.1R (*red blood cells type*) bezeichnet. Die Namensgebung basiert auf der Position des Proteins in der SDS-Gelelektrophorese (Yu, Fischman et al. 1973). Die Proteine 4.1 werden daher auch synonym als Bande 4.1 Proteine oder 4.1 bezeichnet. Neben der Expression in Erythrozyten kann 4.1R auch in zahlreichen nicht erythrozytären Zellen wie Nervenzellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Granulozyten und Thrombozyten und Geweben wie Leber, Pankreas, Darm und Plazenta nachgewiesen werden (Conboy, Kan et al. 1986). In der Niere zeigte 4.1R eine Expression im Bereich des dicken aufsteigenden Schenkels der Henle-Schleife (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003).

Strukturell besteht das Protein 4.1R, wie auch alle weiteren Mitglieder der 4.1 Familie, aus drei hochkonservierten Domänen: FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)-, SAB (Spektrin-Aktin-Bindungs)-, und CT (C-terminale)- Domäne (Leto and Marchesi 1984, Conboy, Chan et al. 1988, Hoover and Bryant 2000).

Die FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne ist N-terminal. Die genaue Untersuchung der Domäne zeigt eine Unterteilung in drei Lappen (A-, B- und C-Lappen). Sie dient der Interaktion mit Membranproteinen, Phospholipiden und Adapterproteinen zum Zytoskelett (Sato and Ohnishi 1983, Jons and Drenckhahn 1992, Marfatia, Lue et al. 1994, Hemming, Anstee et al. 1995, Han, Nunomura et al. 2000, Takakuwa 2001, An, Zhang et al. 2006). Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion des C-Lappens mit dem Protein IQGAP1, die eine Migration und Polarisation der Zellen ermöglicht (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). C-terminal schließt sich der FERM-Domäne die sogenannte FA (FERM-adjacent)-Domäne an, die der Regulation der Prozesse im Bereich der FERM-Domäne dient. Sie enthält zwei Serine, die als Substrat für die Protein Kinase C (PKC) dienen und über deren Phosphorylierung die Regulation gesteuert wird (Baines 2006).

Die SAB (Spektrin-Aktin-Bindungs)-Domäne dient der Interaktion mit den Strukturproteinen des Zytoskelettes und führt zu einer Vernetzung dieser untereinander. F-Aktin wird lateral durch die SAB-Domäne an 4.1R gebunden (Correas, Speicher et al. 1986), während das Minus Ende von F-Aktin durch Tropomodulin gekappt wird (Fowler 1990) und das Plus-Ende indirekt über Adducin an Spektrin bindet (Kuhlman, Hughes et al. 1996). Zudem bindet die SAB-Domäne direkt an Spektrin, so dass ein Komplex aus 4.1R, F-Aktin und Spektrin entsteht (Correas, Speicher et al. 1986, Discher, Winardi et al. 1995, Gimm, An et al. 2002). 4.1R spielt damit eine entscheidende Rolle für die mechanische Stabilität und Form des Erythrozyten (Takakuwa, Tchernia et al. 1986). Homozygote 4.1R Gendefekte führen dabei zu Hereditärer Elliptozytose (Tchernia, Mohandas et al. 1981).

Die CT (C-terminale)-Domäne zeigt eine Vielzahl von Interaktionen mit zytoplasmatischen Proteinen. In nicht erythrozytären Zellen lässt beispielsweise die Interaktion der CT-Domäne mit dem eukaryotischen Translationsfaktor 3 (eIF3) auf eine Verbindung von 4.1R zum Translationapparat schließen (Hou, Tang et al. 2000) und die Interaktion mit dem zyto-

plasmatischen Protein NuMa (nuclear mitotic apparatus protein) lässt vermuten, dass 4.1R eine Rolle in der Komplexbildung der Mitosespindel spielt (Mattagajasingh, Huang et al. 1999). Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen, die eine zusätzliche Lokalisation von 4.1R im Bereich des Zellkernes zeigen konnten (de Carcer, Lallena et al. 1995, Krauss, Larabell et al. 1997). Außerdem scheint 4.1R durch Bindung an ZO2 (Zonula occludens 2) einen Anteil an der Formation von Zellkontakten zu haben (Mattagajasingh, Huang et al. 2000).

Es folgte die Identifikation weiterer Mitglieder der 4.1 Familie, die einen gemeinsamen strukturellen Aufbau besitzen, jedoch durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Trotz allem lassen sich durch das Vorhandensein gemeinsamer Domänen auch Rückschlüsse auf analoge Funktionen der weiteren Mitglieder ziehen. Beispielsweise konnten Grimm et al. 2002 zeigen, dass auch die weiteren Mitglieder der 4.1 Familie mit Ausnahme von 4.1N in der Lage sind, Spektrin und Aktin zu binden. Die Erkenntnisse über 4.1R im Erythrozyten lassen sich so möglicherweise auf andere Gewebe, in denen 4.1 exprimiert wird, übertragen (Gimm, An et al. 2002). Die Mitglieder der Proteinfamilie 4.1 wurden nach dem ersten Gewebe benannt in dem sie identifiziert wurden. Aus heutiger Sicht werden sie jedoch relativ ubiquitär exprimiert.

Als erstes Homolog zu Protein 4.1R wurde das Protein 4.1G (general type) identifiziert, welches im zentralen Nervensystem (ZNS) und ubiquitär in nicht neuronalem Gewebe exprimiert wird (Parra, Gascard et al. 1998).

Das Protein 4.1N (*neuron type*) wird vor allem im ZNS exprimiert. Darüber hinaus konnte 4.1N im Gewebe der Niere, Pankreas, Herz, Plazenta, Lunge, Skelettmuskel und Darm nachgewiesen werden (Walensky, Blackshaw et al. 1999). In der Niere wird 4.1N vor allem im Bereich des Sammelrohres, des distalen Konvolutes und dem dünnen Anteil der Henle-Schleife exprimiert (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Proteinfamilie 4.1 ist 4.1N jedoch nicht in der Lage, mit seiner SAB-Domäne einen Komplex mit Spektrin oder Aktin zu bilden (Gimm, An et al. 2002).

Das Protein 4.1B (*brain type*) wurde erstmalig im ZNS identifiziert (Parra, Gascard et al. 2000) und seine Expression konnte zusätzlich im proximalen Konvolut und der Bowman-Kapsel nachgewiesen werden (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Zahlreiche Studien konnten seither zudem belegen, dass 4.1B eine Rolle in der Suppression einiger Tumore und Karzinommetastasen zugeschrieben werden kann (Tran, Bogler et al. 1999, Terada, Ohno et al. 2003, Wong, Haack et al. 2007, Takahashi, Iwai et al. 2012, Zhang, Xu et al. 2012).

Das jüngste Mitglied der Familie ist das Protein 4.1O (*ovary type*). Da es Gegenstand dieser Arbeit ist, wird es ausführlich unter Punkt 1.4 besprochen.

Zusammenfassend werden die Mitglieder der Proteinfamilie 4.1 in der Literatur als Adapterproteine beschrieben, die eine Vernetzung des Zytoskelettes mit der Zellmembran er-

möglichen (Hoover and Bryant 2000, Diakowski, Grzybek et al. 2006, Baines, Lu et al. 2014). Die 4.1 Proteine sind zudem an der Organisation des Zytoskelletes selbst beteiligt (Correas, Speicher et al. 1986) und führen zu mechanischer Stabilität und Formerhalt der Zellen einerseits (Takakuwa, Tchernia et al. 1986) sowie Zellmigration andererseits (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Die zahlreichen Interaktionen mit Membran- sowie zytoplasmatischen Proteinen sprechen darüber hinaus für eine Organisation der Zellmembran und Beeinflussung zahlreicher Zellfunktionen, wie z.B. der Bildung von Zellkontakten (Mattagajasingh, Huang et al. 2000) und Regulation der Zellproliferation (Mattagajasingh, Huang et al. 1999, Hou, Tang et al. 2000, Takahashi, Iwai et al. 2012).

1.4 Bisherige Erkenntnisse über das Protein 4.1O

1.4.1 Expression des Proteins 4.1O

Das Protein 4.1O (*ovary type*) wurde erstmals 2003 durch Ni et al. beschrieben. Ni et al. führten eine Sequenzanalyse humaner cDNA Bibliotheken durch und klonierten daraufhin die cDNA des humanen 4.1O Gens. Der offene Leserahmen der cDNA umfasst dabei 1662 bp und codiert für ein Protein mit 554 Aminosäuren. Des Weiteren konnte die Lokalisation auf Chromosom 9q21-9q22 mit 14 Exons und 13 Introns durch den Webdienst des NCBI (National Center for Biotechnology Information) ermittelt werden. Zum Expressionsnachweis wurden 16 Normalgewebearten, 8 fetale Gewebearten und zusätzlich einige Tumorgewebe in humanen Multi-Gewebs-cDNA *Panels* als PCR Vorlagen verwendet und eine PCR mit einem humanen 4.1O Primer-Paar durchgeführt. Die Expression von 4.1O konnte von Ni et al. nur im Normalgewebe des Ovars, in fetaler Skelettmuskulatur, fetalem Thymus und fetalem Gehirn gezeigt werden. Interessanterweise konnte die Expression von 4.1O im Gewebe eines GI-102 Ovarialkarzinomes nicht mehr nachgewiesen werden. Ein Nachweis von 4.1O in der Niere gelang nicht (Ni, Ji et al. 2003).

1.4.2 *FRMD3, ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie*

1.4.2.1 Grundlagen der diabetischen Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist der führende Grund für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz in industrialisierten Ländern (Foley and Collins 2007, Herold 2011). Als Frühsymptom und Prädiktor der diabetischen Nephropathie gilt eine Mikroalbuminurie (Parving, Oxenboll et al. 1982, Viberti, Hill et al. 1982, Mogensen 1984, Perkins, Ficociello et al. 2007). Mit zunehmender Proteinurie und abnehmender Nierenfunktion steigt gleichzeitig das kardiovaskuläre Risiko und die Gesamtmortalität deutlich an (Kalaitzidis and Bakris 2009, Klausen, Parving et al. 2009). Die diabetische Nephropathie zeichnet sich durch verschiedene strukturelle und funktionelle Veränderungen, wie einem Verlust der negativ geladenen Proteoglykane in der glomerulären Basalmembran (Raats, Van Den Born et al. 2000), Verdickung der glomerulären Basalmembran (Tsilibary 2003), mesangiale Hypertrophie (Adler 1994), endotheliale Dysfunktion (Ochodnický, Vettoretti et al. 2006), Verlust der Podozyten (Steffes, Schmidt et al. 2001), Erweiterung der Zwischenräume zwischen den Fußfortsätzen (Bjorn, Bangstad et al. 1995) sowie einer Reduktion der Nephrinexpression an der podozytären Oberfläche (Langham, Kelly et al. 2002, Benigni, Gagliardini et al. 2004) aus. Letztere werden in der Literatur hauptsächlich für das Symptom der Proteinurie verantwortlich gemacht (Ziyadeh and Wolf 2008). Zusammenfassend endet die diabetische Nephropathie in einer Glomerulosklerose, interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (Ziyadeh and Wolf 2008, Duran-Salgado and Rubio-Guerra 2014). Der genaue Pathomechanismus ist nicht geklärt, jedoch scheinen Inflammation (Navarro-Gonzalez and Mora-Fernandez 2008, Lim and Tesch 2012), oxidativer Stress und Aktivierung von zellulären Stresssignalwegen (Ha and Lee 2000), Hochregulation von Wachstumsfaktoren und Chemokinen (El Mesallamy, Ahmed et al. 2012) und eine Aktivierung des RAAS-Systems mit erhöhten Angiotensin II Spiegel (Huang, Gallois et al. 2001) eine Rolle zu spielen.

Die Prävalenz für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie liegt für Patienten mit Diabetes mellitus, unabhängig vom Typ des Diabetes, bei 30-40%. Bei einer optimalen Blutzuckereinstellung ist die Prävalenz niedriger. (Andersen, Christiansen et al. 1983, Krolewski, Warram et al. 1987, Hasslacher, Ritz et al. 1989, Krolewski, Eggers et al. 1996, Ritz and Orth 1999). Es scheint also bestimmte Risikofaktoren zu geben, die entscheidend dafür sind, ob ein Diabetiker eine diabetische Nephropathie entwickelt. Modifizierbare Risikofaktoren sind dabei unter anderem Bluthochdruck, Blutzuckereinstellung und Nikotinabusus (Scott, Warram et al. 2001, Tapp, Shaw et al. 2004). Zu den nicht modifizierbaren Risikofaktoren zählen eine positive familiäre Anamnese für eine diabetische Nephropathie oder die ethni-

sche Herkunft (Seaquist, Goetz et al. 1989, Smith, Svetkey et al. 1991). Es liegt also nah, dass das Erkrankungsrisiko für eine diabetische Nephropathie zumindest teilweise auf genetische Komponenten zurückzuführen ist. Es wurden eine Reihe von Studien zur Untersuchung der genetischen Grundlage der diabetischen Nephropathie durchgeführt und in der Metaanalyse von Mooyaart et al. im Jahre 2010 zusammengefasst. Insgesamt wurden 24 genetische Varianten in 16 Genen gefunden, die mit der diabetischen Nephropathie assoziiert werden (Mooyaart, Valk et al. 2011).

1.4.2.2 Genomweite Assoziationsstudie zur diabetischen Nephropathie

Eines der Kandidatengene für die diabetische Nephropathie identifizierten Pezzolesi et al. 2009 in einer genomweiten Assoziationsstudie von 935 Typ 1 Diabetikern mit diabetischer Nephropathie und 944 Typ 1 Diabetikern ohne diabetische Nephropathie als Kontrollgruppe. Die Genotypisierung erfolgte durch die Analyse der *SNPs* (*single nucleotide polymorphism*) im *SNP Array*. 11 *SNPs* zeigten eine Assoziation mit der diabetischen Nephropathie. Die stärkste Assoziation zeigte der SNP rs10868025 auf Chromosom 9q (Odds ratio OR= 1.45, $p= 5.0 \times 10^{-7}$). Dieser SNP ist nah dem 5' Ende im Bereich des *FRMD3* Gens lokalisiert. *FRMD3* steht dabei für FERM-(4.1 Protein, Ezrin, Radixin, Moesin)-domain-containing 3 und codiert für das Protein 4.1O. Pezzolesi et al. identifizierten somit *FRMD3* als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie und belegen eine Beteiligung des Proteins 4.1O in der Pathogenese dieser Erkrankung (Pezzolesi, Poznik et al. 2009).

1.4.3 *Deletion des 4.1 Orthologs im Zebrafisch führt zu einer abnormen Podozytenfunktion*

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten lieferte 2005 die Arbeitsgruppe um Kramer-Zucker. Sie konnten zeigen, dass für die Organisation des Filterapparates des Pronephros (embryologische Vorniere) im Zebrafisch nicht nur Nephrin und Podocin benötigt werden, sondern auch das Genprodukt des *mosaic eyes* Gens (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). Das *mosaic eyes* (syn. *moe/ EPB41L5*) Gen kodiert für ein FERM-Domänen Protein und wurde im Zebrafisch erstmals durch Jensen et al. 2004 im Zusammenhang mit der embryonalen Entwicklung der Retina beschrieben (Jensen and Westerfield 2004). Es kann als Ortholog des humanen Proteins 4.1 angesehen werden. Kramer-Zucker et al. konnten zunächst zeigen, dass das *mosaic eye* Genprodukt in

den Podozyten des Zebrafisches exprimiert wird. Des Weiteren erstellten sie eine homozygote *moe* ^{-/-} Mutante und konnten zeigen, dass der Verlust des *moe*-Gens zunächst zu der Entwicklung eines perikardiales Ödems und später zu einem generalisierten Ödem führt, was im Sinne einer großen Proteinurie und insuffizienten Funktion des Pronephros zu werten ist. Elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten eine fehlende Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran zwischen den podozytären Fußfortsätzen und die Ausbildung apikaler „mikrovillärer“ Projektionen im Sinne einer beginnenden Glomerulosklerose zeigen (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005)

2 Ziele der Arbeit

Die genomweite Assoziationsstudie von Pezzolesi et al. identifizierte das *FRMD3* Gen, welches für das Protein 4.1O kodiert, als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie (Pezzolesi, Poznik et al. 2009). Auch die Untersuchungen zur Deletion des 4.1 Orthologs im Zebrafisch von Kramer-Zucker et al., zeigen, dass das Protein 4.1 im Zebrafisch eine entscheidende Bedeutung für die Funktion des Podozyten zu haben scheint (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). Eine Bedeutung der Proteinfamilie 4.1 und im Besonderen des Proteins 4.1O für die Funktion des humanen Podozyten scheint somit wahrscheinlich.

Für die Mitglieder der Proteinfamilie 4.1 konnte bislang zwar eine Expression im Bereich des Tubulussystems gezeigt werden, jedoch konnte keine Expression im Bereich der Podozyten nachgewiesen werden (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Auch für das Protein 4.1O selber konnte bislang nur eine Expression im Ovar, fetalen Skelettmuskel, fetalen Thymus und fetalen Gehirn belegt werden (Ni, Ji et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob das Protein 4.1O eine Rolle für die Funktion des Podozyten spielt. Dabei galt es folgende Fragen zu klären:

1. Wird das Protein 4.1O in der humanen Niere und den humanen Podozyten exprimiert?
2. Gibt es Proteininteraktionen zwischen 4.1O und bekannten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran und des podozytären Zytoskelettes?
3. Welche Domänen sind bei diesen Interaktionen involviert?
4. Welchen Einfluss hat das Protein 4.1O auf bekannte Proteininteraktionen der glomerulären Schlitzmembran und des podozytären Zytoskelettes?
5. Welche Funktion des Proteins 4.1O lässt sich daraus ableiten?
6. Welchen Einfluss hat die Glukosekonzentration auf die Funktion des Proteins 4.1O?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Biomol GmbH - Hamburg (DE)
2-Propanol 99,8%	VWR International - Fontenay-sous-Bois (FR)
2-Propanol 70%	Zentralapotheke Uniklinikum Düsseldorf (DE)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Agarose, low gelling temperature (LMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Agarose NEEO Ultra Qualität Roti@garose	Carl Roth GmbH+Co KG - Karlsruhe (DE)
APS (Ammoniumperoxidisulfat) 10%	Pharmacia Biotechnology - Uppsala (SE)
Bovine Serum Albumin Heat Shock (BSA) Protease Free Powder pH 7.0	VWR International Ltd. - Darmstadt (DE)
Bromphenolblau	Pharmacia Biotechnology - Uppsala (SE)
Calciumchlorid Dihydrat p.A (CaCl ₂)	Merck - Darmstadt (DE)
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH - Mannheim (DE)
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (Na ₂ HPO ₄)	Merck - Darmstadt (DE)
EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetid-disodium salt dihydrat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Essigsäure (Acetic acid) 100%	Carl Roth GmbH+Co KG - Karlsruhe (DE)
Ethanol (99,9%)	Merck - Darmstadt (DE)
Ethanol (70%)	Zentralapotheke Uniklinikum Düsseldorf (DE)
Ethidium Bromid Lösung 0,025%	Carl Roth GmbH+Co KG - Karlsruhe (DE)
Fluka Luminol 09253	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim(DE)
Glycerin, wasserfrei	Merck - Darmstadt (DE)
Glycin, p.a.	AppliChem GmbH - Darmstadt (DE)

Glykogen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Hepes acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck - Darmstadt (DE)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck - Darmstadt (DE)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck - Darmstadt (DE)
Methanol, p.a.	AppliChem GmbH - Darmstadt (DE)
Natriumacetat ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)	Merck - Darmstadt (DE)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem - Darmstadt (DE)
Natriumorthovanadate (Na_2VO_3)	ICN Biomedicals Inc. - Ohio (USA)
p-Coumaric acid C-9008	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Phenol Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH+ Co KG - Karlsruhe (DE)
Rotipuran ®, Wasserstoffperoxid 30%, p.a.	Carl Roth GmbH+ Co KG - Karlsruhe (DE)
Sodium dodecyl Sulfat (SDS)	Biomol GmbH - Hamburg (DE)
Temed 99%, p.a.	Carl Roth GmbH+Co KG - Karlsruhe (DE)
Tris Pufferan (Tris Base), >99,9%, p.a	Carl Roth GmbH+Co KG - Karlsruhe (DE)
Triton x-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim(DE)
Trizma hydrochlorid (Tris HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim(DE)
Tween®20	Merck - Darmstadt (DE)

3.1.2 Geräte

<u>Gerät</u>	Name	Bezugsquelle
Bakterienschüttler	Infors HAT Multitron	Infors AG - Botmingen (CH)
Brutschrank	HERA cell 150	Thermo Scientific - Darmstadt (DE)
Imager	FluorChem® FC2	Alpha Innotech - San Leandro (USA)
Lichtmikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss - Oberkochen (DE)

PCR Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf - Hamburg (DE)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf - Hamburg (DE)
Pipetten	Pipetman	Gilson Inc. - Middleton (USA)
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf - Hamburg (DE)
Sterilbank	HERA safe	Thermo Scientific - Darmstadt (DE)
Stromversorgung Blotting	PowerPac™ Universal	Bio-Rad Laboratories - München (DE)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf - Hamburg (DE)
Vortexmischer	Reax control	Heidolph - Schwabach (DE)
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Heraeus Multifuge 4KR	Eppendorf - Hamburg (DE) Thermo Scientific - Darmstadt (DE)

3.1.3 Spezielle Materialien

3.1.3.1 Herstellung und Vervielfältigung rekombinater DNA und RNA Isolierung

<u>Enzyme und Puffer</u>	<u>Bezugsquelle</u>
10x T4 DNA Ligase Puffer	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
AccuPrime 10x PCR Buffer II	Invitrogen - Darmstadt (DE)
AccuPrime Taq DNA Polymerase	Invitrogen - Darmstadt (DE)
Alkaline Phosphatase Calf Intestinal (CIP) 10.000 U/ml	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
BSA für Restriktionsenzyme	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
DNA Ligase T4	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
Enzym Puffer 1- 4 10x Konzentrat, NEBuffer 1-4	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
Restriktionsenzyme	NewEngland BioLabs - Frankfurt am Main (DE)
<u>Bakterienkultur</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ampicillin Na-salt	Serva Electrophoresis GmbH - Heidelberg (DE)

Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
LB Agar Luria Bertani Agar powder	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen - Darmstadt (DE)
Tetracyclin Hydrochloride Minimum 95%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
Ultracom E. coli - MC1061 - MC1061/P3	Invitrogen - Darmstadt (DE)

<u>Kits</u>	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen - Venlo (NL)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen - Venlo (NL)
RNeasy- Mini Kit	Qiagen - Venlo (NL)

<u>Primer</u>		Sequenz	Bezugsquelle
4.10 long	FP	5'-CAG GAG ATG AGA TGC ACC AT-3'	Eurofins MWG Operon - Ebersberg (DE)
	RP	5'-CTT CTC TGG GTC CAC ATA GC-3'	
4.10 short	FP	5'-CAA AGG GCA GTT TCT CAT TG-3'	Eurofins MWG Operon - Ebersberg (DE)
	RP	5'-AAG ATG GAC TTG TTA GGT TC-3'	

<u>Puffer und Lösungen</u>	Zusammensetzungen
1% Agaroselösung	- 1 g Agarose NEEO Ultra Qualität auf 100 ml 1x TAE - 4 Tropfen 0,025%ige Ethidium-Bromid
1,5% low melting Agarose (LMA)- Lösung	- 1,5 g Agarose low gelling temperature auf 100 ml 1x TAE - 4 Tropfen 0,025%ige Ethidium-Bromid
1x TAE (Tris- Acetat- EDTA Puffer)	- 0,04 M Tris Base - 0,02 M Essigsäure - 0,5 M EDTA pH 8,0

3.1.3.2 Zellkultur

Zellen

HEK293T-Zellen
(human embryonic kidney cells)

Humane Podozyten

Isolierte RNA

Bezugsquelle

FirstChoice® Human Kidney Total RNA Ambion® by life technologies™ -

Zellkulturmedium

Bezugsquelle

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃,
L- Glutamin, very low endotoxin Biochrom AG - Berlin (DE)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 1,0 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃,
L- Glutamin, very low endotoxin Biochrom AG - Berlin (DE)

FBS (Fetal Bovine Serum) Superior Biochrom AG - Berlin (DE)

Trypsin/EDTA-Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca⁺⁺, w/o Mg⁺⁺ Biochrom AG - Berlin (DE)

PBS Dulbecco (Phosphate buffered saline) w/o Ca⁺⁺, w/o Mg⁺⁺ Biochrom AG - Berlin (DE)

3.1.3.3 Transfektion

Plasmide

cdm8	F.GFP	V5.4.1O
cdm.lg	F.4.1O WT	V5.nck2
cdm.nephrin WT	F.4.1O 1-181	V5.FAK
Ig.nephrin 1087-1241 (cyt)	F.4.1O 185-272	V5.β-arrestin2
Ig.nephrin 1158-1241	F.4.1O 278-324	c-myc.IQGAP1
Ig.nephrin 1087-1208	F.4.1O 335-450	
Ig.nephrin 1087-1190	F.4.1O 450-554	
Ig.nephrin 1158-1208	F.4.1O 450-554	
Ig.neph1	F.β-arrestin2	
Ig.GLEPP1 843-1217 (cyt)	F.Paxillin	
Ig.GLEPP1 843-936		

Ig.GLEPP1 843-1197
 Ig.GLEPP1 936-1197
 Ig.GLEPP1 936-1217
 Ig.GLEPP1 1197-1217

<u>Reagenz</u>	<u>Zusammensetzung</u>
2x HEBS (pH 7,05)	- 280,62 mM NaCl - 49,83 mM Hepes acid - 1,47 mM Na ₂ HPO ₄
0,25 M Calciumchlorid	

3.1.3.4 Zellernte, Co-Immunopräzipitation, Biotin Assay und *Pulldown* Assay

<u>Materialien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Anti-Flag M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich Chemie GmbH - Steinheim (DE)
EZ-Link ® Sulfo-NHS-LC-Biotin (Sulfo-succinimidy6(biotionamido)Hexanoate)	Thermo Scientific - Darmstadt (DE)
GammaBind Plus Sepharose in 20% Ethanol	GE Healthcare Bio-Sciences AB - Uppsala (SE)
Glutathione Sepharose® 4B in 20% Ethanol	GE Healthcare Bio-Sciences AB - Uppsala (SE)
Protein A Sepharose CL-4B in 20% Ethanol	GE Healthcare Bio-Sciences AB - Uppsala (SE)

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Biotinlösung	- 0,5 mg/ml in PBS + 0,1 mM CaCl ₂ + 1 mM MgCl ₂
Phosphate Buffered Saline (PBS)	- 136,89 mM NaCl - 2,6 mM KCl - 4,28 mM Na ₂ HPO ₄ - 1,46 mM KH ₂ PO ₄
IP-Puffer	Ansatz für 50 ml: - 1 Tbl. Complete Mini - 5 ml 10% Triton - 500 µl Na ₃ VO ₄

	- 19,5 ml a.d. - 25 ml 2x Lysispuffer (40 mM Tris HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 300 mM KCl) - 220 µl PMSF-Stocklösung (10 mM PMSF in 100% 2-Propanol)
2x reduzierender Proteinpuffer nach Laemmli + 100 mM DTT	- 100 mM Tris pH 6,8 - 4% SDS - 20% Glycerin - 0,2% Bromphenolblau - 1 M NaCO₃
Puffer zur Herstellung rekombinater Proteine	- 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) - 20 mM β-Mercaptoethanol, - 100 µM PMSF

3.1.3.5 Western Blot

<u>Primäre Antikörper</u>		Spezies	Konzentration	Bezugsquelle
Anti-Flag® M2	monoklonal	Maus	1:400	Sigma-Aldrich Chemie - Steinheim (DE)
Anti-V5 Tag	monoklonal	Maus	1:5000	AbD Serotec - Kidlington (UK)
Anti-Nephrin	polyklonal	Meerschwein	1:250	PROGEN Biotechnik - Heidelberg (DE)
Anti-Nephrin Phospho (Y1176/1193)	monoklonal	Kaninchen	1:11000	Abcam plc - Cambridge
Anti-Nephrin Phospho (Y1217)	monoklonal	Kaninchen	1:4500	Abcam plc - Cambridge
Anti-c-myc	monoklonal	Maus	1:200	SantaCruzBiotechnology - Heidelberg (DE)
Anti-β-Aktin	monoklonal	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich Chemie - Steinheim (DE)
Anti-GLEPP1	polyklonal	Kaninchen	1:250	Eurogentec – Lüttich (BEL)
Anti-GST	polyklonal	Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich Chemie - Steinheim (DE)

<u>Sekundäre Antikörper</u>	Konjugat	Konzentration	Bezugsquelle
Anti- <i>mouse</i>	HRP	1:10000	Dako Agilent Technologies - Glostrup (DK)
Anti- <i>human</i> -IgG	HRP	1:100	GE Healthcare Bio- Sciences AB Uppsala (SE)
Anti- <i>rabbit</i>	HRP	1:7500	GE Healthcare Bio- Sciences AB - Uppsala (SE)
Anti- <i>guinea pig</i> -IgG	HRP	1:20000	EMD Millipore - Temecula (USA)
Streptavidin	HRP	1:500	Jackson ImmunoResearch - West Grove (USA)

<u>Marker</u>	Bezugsquelle
<i>Prestained Protein Marker</i> , Broad Range (7-175 kDa)	New England BioLabs GmbH - Ipswich (USA)
100 bp DNA Ladder	New England BioLabs GmbH - Ipswich (USA)
λ -DNA-BstE II Digest	New England BioLabs GmbH - Ipswich (USA)

<u>Puffer und Lösungen</u>	Zusammensetzung
BSA	- 5% Bovine Serum Albumin Heat Shock in Proteinwaschpuffer
ECL Lösung A	- H ₂ O - 100 mM Tris pH 8,5 - 2,5 mM Luminol - 0,4 mM Coumaric acid
ECL Lösung B	- H ₂ O - 100 mM Tris pH 8,5 - 1,5% Wasserstoffperoxid
Laufpuffer	- 191,8 mM Glycin - 3,46 mM SDS - 23,93 mM Tris Base
Proteinwaschpuffer	- 170 ml 1M Tris HCL - 340 ml 5M NaCl - 17 ml Tween 20
Sammelgelpuffer (pH 6,9)	- 484 mM Tris HCl - 16 mM Tris Base - 14 mM SDS

Transferpuffer	- 383,6 mM Glycin - 49,52 mM Tris Base - 20% Methanol
Trenngelpuffer (pH 8,8)	- 360 mM Tris HCl - 1140 mM Tris Base - 14 mM SDS
Lösung Trenngel 10% (2x)	- 3 ml Rotiphorese - 1,5 ml Wasser - 4,5 ml Trenngelpuffer - 90 µl 10% APS - 15 µl Temed
Lösung Sammelgel 10% (2x)	- 0,535 ml Rotiphorese - 1,135 ml Wasser - 1,665 ml Wasser - 40 µl 10% APS - 5 µl Temed

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung und Vervielfältigung rekombinater DNA

3.2.1.1 PCR

Zur Herstellung von rekombinater DNA wurde zunächst das Zielgen (*Template*) mittels *polymerase chain reaction* (PCR) vermehrt. Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, bei der eine Nukleinsäuresequenz mit Hilfe der enzymatischen Reaktion der Polymerase *in vitro* exponentiell amplifiziert werden kann (Mullis and Faloona 1987). Es werden spezifische Primer benötigt, wobei jeweils ein Vorwärts-Primer (FP) für das 3' Ende des *Templates* und ein Rückwärts-Primer (RP) für das 5' Ende benötigt wurde. Primer bestehen aus einem Stück Einzelstrang-DNA, welches komplementär zu der entsprechenden DNA-Sequenz des *Inserts* ist und einem Überhang, der eine Schnittstelle für die später folgende Klonierung enthält (Mullis and Faloona 1987).

Der PCR Ansatz bestand aus 0,1 µg DNA (*Template*), 0,5 µl Vorwärts-Primer, 0,5 µl Rückwärts-Primer, 5 µl AccuPrime 10x PCR Buffer II und 1 µl AccuPrime Taq DNA Polymerase System (hitzebeständige DNA Polymerase) und wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde im Thermocycler (Eppendorf Mastercycler) durchgeführt. In jedem Zyklus

lus wurde die DNA zunächst bei 95 °C für 3 Minuten denaturiert (*Melting*), so dass die DNA in Einzelsträngen vorlag. Im Anschluss wurde die Temperatur für 30 Sekunden auf 58 °C abgesenkt, um das Anlagern des Primers (*Annealing*) zu ermöglichen. Die Arbeit der AccuPrime Taq DNA Polymerase wurde durch eine erneute Erhöhung der Temperatur auf 68°C ermöglicht, wobei diese eine Synthese des neuen DNA Strangs in 5'-3' Richtung ermöglicht und dabei eine Geschwindigkeit von 1 min/kbp leisten kann. Je nach Länge des *Templates* wurde die Zeit für den Schritt bei 68 °C variiert. Die PCR wurde zumeist mit 15 Zyklen durchgeführt. Des Weiteren kann die PCR genutzt werden, um ein RNA-Transkript in isolierter RNA aus Zellen und Geweben zu detektieren. Die Primer werden spezifisch für die gesuchte Sequenz erstellt und binden entsprechend nur, wenn die isolierte RNA das gesuchte Transkript enthält. Um das PCR-Produkt zu überprüfen, wurde eine Größenkontrolle durchgeführt. Dazu wurden 5 µl des PCR-Produktes zusammen mit einem λ - oder 100 Bp Marker auf ein 1%-iges Agarose-Gel geladen und die Gelelektrophorese bei 90 V für etwa 30 Minuten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der DNA mittels Phenolextraktion. Hierfür wurde das PCR-Produkt mit 50 µl Phenol versetzt und gut vermischt. Durch Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 15 Minuten entstanden 2 Phasen, wobei sich in der unteren Phase das Phenol und im Überstand die DNA in H₂O ansammelte. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Im nächsten Schritt folgte die Fällung der DNA. Dazu wurden zunächst 5 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 150 µl eiskaltes 100%-iges Ethanol zugefügt und gut vermischt. Das Gemisch wurde mit 1 µl Glykogen versetzt und für mindestens 2 Stunden bei -20 °C inkubiert. Danach wurde die Probe für 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol dreimal gewaschen. Die reine DNA wurde schließlich getrocknet und in Aqua destillata (a.d.) resuspendiert.

3.2.1.2 Restriktionsenzymverdau

Um die Klonierung des durch die PCR gewonnenen und vermehrten Zielgens in einen gewünschten Vektor möglich zu machen, mussten zunächst sowohl das PCR-Produkt (*Insert*) als auch der Vektor mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut werden. Dabei wurden sowohl der Vektor als auch das *Insert* mit je zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Restriktionsenzyme sind Enzyme, die die DNA immer an einer spezifischen Basensequenz schneiden. Die Größe und Anzahl der dabei entstehenden Fragmente ist spezifisch und macht eine Identifikation möglich. Darüber hinaus sind die entstandenen Schnittstellen komplementär und ermöglichen eine spätere Zusammenführung von *Insert* und Vektor zu einem Plasmid. Die Auswahl der passenden Restriktionsenzyme erfolgt für jedes Plasmid spezifisch. Wel-

cher Enzympuffer bei einer bestimmten Enzymkombination eingesetzt wird, wurde aus den Angaben des Herstellers entnommen („NEBuffer Activity Chart for Restriction Enzymes“ New England BioLabs, November 2008).

Durchgeführt wurde der Restriktionsenzymverdau des PCR-Produktes (*Inserts*) in Form eines 30 µl Verdaus über Nacht. Hierzu wurde das PCR Produkt in 26 µl H₂O gelöst und mit 0,3 µl Restriktionsenzym 1, 0,3 µl Restriktionsenzym 2, 3 µl 10-fach Enzym Puffer und 0,4 µl BSA versetzt. Um einen Vektor zu gewinnen, wurde dieser aus bereits bestehen Plasmiden mittels standardmäßigem Restriktionsverdau isoliert. Ein standardmäßiger Restriktionsverdau, wie er auch zur diagnostischen Kontrolle nach DNA Präparation eingesetzt wird, erfolgt in Form eines 30 µl Verdaus für 1-3 Stunden bei 37 °C. Hierzu wurde 1,5 µg DNA in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 0,5 µl Enzym 1, 0,5 µl Enzym 2 und 3 µl 10-fach Enzym Puffer versetzt. Der Verdau wurde mit Aqua destillata zu 30 µl Gesamtvolumen ergänzt. Bei dem Verdau des Vektors mit dem Ziel der Klonierung sollte der Verdau 3 Stunden inkubiert und nach 2 ½ Stunden 1 µl CIP hinzugefügt werden, um zu verhindern, dass sich der Vektor selbst ligiert.

Im Falle eines diagnostischen Restriktionsenzymverdaus nach DNA Präparation wurden die verdauten Proben zusammen mit einem λ-Marker oder einem 100 Basenpaar-Marker im Anschluss auf ein 1%-iges Agarose Gel geladen und mittels Gelelektrophorese bei 90 V für 30 Minuten aufgetrennt.

3.2.1.3 Ligation

Der Prozess der Ligation beschreibt die Integration des *Inserts* in den Vektor. Im Anschluss an den Restriktionsenzymverdau wurden sowohl 15 µl des *Inserts*, also auch 15 µl des Vektors auf ein *low melting* Agarose Gel (LMA) geladen. Die Gelelektrophorese wurde bei maximal 85 V über 30 Minuten durchgeführt. Die entstandenen Banden des *Inserts* und des Vektors wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 70°C geschmolzen. Parallel wurden zwei weitere Zentrifugenröhrchen (Kontroll-*Tube* und *Insert-Tube*) vorbereitet. Zunächst wurden in das Kontroll-*Tube* 35 µl H₂O, 0,4 µl T4 DNA Ligase, 5 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 2 µl der verflüssigten Vektor LMA pipetiert. Die Hälfte des Volumens des Kontroll-*Tubes*, also 21,2 µl wurden dann in das *Insert-Tube* überführt und mit 4 µl *Insert* versetzt. Im *Insert-Tube* lagen Vektor und *Insert* somit im Verhältnis 1:4 vor. Beide Zentrifugenröhrchen wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, wobei im *Insert-Tube* die Ligation stattfinden konnte.

3.2.1.4 Transformation

Um zu überprüfen, ob die Ligation zwischen *Insert* und Vektor stattgefunden hat, wurden im Folgenden sowohl das Produkt aus dem *Insert-Tube* als auch das Produkt aus dem Kontroll-*Tube* transformiert. Bei der Transformation wird die Plasmid-DNA mit Hilfe von kompetenten Bakterienstämmen vermehrt. Kompetente Bakterienstämme zeichnen sich dadurch aus, dass sie frei im Medium vorkommende DNA aufnehmen können (Young and Spizizen 1961). Bei den hierfür verwendeten Bakterien handelt es sich um E.coli MC1061 und MC1061 P3 Stämme. Auch die Vermehrung von bereits bestehenden Plasmiden fand mit Hilfe der Transformation statt. Die verwendeten Plasmide enthielten entweder eine Ampicillinresistenz oder eine Ampicillin- und Tetracyclinresistenz. Im Falle der Vermehrung eines bestehenden Plasmides wurde je 1 µg der zu vermehrenden Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und mit 50 µl des entsprechenden Bakterienstammes vermischt. Bei der Transformation nach Klonierung wurden je 5 µl des Ligasegemisches aus dem *Insert-Tube* und dem Kontroll-*Tube* mit 50 µl des entsprechenden Bakterienstammes vermischt. Dabei wurden für Plasmide mit Ampicillinresistenz E.coli MC1061 und für Plasmide mit Ampicillin- und Tetracyclinresistenz E.coli MC1061 P3 eingesetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von 15 Minuten auf Eis und anschließend eine Erwärmung auf 37 °C für 5 Minuten. Das Gemisch wurde auf einer Agarplatte ausgestrichen, welche mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war. Dabei herrschte in den Platten mit Ampicillin eine Endkonzentration von 100 µg/ml und in den Platten mit Ampicillin und Tetracyclin eine Endkonzentration von 25 µg/ml Ampicillin und 7,5 µg/ml Tetracyclin. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C gelagert. Wenn die Transformation eines Bakteriums erfolgreich war, konnte sich dieses, durch die mit dem Plasmid aufgenommenen Antibiotikaresistenz, selektiv auf der Agarplatte vermehren. Im Falle der Transformation nach Klonierung wurde die Platte geteilt und auf einer Seite wurde das Gemisch aus dem Kontroll-*Tube* ausgestrichen und auch der anderen Seite das Gemisch aus dem *Insert-Tube*. Auf der Kontrollseite durften entsprechen keinen Kolonien gewachsen sein. Nur wenn diese Bedingung erfüllt war, konnten die Kolonien der *Insert*-Seite für die weitere DNA Vervielfältigung genutzt werden.

3.2.1.5 DNA-Präparation

Nach erfolgreicher Transformation wurden Mini-Kulturen angelegt. Dabei wurde zunächst je 3 ml des LB Broth Nährmediums in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und im Anschluss mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Es wurden folgende Endkonzentra-

tionen erzeugt. LB Broth Medium mit Ampicillin enthielt 100 µg/ml Ampicillin und das LB Broth Medium mit Ampicillin und Tetracyclin enthielt 25 µg/ml Ampicillin und 7,5 µg/ml Tetracyclin. Das Medium mit Kanamycin hatte eine Endkonzentration von 50 µg/ml Kanamycin. Eine einzelne Kolonie wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Platte gepickt, in das vorbereitete 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für mindestens 8 Stunden bei 37 °C und 220 U/min geschüttelt. Eine erfolgreiche Vermehrung der Kolonie wurde durch eine Trübung der Mini-Kultur sichtbar.

Um die Plasmid-DNA weiter zu vervielfältigen und aufzureinigen wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Hierfür musste mindestens 12 Stunden vorher eine Maxi-Kultur aus der Mini-Kultur angelegt werden. Dazu wurden 200 ml LB-Broth Base Nährmedium in einen 500 ml Kolben gegeben und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt (Endkonzentrationen der Antibiotika siehe Mini-Kultur). 200 µl der Bakterien-Suspension wurde aus der Mini-Kultur entnommen und in den 500 ml Kolben überführt. Die Maxi-Kultur wurde für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 220 U/min geschüttelt. Auch hier zeigte sich eine erfolgreiche Vermehrung der Bakterien durch eine Trübung des Nährmediums.

Die Isolation der cDNA aus der Bakterienkultur erfolgte mittels einer Maxipräparation mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit und entsprechend des Protokolls des Herstellers Qiagen.

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA Konzentration in µg/µl wurde eine Photometrische Messung durchgeführt. Nur Werte unter 1,8 für die Proteinverunreinigungen (260/280 Wert) und 2,0 für die Salz- und Kohlenhydratverunreinigung (260/230 Wert) wurden akzeptiert.

Zur Kontrolle der Plasmide wurde ein diagnostischer Verdau (s.o.) durchgeführt.

3.2.2 RNA Isolation

Um die Expression eines Proteins in Zellen oder Geweben zu untersuchen, musste zunächst die RNA isoliert werden, welche im anschließenden Schritt mittels PCR und spezifischen Primern auf das gesuchte RNA-Transkript hin untersucht wurde. Die RNA-Isolierung aus Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Plus Kit von Qiagen und unter Einhaltung der Herstelleranleitung durchgeführt.

3.2.3 Zellkultur

Die für die Versuche verwendeten HEK293T-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 4,5 g Glukose und zusätzlichen 10% FCS, bei 37 °C und 5% CO₂ in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert.

Die Subkultivierung erfolgte alle 2 Tage je nach Konfluenz (meist in einer 1:6 oder 1:7 Passage). Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Schale mit PBS gespült. Das Ablösen der Zellen wurde durch Zugabe von 1 ml Trypsin und einer Inkubation von 5 Minuten bei 37 °C erreicht. Die abgelösten Zellen wurden im Anschluss mit 5 bzw. 6 ml DMEM-Medium (4,5 g/l Glukose und 10% FCS) versetzt und je ein 1 ml des entstandenen Gemisches in eine neue 10 cm Schale mit 9 ml des gleichen Medium gegeben. Die Zellen, welche für einen Versuch benötigt wurden, wurden am Abend vor der Transfektion so gesplittet, dass sie am Morgen der Transfektion einzeln vorlagen. Die Methode entspricht dabei der oben genannten Subkultivierung.

3.2.4 Transfektion

Die transiente Transfektion der HEK293T-Zellen mit Plasmid DNA fand mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode statt. Sie beruht auf der Fähigkeit der Zellen, die entstandenen Calcium-Phosphat Kristalle zu phagozytieren, an die zuvor die zu transfizierende Plasmid DNA gebunden hat (Graham and van der Eb 1973, Loyter, Scangos et al. 1982). Dies führt zu einer Überexpression der gewünschten Proteine in den HEK293T-Zellen.

Die Transfektion erfolgte 12-14 Stunden nach der oben genannten Subkultivierung der Zellen. Je nach Versuch wurden 5-20 µg Plasmid-DNA in 1,5 µl Zentrifugenröhrchen vorgelegt und zunächst mit 500 µl 0,25 M Calciumchlorid Lösung versetzt. Unter vortexen wurden nun je 500 µl 2x HEBS tröpfchenweise hinzugegeben. Die entstandene Lösung wurde gleichmäßig in die 10 cm Schalen pipettiert. Das Medium wurde 6-8 Stunden nach dem Beginn der Transfektion gewechselt, wobei je nach Versuch entweder auf DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose (25 mmol/l) und 10% FCS, DMEM-Medium mit 1,0 g/l Glucose (5,5 mmol/l) und 10% FCS oder DMEM-Medium mit 4,5 g/l Glucose ohne FCS gewechselt wurde.

3.2.5 Zellernte

Die transfizierten HEK293T-Zellen wurden maximal 24 Stunden nach Transfektion geerntet. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und auf jede Schale 5 ml 4°C kaltes PBS gegeben. Mit Hilfe des PBS wurden die Zellen durch senkrechtes pipettieren abgelöst. Die PBS-Zell-Suspension jedes Datenpunktes wurde daraufhin vollständig aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, wobei die Zellen der beiden Schalen eines Datenpunktes in je einem 15 ml Zentrifugenröhrchen gepoolt wurden. Im Anschluss wurden die

Proben 5 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C pelletiert. Das so entstandene Zellpellet konnte nun für die Co-Immunopräzipitation, das *Pulldown*-Assay oder Biotin-Assay genutzt werden.

3.2.6 Co-Immunopräzipitation

Die durch die Zellernte entstandenen HEK293T-Zell-Pellets wurden nun verwendet, um eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchzuführen. Dabei sollte untersucht werden, inwieweit die vorher transfizierten Proteine miteinander interagieren. Die Zell-Pellets in den 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden dabei in IP-Puffer resuspendiert und in 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Menge des IP-Puffers war dabei jeweils abhängig von der Pelletgröße und lag zwischen 150 µl und 400 µl. Während einer 15-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen durch den IP-Puffer lysiert und anschließend 15 Minuten bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde jeweils in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10% als Lysat entnommen. Die Lysate wurden mit der gleichen Menge 2x Laemmli versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Der restliche Überstand wurde nun für die eigentliche Co-Immunopräzipitation verwendet. Dazu wurde dieser bei 4 °C mit 30 µl Protein-G-Sepharose, 30 µl Anti-Flag M2 *Affinity* Gel oder 2,5 µl Anti-Nephrin-Antikörper gefolgt von 30 µl Protein-A-Sepharose für 60 Minuten auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben bei 4 °C und 3000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert und danach mit 800 µl IP-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach einer letzten Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 1 min wurde der entstandene Überstand komplett abpipettiert und die Pellets in je 30 µl 2x Laemmli resuspendiert und ebenfalls bei 95 °C für 5 Minuten gekocht. Dies führte zu einer Denaturierung der Wasserstoffbrückenbindungen. Durch das DTT im 2x Laemmli kam es außerdem zur Reduktion der Disulfidbrücken (Cleland 1964). Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine ebenso wie entstandene Bindungen wurden aufgelöst (Laemmli 1970). Die Proben wurden dann mittels Western Blot weiter ausgewertet.

3.2.7 Pulldown-Assay

Als weitere Methode zum Nachweis von Protein-Interaktionen wurde das *Pulldown*-Assay verwendet. Hierbei wurden je 1 µg Gluthation-S-Transferase(GST)-Fusions-Protein bzw. 1 µg GST-mono-rekombinates Protein als Kontrolle mit jeweils 1 µg des Test-Proteins in 500 µl IP-Puffer für 30 Minuten auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden 30 µl

GST-Sepharose hinzugegeben und weitere 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem auf diese Weise der *Pulldown* erfolgte, wurden die Proben wie in der Co-IP mit 1ml IP-Puffer gewaschen um das Testprotein zu entfernen, welches nicht an das GST-Fusions-Protein gebunden hat. Vor Zugabe der GST-Sepharose wurde je ein Teil der Proben zum Nachweis des *Inputs* entnommen. Die Proben wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter ausgewertet.

Das GST-Fusions-Protein wurde im Vorfeld wie folgt generiert. Die Plasmid DNA des GST-markierten Proteins wurde wie oben beschrieben hergestellt und über Nacht bei 37 °C in E.coli Bakterien transformiert. Hierfür wurden 10 ml Bakterien mit einer ausreichenden Menge Plasmid auf ein Liter Nährmedium verdünnt. Nach Erreichen einer OD₆₀₀= 0,55 (optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm) wurde 10 µM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) hinzugegeben und 3 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien pelletiert und eingefroren. Zur Zellyse wurden die gefrorenen Bakterien in 30 ml Puffer zur Herstellung rekombinanter Proteine und 6 mg Lysozym aufgetaut. (D.M. Berman et al., Cell 86, 445-452, 1996). Nach Zentrifugation wurde das entstandene Lysat auf die Glutathion Sepharose 4B Säulen überführt und die Aufreinigung durchgeführt. Die Säulen wurden zuvor mit 50 ml PBS equilibriert und nach Durchlauf des Lysates mit 50 ml PBS gewaschen. Zu Elution des gebundenen Materials in der Säule wurde diese fünfmal mit Elution-Puffer (10 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl pH8.0) befüllt und das Eluat gesammelt.

3.2.8 Biotin-Assay

Um die Endozytose von Nephlin experimentell untersuchen zu können, wurden Biotin-Assays durchgeführt. Biotin führt durch Bindung an primäre Amine zur Biotinylierung des Proteins und wird selber wiederum sehr spezifisch durch Streptavidin gebunden. Inkubiert man intakte Zellen mit Biotin, können nur Proteine an der Oberfläche biotinyliert werden, wodurch eine vergleichende Aussage über die Endozytoseprozesse gemacht werden kann. Streptavidin gekoppelt an HRP macht eine Auswertung mittels Chemilumineszenz möglich.

Für die Biotin-Assays wurden HEK293T-Zellen wie obenstehend jeweils mit Nephlin und 4.1O oder cdm8 als Kontrolle transfiziert, wobei jeweils 4 Schalen pro Datenpunkt benötigt wurden. Die Zellernte erfolgte grundlegend nach dem oben genannten Prinzip, jedoch wurde das PBS zusätzlich mit 0,1 mM CaCl₂ und 1mM MgCl₂ versetzt. Außerdem war ein weiterer Zentrifugationsschritt nötig, um die 4 Schalen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen zu poolen.

Die so entstandenen Pellets wurden nach Absaugen des Überstandes in je 5 ml Biotinlösung (0,5 mg/ml in PBS + 0,1 mM CaCl₂ + 1 mM MgCl₂) resuspendiert, in ein 1,5 ml *Tube* überführt und für 30 Minuten bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Dieser Schritt dient der Bio-

tinylierung von Nephrin an der Zelloberfläche. Zum Entfernen von nichtgebundenem Biotin wurden die Zellen bei 1500 rpm und 4 °C für 3 Minuten pelletiert, der Überstand abgesaugt und vorsichtig mit je 5 ml PBS + 0,1 mM CaCl_2 + 1 mM MgCl_2 + 100 mM Glycin gewaschen. Nach 20 Minuten auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C wurde dieser Waschschrift wiederholt. Erneut wurden die Zellen bei 1500 rpm und 4 °C für 3 Minuten pelletiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von je 500 μl IP-Puffer und einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Das weitere Vorgehen entspricht den Schritten der Co-IP ab der Zelllyse, wobei die Präzipitation durch Inkubation mit 2,5 μl Anti-Nephrin-Antikörper für 1 Stunde und anschließender Zugabe von 30 μl Protein-A-Sepharose für 1 Stunde stattfand. Die Proben wurden dann mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot weiter ausgewertet.

3.2.9 *Western Blot*

3.2.9.1 SDS Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen *Blotting* wurden die Proteine in den Proben zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach im SDS-Gel aufgetrennt.

Die SDS-Gele für die Elektrophorese bestanden aus einem Trenngel und einem Sammelgel und wurden nach oben genannten Rezepten gegossen (siehe 3.1.3.5). Dabei war darauf zu achten, dass sowohl APS, als auch Temed erst kurz vor dem Gießen der Gele dazugegeben werden durfte. Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit 99,8% Isopropanol überschüttet. Das Sammelgel wurde nach Aushärtung des Trenngels und Abgießen des Isopropanols auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm versehen. Die ausgehärteten Gele wurden nun für die Gelelektrophorese in eine mit 1x Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingespannt und die Taschen mit 15 μl Probe oder 5-8 μl Proteinmarker beladen. Die Gelelektrophorese verlief in zwei Stufen. In der Sammelgelphase wurde eine Spannung von 70 V für 30 Minuten angelegt und in der darauffolgenden Trenngelphase eine Stromstärke von 20 mA pro Gel für 90 min veranschlagt. Hierbei sammeln sich die Proteine zunächst am Trenngel um sich dann in der zweiten Phase entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Das in den Gelen befindliche SDS überdeckt dabei die Eigenladung des Proteins, so dass diese bei der Auftrennung zu vernachlässigen ist. Die nun negativ geladenen Proteine wandern im angelegten elektrischen Feld, wobei kleine Proteine schneller durch das Gel wandern als größere (Laemmli 1970).

3.2.9.2 Tank-Blotting

Nach der Gelelektrophorese erfolgte das *Tank-Blotting*, bei dem die Proteine vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Im Voraus wurde der 1x Transferpuffer hergestellt und bei 4 °C kaltgestellt. Sofort nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, in Transferpuffer eingelegt und anschließend zusammen mit der Nitrozellulosemembran und dem Blottingpapier in einem sogenannten „Gel-Sandwich“ zusammengesetzt. Das Blotting selbst erfolgte vertikal und bei 200 mA für 2 Stunden, wobei die negativ geladenen Proteine im gerichteten elektischen Feld in Richtung der Anode (Plus-pol) wandern und somit auf die Nitrozellulosemembran übertragen werden (Towbin, Staehelin et al. 1979). Im Anschluss wurde die Nitrozellulosemembran entweder bei 4 °C ü.N. oder bei 37 °C für 1 Stunde in 5%-igem BSA inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen.

3.2.9.3 Immunmarkierung

Um die Proteine auf der Membran sichtbar zu machen, erfolgt eine spezifische Antikörper-nachweisreaktion. Zunächst wurde die in BSA gelagerte Nitrozellulosemembran mit Protein-waschpuffer gewaschen und mit den entsprechenden primären Antikörpern mindestens 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte zu je 5 Minuten, um unspezifische Bindungen und nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran im sekundären Antikörper, welcher gegen den Fc-Teil (kristallisierbares Fragment) des primären Antikörpers gerichtet ist, ebenfalls 1 Stunde inkubiert und erneut mit drei Waschschrten je 5 Minuten gewaschen. Der sekundäre Antikörper ist zudem mit einem Enzym, der Meerrettichperoxidase (HRP), konjugiert.

Zur Detektion wurden je 1 ml *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Lösung A und ECL-Lösung B vermischt und gleichmäßig auf der Nitrozellulosemembran verteilt. Die HRP des sekundären Antikörpers kann das Wasserstoffperoxid aus dem ECL als Substrat nutzen. Die freiwerdenden Protonen aus dieser Reaktion führen zu einer Reaktion des ECL Bestandteils Luminol, wobei es zur Emission von Chemilumineszenz kommt (Kricka and Whitehead 1987). Diese Emission konnte mit Hilfe der Kamera des FluorChem® FC2 detektiert werden.

3.2.10 Auswertung

Mittels des *Imagers FluorChem® FC2* konnten die Emissionen der Chemilumineszenz detektiert und in eine digitale Form gebracht werden. Die densitometrische Auswertung der einzelnen Banden erfolgte mit Hilfe des Programms *Alphaview SA*. Eine hintergrundkorrigierte Dichtebestimmung der einzelnen Banden lieferte dabei die Absolutwerte für die statistische Auswertung.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 6* unter der Verwendung des nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Tests.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von 4.1O in humanen Podozyten

Bislang konnte die Expression des Proteins 4.1O nur im Ovar, fetalem Muskel, fetalem Gehirn und fetalem Thymus nachgewiesen werden (Ni, Ji et al. 2003). Um die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten untersuchen zu können, musste zunächst die Frage geklärt werden, ob das Protein 4.1O überhaupt in der Niere und in den humanen Podozyten exprimiert wird.

Das Protein 4.1O existiert in zwei verschiedenen Splicevarianten (siehe Abb. 4). Die Splicevariante 4.1O *long* weist N-terminal eine Aminosäuresequenz von 49 Aminosäuren auf. Die Splicevariante 4.1O *short* hingegen besitzt N-terminal nur 5 Aminosäuren. Eine Übereinstimmung zwischen den beiden Splicevarianten gibt es in diesem Bereich nur zwischen 3 Aminosäuren. Die restlichen 44 Aminosäuren der Sequenz von 4.1O *long* fehlen bei der Splicevariante 4.1O *short*. Ab der fünfzigsten Aminosäure sind die Aminosäuresequenzen beider Varianten identisch. Für das Protein 4.1O *long* ergibt sich daher eine Größe von 598 Aminosäuren und für das Protein 4.1O *short* eine Größe von 554 Aminosäuren.

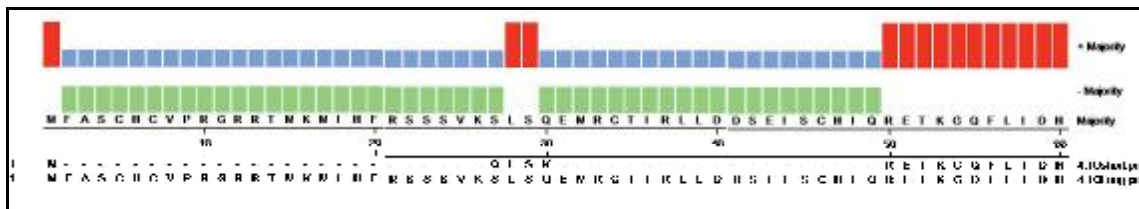


Abb. 4: Darstellung der zwei Splicevarianten des Proteins 4.1O.

Vergleich der ersten 60 Aminosäuren beider Splicevarianten. N-terminal weist die Splicevariante 4.1O *long* 49 Aminosäuren auf. Die Splicevariante 4.1O *short* besitzt N-terminal 5 Aminosäuren, wobei die restlichen 44 Aminosäuren im Vergleich zu 4.1O *long* fehlen. Eine Übereinstimmung findet sich in diesem Bereich nur zwischen den Aminosäuren 1, 28 und 29. Ab der fünfzigsten Aminosäure sind die beiden Splicevarianten identisch. Darstellung erstellt mit MegAlign Version 3.0.25 (Software Suite for Sequence Analysis) von DNASTAR Lasergene.

Zum Nachweis der Expression des Proteins 4.1O wurde eine konventionelle PCR aus humanen Podozyten, isolierter RNA aus humanem Nierengewebe und HEK293T-Zellen durchgeführt, um das 4.1O-RNA-Transkript zu detektieren. Die humanen Podozyten wurden über 14 Tage in der Zellkultur ausdifferenziert. Die HEK293T-Zellen wurden regulär subkultiviert. Die isolierte RNA aus Nierengewebe (*FirstChoice® Human Kidney Total RNA*) wurde kommerziell erworben. Eine PCR mit 4.1O Primern wurde durchgeführt. Da zwei Splicevarianten von 4.1O (4.1O *short* und 4.1O *long*) existieren, wurde die PCR sowohl für 4.1O *short* (1662

bp) als auch 4.1O *long* (1794 bp) durchgeführt. Als Negativkontrolle diente H₂O. Zum Nachweis der Expression auf Proteinebene wurde zusätzlich ein Westernblot auf 4.1O *short* und *long* aus humanen Podozyten und HEK293T-Zellen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass sowohl die Splicevariante 4.1O *short*, also auch 4.1O *long* in humanen Podozyten und HEK293T-Zellen exprimiert wird (siehe Abb. 5).

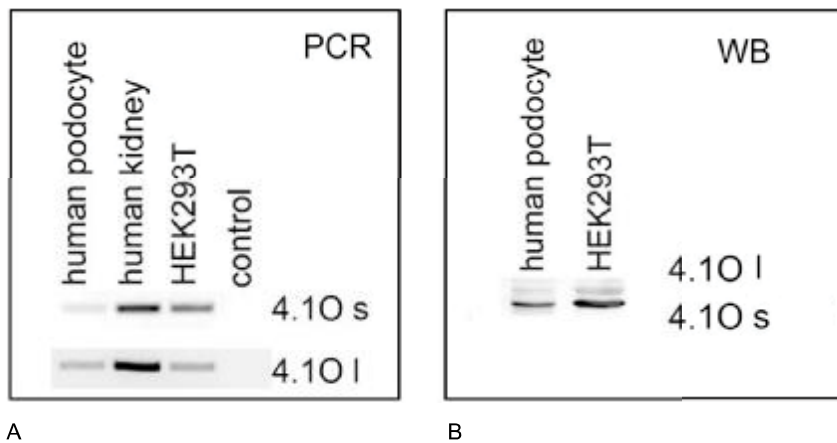


Abb. 5: Nachweis der 4.1O Expression in humanen Podozyten, humanem Nierengewebe und HEK293T-Zellen mittels PCR und Westernblot.

Die humanen Podozyten differenzierten über 14 Tage in der Zellkultur. Die HEK293T-Zellen wurden regulär subkultiviert. Die isolierte RNA aus humanem Nierengewebe wurde kommerziell erworben (A) Nach Isolation der RNA wurde eine PCR zum Nachweis der beiden Splicevarianten 4.1O *short* und *long* durchgeführt. Sowohl die RNA von 4.1O *short* (s) (oben), als auch 4.1O *long* (l) (unten) werden in humanen Podozyten, humanem Nierengewebe und HEK293T-Zellen exprimiert. (B) Auch der Westernblot auf die Proteine 4.1O s und 4.1O l zeigte eine Expression beider Proteine in humanen Podozyten und HEK293T-Zellen mit einer Dominanz von 4.1O s. Die obere, schwächere Bande entspricht 4.1O *long* und die untere, kräftigere Bande 4.1O *short*.

Mit Hilfe des Internetanbieters <http://smart.embl-heidelberg.de/> konnten die Domänen des insgesamt 64 kDa schwere Proteins 4.1O *short* bestimmt werden (siehe Abb. 6). N-terminal befindet sich die 32 kDa schwere FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne mit der 22 kDa schweren B41-Unterdomeäne. An die FERM-Domäne schließt sich eine 5,3 kDa schwere FA (FERM-assoziierte)-Domäne an. Weiterhin folgt die 13 kDa schwere AB (Aktin-Bindungs)-Domäne und die 12 kDa schwere CT(C-terminale)-Domäne.



Abb. 6: Schematische Darstellung der Domänen des Proteins 4.1O.

Die Darstellung erfolgt auf der Grundlage der Analyse des Internetanbieters <http://smart.embl-heidelberg.de/>. Domänen von N- nach C-terminal: 32 kDa schwere FERM-Domäne (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin-Domäne), 22 kDa schwere B41-Domäne als Unterdomäne der FERM-Domäne, 5,3 kDa schwere FA-Domäne (FERM-assoziierte-Domäne), 13 kDa schwere ABD (Aktin-Bindungs-Domäne) und 12 kDa schwere CTD (C-terminale-Domäne). ([Quelle online im Internet:] URL: <http://smart.embl-heidelberg.de/> [Stand: 07.02.2015,11:37])

4.2 Die Rolle des Proteins 4.1O für die glomeruläre Schlitzmembran

Die gesicherte Expression des Proteins 4.1O in humanen Podozyten führte zu der Frage nach der Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten.

Um sich dieser Frage zu nähern, wurden sowohl Untersuchungen zur Rolle von 4.1O für die glomeruläre Schlitzmembran, als auch zur Rolle von 4.1O für das podozytäre Zytoskelett durchgeführt. Um eine anfängliche Einordnung des Proteins 4.1O in der glomerulären Schlitzmembran vornehmen zu können, wurden zunächst Interaktionen mit bekannten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran untersucht und darauffolgend durch Funktionsstudien ergänzt. In sämtlichen Versuchen wurde nur mit der Splicevariante 4.1O *short* gearbeitet.

4.2.1 Interaktionsstudien

4.2.1.1 4.1O interagiert mit Nephrin

Für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran spielt Nephrin eine entscheidende Rolle. Der Verlust von Nephrin in der Schlitzmembran führt zu schwerwiegender Proteinurie und Nierenversagen (Huttunen 1976, Kestila, Lenkkeri et al. 1998).

Daher sollte zunächst eine mögliche Interaktion von 4.1O mit Nephrin untersucht werden. Hierfür wurden Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) durchgeführt. In getrennten Versuchen sollte darüber hinaus mit Hilfe eines sogenannten Truncationmappings die Bindungsstellen für die 4.1O/Nephrin-Interaktion im jeweilig anderen Protein ermittelt werden. Beim Truncationmapping werden zunächst verschiedene Truncations generiert. Es handelt sich um Abschnitte des Proteins, die festgelegte Aminosäuresequenzen umfassen. In der Zusammenschau ihres Bindungsmusters in der Co-IP lässt sich so auf die für die Interaktion relevanten Aminosäuresequenzen schließen. Zunächst sollte, neben dem Nachweis der Nephrin/4.1O

Interaktion, die relevante Stelle für die Bindung von 4.1O an Nephrin untersucht werden. Die verwendeten HEK293T-Zellen exprimierten Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O), Ig.-markiertes Nephrin cyt (Ig.Nephrin cyt Aminosäuren 1087-1241), welches den gesamten zytoplasmatischen Anteil umfasst und verschiedene Ig.-markierte Nephrin-Truncations oder einen leeren Ig.-Vektor als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden Ig, Ig.Nephrin cyt und die Ig.Nephrin-Truncations mit Protein-G-Sepharose präzipitiert, sowie Lysate der Proben erstellt. Die Proben der Co-IP und der Lysate wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. In der spezifischen Antikörperreaktion wurde die Membran mit Anti-Flag-Antikörper inkubiert und somit gegen F.4.1O gefärbt. Die in Abb. 7 dargestellte Co-IP ist ein exemplarischer Auszug aus der Versuchsreihe, welche drei Versuche umfasst (n=3). Ein Expressionsnachweis der Ig.Nephrin-Truncations und der Negativkontrolle erfolgte durch Inkubation der Membranen der IP und der Lysate mit Anti-human-IgG-Antikörper. Diese Nachfärbungen sind im Anhang 1 (Anhang Abb. 21) zu finden.

Es konnte gezeigt werden, dass F.4.1O mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin (Ig.Nephrin.cyt Aminosäuren 1087-1241) interagiert. Darüber hinaus ergab sich eine Interaktion mit den Nephrin-Truncations Ig.Nephrin Aminosäuren (AA) 1158-1241, AA 1087-1208, AA 1087-1190 und AA 1158-1208. Die Analyse des Bindungsmusters im Truncationmapping weist darauf hin, dass die Bindungsstelle von 4.1O an Nephrin im Bereich der Aminosäuren 1158 bis 1190 liegt (Abb. 7). In dieser C-terminalen Aminosäuresequenz liegen zahlreiche posttranslational modifizierbare Motive.

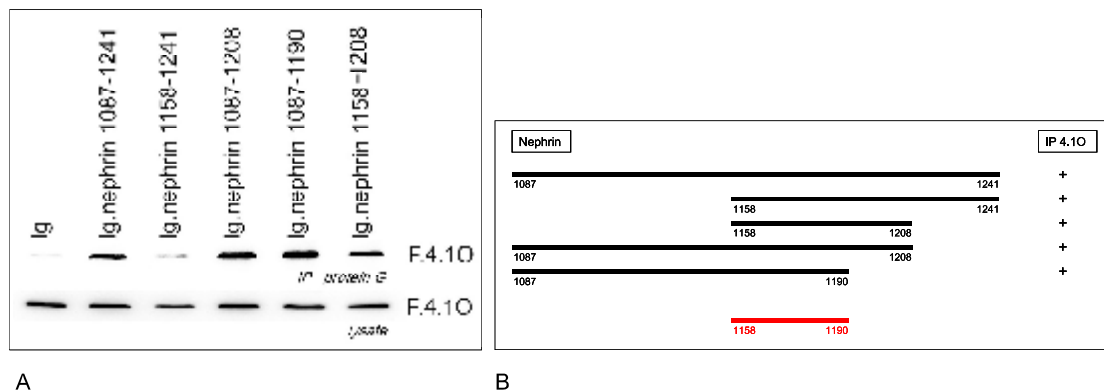


Abb. 7: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1158-1190 von Nephrin.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.1O und Ig.Nephrin cyt, verschiedene Ig.Nephrin Truncations oder einen Ig.Leervektor. Nach Zelllyse wurden Ig.Nephrin cyt und die Ig.Nephrin Truncations mit Protein-G-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gegen F.4.1O gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von F.4.1O mit Ig.Nephrin cyt AA 1087-1241 und den Ig.Nephrin Truncations AA 1158-1241, AA 1087-1208, AA 1087-1190, AA 1158-1208. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von F.4.1O.

(B) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP zwischen Protein 4.1O und Nephrin cyt, sowie der Nephrin Truncations. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit 4.1O als + dargestellt. Das Bindungsmuster weist daraufhin, dass die Bindungsstelle (rot dargestellt) für 4.1O im Bereich der AA 1158-1190 von Nephrin liegt.

Im Anschluss an die Identifikation der relevanten Aminosäuresequenz für die Bindung von 4.1O an Nephrin sollte nun die Bindungsstelle von Nephrin im Protein 4.1O untersucht werden. Hierzu exprimierten HEK293T-Zellen Nephrin WT (Wildtyp) und Flag-markiertes 4.1O (AA 1-554), verschiedene Flag-markierte 4.1O Truncations oder Flag-markiertes GFP (F.GFP) als Negativkontrolle. Die Zellen wurden lysiert und F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit M2-Beads präzipitiert, sowie Lysate der Proben erstellt. Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben der Co-IP und der Lysate aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden anschließend mit Anti-Nephrin-Antikörper inkubiert. Die in Abb. 8 dargestellten Co-IP sind exemplarische Auszüge aus dieser Versuchsreihe. Die Expression der Flag-markierten Proteine wurde nachgewiesen (siehe Anhang 2, Abb. 22).

Erneut zeigte sich, dass F.4.1O mit Nephrin interagiert. Darüber hinaus ergibt sich eine Interaktion mit den F.4.1O Truncations AA 450-554, AA 484-554 und AA 506-554. Keine Interaktion zeigt sich für die F.4.1O Truncations AA 1-181, AA 185-272, AA 278-324, AA 335-450. Das Bindungsmusters im Truncationmapping zeigt somit, dass eine Bindungsstelle für Nephrin im Bereich der Aminosäuren 506-554 von 4.1O liegt (Abb. 8). Die genaue Funktion dieser C-terminalen Domäne ist unklar.

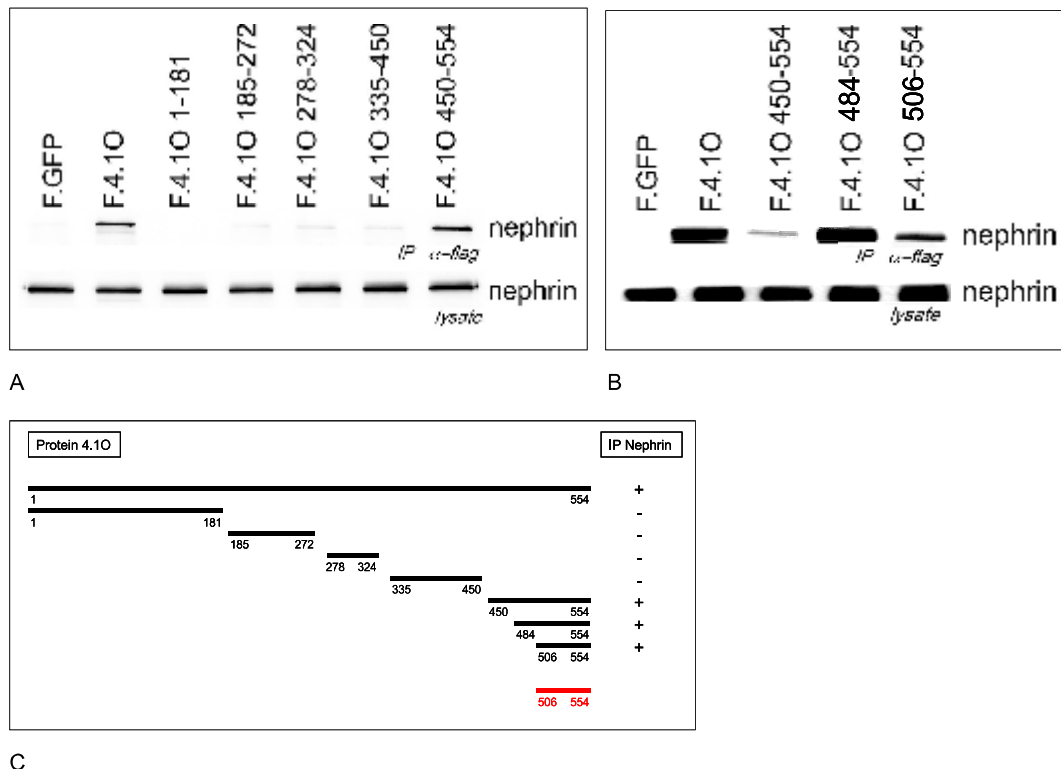


Abb. 8: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 506-554 von 4.1O.

(A) und (B) Die HEK293T-Zellen exprimierten Nephrin und F.4.1O, verschiedene F.4.1O-Truncations oder eine Negativkontrolle (F.GFP). Nach Zellyse wurden F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit M2-Beads präzipitiert und im Immunoblot gegen Nephrin gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von Nephrin mit F.4.1O und den F.4.1O Truncations AA 450-554, AA 484-554 und AA 506-554. Keine Interaktion mit Nephrin zeigen die F.4.1O-Truncations AA 1-181, AA 185-272, AA 278-324 und AA 335-450. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von Nephrin. (C) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP zwischen Nephrin und 4.1O sowie der 4.1O Truncations. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit Nephrin als + und keine Bindung als - dargestellt. Die Bindungsstelle (rot markiert) von Nephrin an 4.1O liegt im Aminosäurebereich von 506-554.

4.2.1.2 4.1O interagiert mit NEPH1

Ein weiteres wichtiges Protein der glomerulären Schlitzmembran ist Nephrin. Strukturell ist NEPH1 ähnlich aufgebaut wie Nephrin (Donoviel, Freed et al. 2001) und bildet darüber hinaus in der Schlitzmembran Heterodimere mit Nephrin (Gerke, Huber et al. 2003). Um zu untersuchen, ob 4.1O auch mit NEPH1 interagiert, wurden HEK293T-Zellen cotransfiziert und exprimierten Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O), Ig.-markiertes NEPH1 (Ig.NEPH1, zytoplasmatischer Anteil von NEPH1), Ig.-markiertes Nephrin cyt (Ig.Nephrin cyt) als Positivkontrolle und

einen leeren Ig.-Vektor (Ig.) als Negativkontrolle. Nach Zelllyse erfolgte die Immunopräzipitation von Ig., Ig.NEPH1 und Ig.Nephrin cyt mit Protein-G-Sepharose. Zuvor wurden Lysate der Proben erstellt. Die Proben der Co-IP und der Lysate wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine im Western Blot auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Es folgte die Inkubation der Membranen mit Anti-Flag-Antikörper, wodurch diese gegen F.4.10 gefärbt wurden. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt (n=3). Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 9 dargestellt. Die Expression von Ig.NEPH1, Ig.Nephrin cyt und der Negativkontrolle Ig. wurde nachgewiesen und ist im Anhang 3 (Anhang Abb. 23) zu finden.

Aus dieser Versuchreihe lässt sich folgern, dass F.4.10 mit Ig.NEPH1 interagiert.

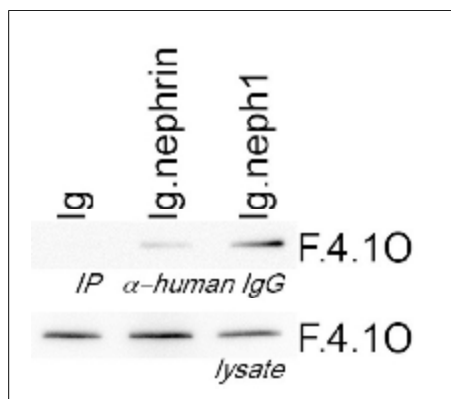


Abb. 9: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.10 und NEPH1.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.10, Ig.NEPH1, Ig.Nephrin als Positivkontrolle und einen Ig.-Leervektor als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden Ig., Ig.Nephrin und Ig.NEPH1 mit Protein-G-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gegen F.4.10 gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von F.4.10 mit Ig.NEPH1 und Ig.Nephrin. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von F.4.10.

4.2.1.3 4.10 interagiert mit GLEPP1

Im nächsten Schritt sollte mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen die Interaktion von 4.10 mit einem weiteren bekannten podozytären Protein, dem GLEPP1, untersucht werden. Ein Verlust der Tyrosinphosphatase GLEPP1 führt zu einer Veränderung der podozytären Struktur und Funktion (Thomas, Wharram et al. 1994, Wharram, Goyal et al. 2000). Neben der Untersuchung der Interaktion, wurde auch hier ein Truncationmapping durchgeführt, um die Bindungsstellen der beiden Proteine aneinander zu detektieren. Zunächst sollte die Bindungsstelle für die GLEPP1/4.10 Interaktion an GLEPP1 untersucht werden. Hierzu wurden Flag-markiertes 4.10 (F.4.10), Ig.-markiertes GLEPP1 cyt (AA 843-1217, umfasst den ge-

samen zytoplasmatischen Anteil), verschiedene GLEPP1-Truncations sowie ein leerer Ig.-Vektor als Negativkontrolle von HEK293T-Zellen exprimiert. Nach Zelllyse folgte die Präzipitation von Ig., Ig.GLEPP cyt und den Ig.GLEPP-Truncations mit Protein-G-Sepharose. Zudem wurden Lysate der Proben erstellt. Durch SDS-Gelelektrophorese wurden sowohl die Proben der IP, als auch der Lysate aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Immunmarkierung erfolgte durch Inkubation der Membranen mit Anti-Flag-Antikörper. Die Färbung erfolgte somit gegen F.4.1O. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt (n=3). Die in Abb. 10 dargestellte Co-IP ist ein exemplarischer Auszug aus dieser Versuchsreihe. In Anhang 4 (Abb. 24) ist der Expressionsnachweis der Ig.-markierten Proteine dargestellt.

Eine Interaktion zwischen F.4.1O und dem zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1 (Ig.GLEPP1 cyt AA 843-1217) sowie eine Interaktion von F.4.1O mit den Ig.GLEPP1-Truncations AA 843-1197, AA 936-1197, AA 936-1217 konnte nachgewiesen werden. Das Bindungsmuster in der Versuchsreihe zeigt, dass die Bindungsstelle von 4.1O an GLEPP1 im Bereich der Aminosäuren 936-1197 liegt (siehe Abb. 10). Dies entspricht der Phosphatasedomäne von GLEPP1.

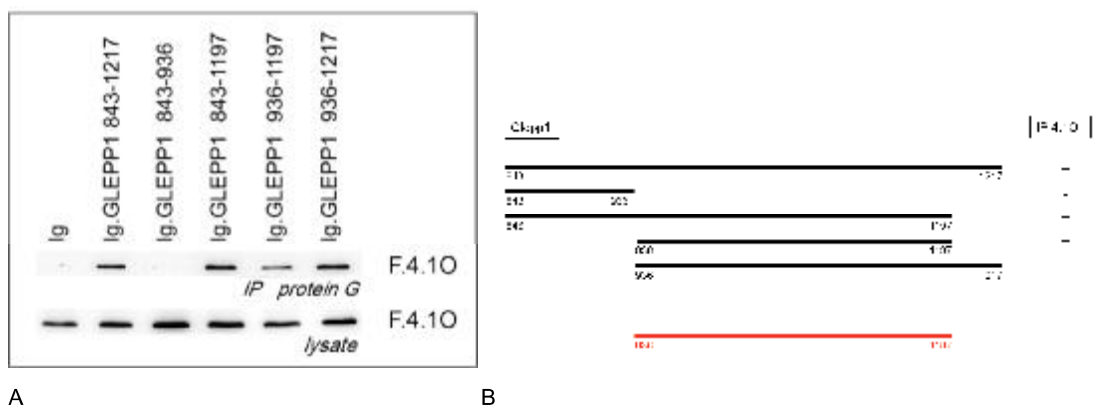


Abb. 10: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 936-1197 von GLEPP1.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.1O und Ig.GLEPP1 cyt, verschiedene Ig.GLEPP1-Truncations oder einen Leervektor (Ig.). Nach Zelllyse wurden Ig.GLEPP1 cyt und die Ig.GLEPP1-Truncations mit Protein-G-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gegen F.4.1O gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von F.4.1O mit Ig.GLEPP1 cyt und den Ig.GLEPP1-Truncations AA 843-1197, AA 936-1197, AA 936-1217. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von F.4.1O. (B) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP zwischen 4.1O und GLEPP1 cyt, sowie der GLEPP1-Truncations. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit 4.1O als + und keine Bindung als – dargestellt. Die Bindungsstelle (rot dargestellt) von 4.1O an GLEPP1 liegt im Bereich der AA 936-1197 (Phosphatasedomäne).

Umgekehrt sollte nun die Bindungsstelle für die GLEPP1/ 4.1O Interaktion an 4.1O untersucht werden. HEK293T-Zellen exprimierten Ig.-markiertes GLEPP1 cyt (Ig.GLEPP1), Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O AA 1-554) sowie verschiedene Flag-markierte 4.1O-Truncations und Flag- markiertes GFP (F.GFP) als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden 10% der Proben zur Erstellung der Lysate genutzt. Mit Hilfe der M2-Beads wurden F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O-Truncations anschließend präzipitiert und die Proben der Co-IP und der Lysate auf SDS-Gele geladen. Im Anschluss an die SDS Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. In der spezifischen Antikörperreaktion wurde die Membran mit Anti-GLEPP1-Antikörper inkubiert. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt (n=3). Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 11 dargestellt. Der Expressionsnachweis von F.4.1O, der F.4.1O-Truncations und der Negativkontrolle wurde erbracht und ist im Anhang 5 (Anhang Abb. 25) zu finden.

Es zeigte sich eine Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Anteil von Ig.GLEPP1 und F4.1O sowie der F.4.1O Truncation AA 1-181. Die Bindungsstelle von GLEPP1 an 4.1O liegt also im Bereich der Aminosäuren 1-181 von 4.1O (siehe Abb. 11). Diese Aminosäuren entsprechen der B41 Domäne von Protein 4.1O.

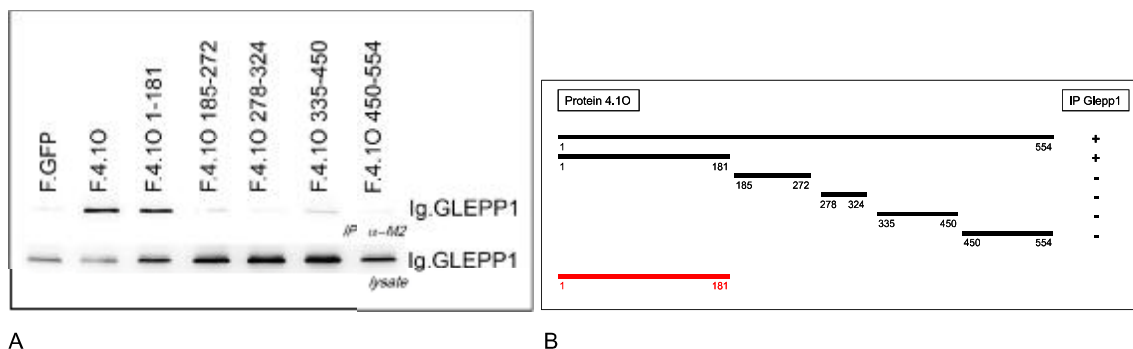


Abb. 11: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1-181 von 4.1O.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten Ig.GLEPP1 cyt, F.4.1O, verschiedene F.4.1O Truncations, sowie F.GFP als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden F.4.1O und die F.4.1O Truncations mit M2-Beads präzipitiert und im Immunoblot gegen Ig.GLEPP1 gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von Ig.GLEPP1 mit F.4.1O und der F.4.1O Truncation AA 1-181. Unten: Die Lysate zeigen eine relativ gleiche Expression von Ig.GLEPP1. (B) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP zwischen GLEPP1 und 4.1O, sowie der 4.1O Truncations. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit 4.1O als + und keine Bindung als – dargestellt. Die Bindungsstelle (rot dargestellt) von GLEPP1 an 4.1O liegt im Bereich der AA 1-181 (B41 Domäne).

4.2.1.4 4.1O bildet Homodimere

Im letzten Teil der Interaktionsstudien sollte untersucht werden, ob 4.1O eine Interaktion mit sich selbst eingeht und somit ggf. ein Homodimer entstehen könnte. Für die Co-Immunopräzipitation wurden HEK293T-Zellen cotransfiziert und exprimierten V5-markiertes 4.1O (V5.4.1O), Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O AA 1-554), Flag-markierte 4.1O-Truncations und Flag-markiertes GFP (F.GFP) als Negativkontrolle. Die Zellen wurden lysiert und F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit *M2-Beads* präzipitiert. Zudem wurden Lysate der Proben erstellt. Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben der IP und der Lysate aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Im Anschluss wurden die Membranen zur Immundetektion mit Anti-V5-Antikörper gegen V5.4.1O gefärbt. Der Versuch wurde viermal durchgeführt (n=4). Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 12 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass 4.1O eine Interaktion mit sich selbst eingeht und somit Homodimere bildet. Darüber hinaus wurde im Truncationmapping gezeigt, dass die Bindungsstelle für die Homodimerbildung im Bereich der Aminosäuren 1-181 und 450-554 liegt (siehe Abb. 12). Bei dem Aminosäurebereich 1-181 handelt es sich um die B41-Domäne und bei den AA 450-554 um eine bisher nicht charakterisierte C-terminale Domäne im Protein 4.1O.

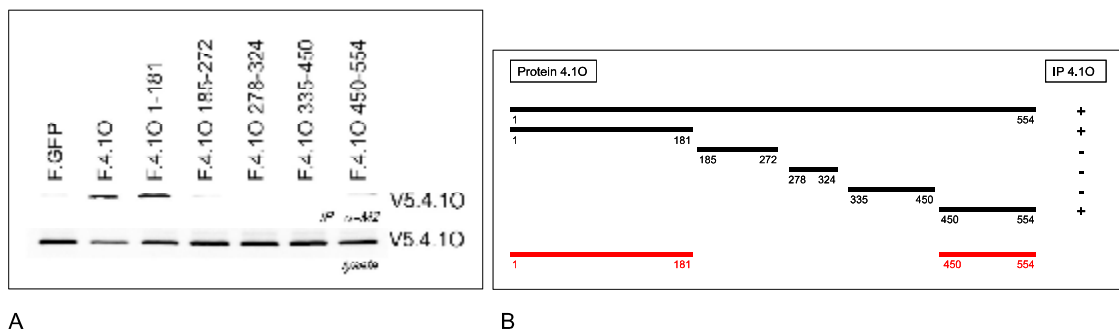


Abb. 12: Nachweis der Interaktion des Protein 4.1O mit sich selbst und Eingrenzung der Interaktionsstelle auf die AA 1-181 und AA 450-554.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten V5.4.1O, F.4.1O und verschiedene F.4.1O-Truncations sowie F.GFP als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit M2-Beads präzipitiert und im Immunoblot gegen V5.4.1O gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von F.4.1O mit V5.4.1O, sowie mit den F.4.1O-Truncations AA 1-181 und AA 450-554. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von V5.4.1O. (B) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP des Proteins 4.1O mit sich selbst. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit 4.1O als + und keine Bindung als – dargestellt. Zwei vermutete Bindungsstellen (rot dargestellt) für diese Interaktion finden sich in den Aminosäurebereichen 1-181 und 450-554.

4.2.2 Funktionsstudien

4.2.2.1 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter hyperosmolaren Bedingungen

Da sowohl die Expression von 4.1O im humanen Podozyten, also auch die Interaktion von 4.1O mit verschiedenen Proteinen der glomerulären Schlitzmembran gezeigt werden konnte, sollte nun die Funktion von 4.1O im Bezug auf die glomeruläre Schlitzmembran untersucht werden. Für 4.1O konnte eine Interaktion mit Nephrin belegt werden. Da die Nephrin/ β -arrestin2-Interaktion eine wichtige Rolle im Bezug auf die dynamische Regulation der glomerulären Schlitzmembran spielt, sollte der Einfluss von 4.1O auf diese Bindung unter verschiedenen Glukosekonzentrationen untersucht werden. Nährmedien mit 25 mM Glukose stellen dabei ein bekanntes Hyperglykämie-Modell in der Zellkultur dar. Unter hohen Glukosekonzentrationen kommt es zu einer Verstärkung der Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 mit konsekutiver Endozytose von Nephrin. Dies führt zum Verlust der Integrität der glomerulären Schlitzmembran (Quack, Rump et al. 2006). Darüber hinaus ist *FRMD3* (codiert u.a. für das Protein 4.1O) ein Kandidatengen für die Diabetische Nephropathie (Pezzolesi, Poznik et al. 2009) und daher erscheint der Einfluss von 4.1O auf die geschilderte dynamische Regulation der Schlitzmembran unter hohen Glukosekonzentrationen besonders interessant. Es wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt, bei denen HEK293T-Zellen mit Flag-markiertem β -arrestin2 (F. β arr2) und Ig.-markiertem Nephrin cyt (Ig.Nephrin cyt) oder einem leeren Ig.-Vektor cotransfiziert wurden. Um den Einfluss von 4.1O zu testen, wurde je ein Ansatz zusätzlich mit entweder V5-markiertem 4.1O (V5.4.1O; Probe 2, 4, 6, 8) oder einem leeren Vektor als Kontrolle (Probe 1, 3, 5, 7) transfiziert. Um den Einfluss der Glukosekonzentrationen zu untersuchen, wurde das Nährmedium 6-8 Stunden nach der Transfektion wie folgt gewechselt: die Proben 3 + 4 wurden auf 5,5 mM Glukose und die Proben 7 + 8 wurden auf 5,5 mM Glukose + 19,5 mM Mannitol gewechselt. Die Proben 5 + 6 sowie die Proben der Negativkontrolle (Proben 1+2) erhielten Medium mit 25 mM Glukose. Nach Zelllyse wurde Ig.Nephrin mit Protein-G-Sepharose präzipitiert sowie Lysate der Proben erstellt. Die Proben der Co-IP und der Lysate wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. In der spezifischen Antikörperreaktion wurde die Membran mit Anti-Flag-Antikörper inkubiert und somit gegen F. β -arrestin2 gefärbt. Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 13 dargestellt. Der Versuch wurde elfmal durchgeführt (n=11) und die statistische Auswertung erfolgte mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Testes (Glukose 5,5 mM: p=n.s., Glukose 25 mM: p=0,0036, Glukose 5,5 mM + 19,5 mM Mannitol: p=0,0287). Die

Membranen der Lysate sowie der IP wurden im Anschluss zum Nachweis gleicher Expression von Ig.Nephrin und der Negativkontrolle im Immunoblot zusätzlich mit Anti-human-IgG-Antikörper und zum Nachweis gleicher Expression von V5.4.1O im Immunoblot zusätzlich mit Anti-V5-Antikörper inkubiert. Diese Nachfärbungen sind im Anhang 6 (Anhang Abb. 26) zu finden.

Es zeigte sich, dass V5.4.1O die Interaktion zwischen Ig.Nephrin und F. β -arrestin2 unter hohen Glukosespiegeln (25 mM) signifikant ($p=0,0036$) hemmt. Derselbe Effekt konnte auch für den Ansatz mit Mannitol gezeigt werden ($p=0,0287$). Unter niedrigen Glukosespiegeln hingegen scheint V5.4.1O die Interaktion zwischen Ig.Nephrin und F. β -arrestin2 nicht zu hemmen ($p=n.s.$). 4.1O hemmt somit die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter hyperosmolaren Bedingungen (siehe Abb. 13).

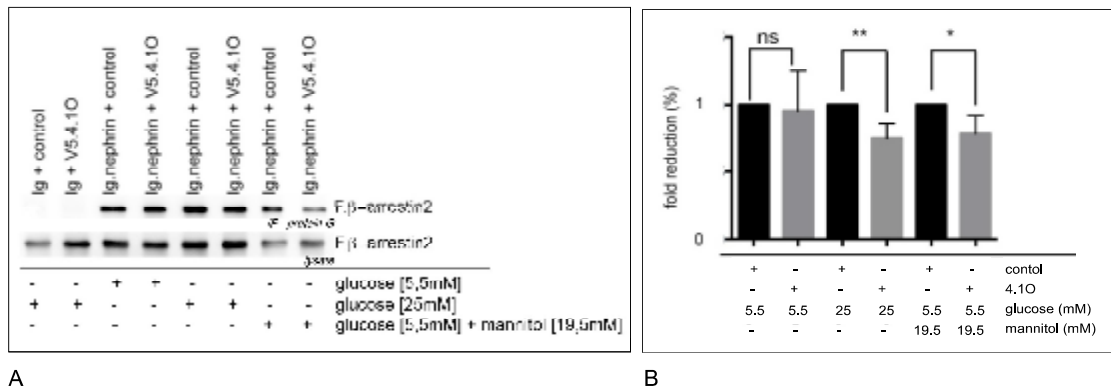


Abb. 13: 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter hyperosmolaren Bedingungen.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten F. β -arrestin2, Ig.Nephrin oder einen Ig.-Leervektor als Negativkontrolle. In den Proben 2, 4, 6 und 8 wurde zusätzlich V5.4.1O transfiziert. Die übrigen Proben exprimierten einen leeren Kontrollvektor. Die Zellen der Proben 1 + 2 und 5 + 6 wurden nach dem Mediumwechsel unter hohen Glukosekonzentrationen (25 mM), Zellen der Probe 3 + 4 unter niedrigen Glukosekonzentrationen (5,5 mM) und Zellen der Proben 7 + 8 unter niedriger Glukosekonzentration (5,5 mM) und Mannitol (19,5 mM) kultiviert. Nach Zellyse wurde Ig.Nephrin mit Protein-G-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gegen F. β -arrestin2 gefärbt. Oben: Die Signale der Co-IP zeigen eine Hemmung der Ig.Nephrin/F. β -arrestin2 Interaktion durch V5.4.1O unter hoher Glukosekonzentration (25 mM, Proben 5 + 6) und unter Mannitol (5,5 mM Glukose + 19,5 mM Mannitol, Proben 7 + 8). Eine Abschwächung der Interaktion durch V5.4.1O unter niedrigen Glukosekonzentrationen (5,5 mM, Proben 3 + 4) besteht nicht. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von F. β -arrestin2. (B) Die statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab eine signifikante Hemmung der Nephrin/ β -arrestin2 Interaktion durch 4.1O unter hoher Glukosekonzentration (25 mM, $n=11$, $p=0,0036$) und unter Mannitol (5,5 mM Glukose + 19,5 mM Mannitol, $n=11$, $p=0,0287$). Eine Hemmung durch 4.1O unter niedrigen Glukosekonzentrationen ergab keine Signifikanz (5mM, $n = 11$, $p = n.s.$).

4.2.2.2 4.1O hat keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin

Das Modell der dynamischen Regulation der Schlitzmembran zeigt, dass die Bindung von β -arrestin2 an Nephrin zur Endozytose von Nephrin führt (Quack, Rump et al. 2006). Da 4.1O diese Bindung beeinflusst, sollte nun der Einfluss von 4.1O auf die Endozytose von Nephrin unter hohen Glukosekonzentrationen untersucht werden. Hierfür wurden Biotin-Assays durchgeführt. HEK293T-Zellen exprimierten Nephrin WT und entweder einen leeren Kontrollvektor oder Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O). Die Zellen wurden zunächst geerntet und im Anschluss mit Biotinlösung inkubiert, sodass eine Biotinylierung von Nephrin an der Zelloberfläche stattfinden konnte. Eine fortlaufende Endozytose wurde durch das Arbeiten auf Eis unterbunden. Die Zelllyse erfolgte mittels IP-Puffer und Lysate der Proben wurden erstellt. In den IP-Proben wurde Nephrin mit Anti-Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose präzipitiert. Die Proben der IP wurden zweifach geladen und durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden im Anschluss durch einen Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Immunmarkierung wurden die Membranen der IP und der Lysate mit Anti-Nephrin-Antikörper inkubiert. Die zweiten IP-Proben wurden mit Steptavidin inkubiert, um die Biotinylierung von Nephrin an der Oberfläche vor der Zelllyse zu bestimmen. Zum Nachweis gleicher Zellmengen wurden die Lysate zusätzlich gegen Aktin gefärbt. Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 14 dargestellt. Der Versuch wurde neunmal durchgeführt (n=9) und die statistische Auswertung erfolgte mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Testes (p=n.s.).

Es zeigt sich, dass 4.1O die Biotinylierung von Nephrin an der Zelloberfläche nicht verändert und somit keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hat (p=n.s.) (siehe Abb. 14).

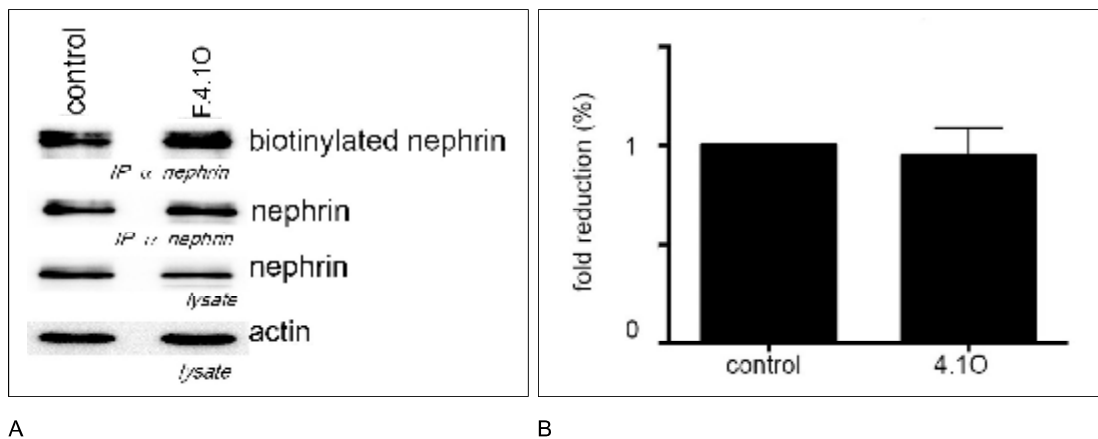


Abb. 14: 4.1O hat keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin im Biotin-Assay.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten Nephrin und F.4.1O oder einen Kontrollvektor. Die Zellen wurden nach Zellernte mit Biotinlösung inkubiert und somit Nephrin an der Zelloberfläche biotinyliert. Nach Zelllyse wurde Nephrin mit Anti-Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot wie folgt gefärbt. Von oben nach unten: IP gefärbt mit Streptavidin HRP zeigt eine unveränderte Biotinylierung von Nephrin unter F.4.1O und somit keinen Effekt von 4.1O auf die Endozytose von Nephrin. IP gefärbt mit Anti-Nephrin-Antikörper. Lysate gefärbt mit Anti-Nephrin-Antikörper zum Nachweis gleicher Expression von Nephrin. Lysate gefärbt mit Anti-Aktin-Antikörper zum Nachweis gleicher Zellmengen. (B) Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ($n=9$, $p=n.s.$).

4.3 Die Rolle des Proteins 4.1O für das podozytäre Zytoskelett

4.3.1 Interaktionsstudien

4.3.1.1 4.1O bindet an G-Aktin

Die Proteinfamilie 4.1 wird zu den zytoskeletalen Adapterproteinen gezählt und dient der Stabilisation des Spektrin/Aktin-Zytosketts (Hoover and Bryant 2000). Die Mitglieder der Proteinfamilie 4.1, so auch Protein 4.1O, sind hierfür durch einen homologen strukturellen Aufbau gekennzeichnet, der eine Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne (SABD) umfasst (Gimm, An et al. 2002). Für das Protein 4.1O sollte daher die Interaktion mit Aktin untersucht werden. Dazu wurde ein *Pulldown*-Assay durchgeführt. Zunächst wurde ein rekombinantes Fusionsprotein aus GST und der Aktin-Bindungsdomäne (4.1O AA 335-450, 345 bp) des Proteins 4.1O (GST.4.1OABD) in *E.coli* Bakterien generiert und mit Hilfe von Glutathione-Sepharose-Säulen aufgereinigt. Für das *Pulldown*-Assay wurden GST.4.1OABD bzw. GST-mono-rekombinates Protein als Kontrolle mit G-Aktin in IP-Puffer inkubiert. Vor Zugabe der GST-Sepharose wurde je ein Teil der Proben zum Nachweis des Inputs entnommen. Der *Pull-*

down erfolgte durch Präzipitation von GST.4.1OABD bzw. GST mittels GST-Sepharose. Die Proben des *Input* und des *Pulldowns* wurde anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. In der spezifischen Antikörperreaktion wurde die Membran gegen G-Aktin gefärbt. Zum Nachweis der Expression von GST und GST.4.1OABD wurde die Membran zusätzlich mit Anti-GST-Antikörper inkubiert.

Es zeigte sich eine Interaktion zwischen der Aktin-Bindungsdomäne von Protein 4.1O und G-Aktin im *Pulldown*-Assay (siehe Abb.15).

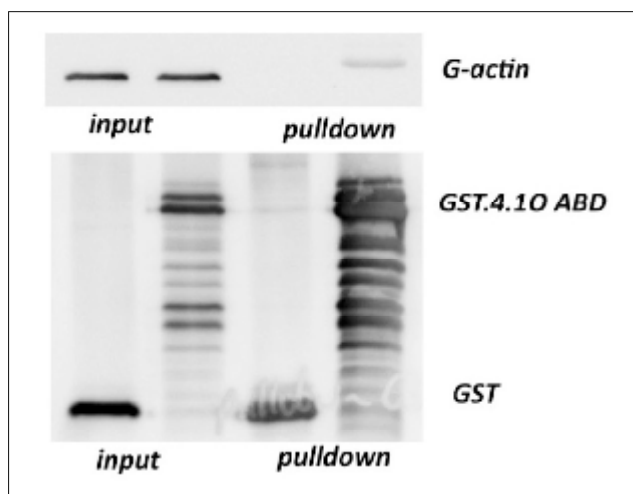


Abb. 15: Nachweis der Interaktion zwischen der Aktin-Bindungsdomäne von 4.1O und G-Aktin im *Pull-down*-Assay.

GST-mono-rekombinantes Protein bzw. GST.4.1OABD-Fusionsprotein (Aktinbindungsdomäne des Proteins 4.1O) wurden in IP-Puffer mit G-Aktin inkubiert (*Input*). Der *Pulldown* wurde mit Hilfe der GST-Sepharose durchgeführt, wobei GST und GST.4.1OABD präzipitiert wurden. Oben: Der Immunoblot wurde gegen G-Aktin gefärbt und zeigt eine Interaktion von G-Aktin mit der Aktin-Bindungsdomäne von 4.1O (GST.4.1OABD). Unten: Zum Nachweis der Expression von GST und GST.4.1OABD wurde die Membran zusätzlich gegen GST gefärbt.

4.3.1.2 4.1O interagiert nicht mit Paxillin

Der Proteinfamilie 4.1 wird die Funktion eines zytoskeletalen Adapterproteins zugesprochen (Hoover and Bryant 2000). Um die Rolle des Proteins 4.1O für das podozytäre Zytoskelett zu untersuchen, wurden Interaktionsstudien mit bekannten Proteinen des Zytoskelettes durchgeführt. Zunächst wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt, um eine Interaktion von 4.1O mit Paxillin, einem Protein der fokalen Adhäsionen, zu überprüfen. Flag-markiertes Paxillin (F.Paxillin), V5-markiertes 4.1O (V5.4.1O), sowie V5-markiertes FAK (V5.FAK) als

Positivkontrolle und V5-markiertes β -arrestin2 (V5. β arr2) als Negativkontrolle wurden von HEK293T-Zellen nach Transfektion exprimiert. Die Zellen wurden lysiert und Lysate der Proben hergestellt. V5.4.1O sowie V5. β -arrestin2 und V5.FAK wurden mit Anti-V5-Antikörper und Protein-G-Sepharose präzipitiert. Die Proben wurden auf SDS-Gele geladen und in der Gelelektrophorese aufgetrennt. Eine Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte durch Western Blotting. Die Inkubation der Membranen mit Anti-Flag-Antikörper färbte die Membranen gegen F.Paxillin. Der Versuch zur 4.1O/Paxillin Interaktion wurde viermal durchgeführt (n=4). Ein Expressionsnachweis der V5.-markierten Proteine befindet sich im Anhang 7 (Anhang Abb. 27).

Es zeigte sich, dass keine Interaktion zwischen 4.1O und Paxillin besteht (Abb. 16).

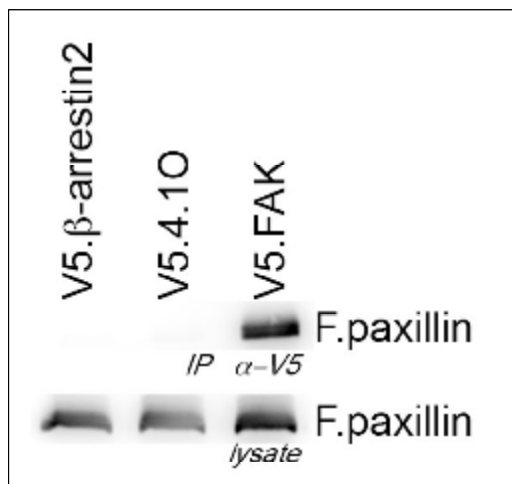


Abb. 16: Co-Immunopräzipitation zwischen Protein 4.1O und Paxillin zeigt keine Interaktion.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.Paxillin, V5.4.1O, V5.FAK als Positivkontrolle, sowie V5. β -arrestin2 als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden V5. β -arrestin2, V5.4.1O und V5.FAK mit V5-Antikörper inkubiert und mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. Der Immunoblot wurde gegen F.Paxillin gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen keine Interaktion von V5.4.1O mit F.Paxillin. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von F.Paxillin.

4.3.1.3 4.1O interagiert mit IQGAP1

Für IQGAP1 ist bereits eine Interaktion mit 4.1R, einem anderen Mitglied der 4.1 Familie, in humanen epithelialen ECV304 Zellen bekannt. In diesen Zellen rekrutiert 4.1R IQGAP1 an den Leitsaum der Zellen und ermöglicht hierdurch eine Migration (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Im nächsten Schritt sollte daher mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen die Interaktion mit IQGAP1 auch für 4.1O in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus

wurde auch hier ein Truncationmapping durchgeführt, um die Bindungsstelle von IQGAP1 an 4.1O zu untersuchen. Die HEK293T-Zellen exprimierten myc-markiertes IQGAP1 (myc.IQGAP1), Flag-markiertes 4.1O (F.4.1O AA 1-554), Flag-markierte 4.1O-Truncations und Flag-markiertes GFP (F.GFP) als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit M2-Beads präzipitiert, sowie Lysate der Proben erstellt. Mittels SDS-Gelelektrophorese wurden IP- und Lysatproben aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Zur Immunmarkierung wurde die Membran mit Anti-myc-Antikörper inkubiert und auf diese Weise myc.IQGAP1 angefärbt. Der Versuch wurde fünffach durchgeführt (n=5). Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 17 dargestellt. Die Expression von F.GFP, F.4.1O und den F.4.1O-Truncations wurde nachgewiesen (siehe Anhang 8, Abb. 28).

Die Interaktion zwischen F.4.1O und IQGAP1 konnte nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine Interaktion mit den F.4.1O-Truncations F.4.1O AA 1-181 und F.4.1O AA 185-272. Eine Bindungsstelle für IQGAP1 findet sich im Bereich der ersten 272 Aminosäuren von 4.1O (siehe Abb. 17). Dies entspricht der B41 und FERM Domäne des Proteins.

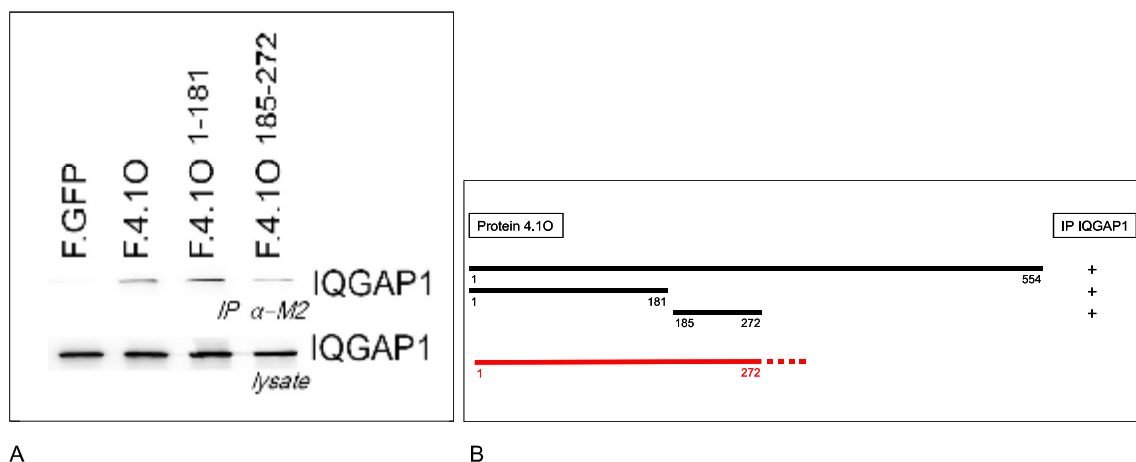


Abb. 17: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und IQGAP1.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten IQGAP1, F.4.1O und verschiedene F.4.1O-Truncations, sowie F.GFP als Negativkontrolle. Nach Zelllyse wurden F.4.1O und die F.4.1O-Truncations mit M2-Beads präzipitiert und im Immunoblot gegen IQGAP1 gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion von IQGAP1 mit F.4.1O sowie mit den F.4.1O-Truncations AA 1-181 und AA 185-272. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von IQGAP1. (B) Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse zur Co-IP zwischen Protein 4.1O und IQGAP1. In der rechten Spalte wird eine Bindung in der Co-IP mit 4.1O als + und keine Bindung als – dargestellt. Die Bindungsstelle (rot dargestellt) liegt im Bereich der ersten 272 Aminosäuren von 4.1O.

4.3.2 Funktionsstudien

4.3.2.1 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2

Die Bindung zwischen Nephrin und Nck2 stellte eine weitere wichtige Interaktion im Bezug auf die Funktion der glomerulären Schlitzmembran dar. Nck dient, wie die Proteinfamilie 4.1, als zytoskelettale Adapterprotein und verankert Nephrin mit dem Aktin-Zytoskelett (Jones, Blasutig et al. 2006). Der Einfluss von 4.1O auf die Nephrin/Nck2 Interaktion sollte daher untersucht werden. Hierfür wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt, bei denen HEK293T-Zellen mit V5.-markiertem Nck2 (V5.Nck2) und Ig.-markiertem Nephrin cyt (Ig.Nephrin cyt) oder einem leeren Ig.-Vektor cotransfiziert wurden. Um den Einfluss von 4.1O zu testen, wurden die Proben 2 + 4 zusätzlich mit Flag-markiertem 4.1O (F.4.1O) und die Proben 1 + 3 mit einem leeren Kontrollvektor transfiziert. Die HEK293T-Zellen wurden während des gesamten Versuches mit 25 mM Glukose inkubiert. Nach Zelllyse wurden Lysate der Proben erstellt und es folgte die Präzipitation von Ig.Nephrin mit Protein-G-Sepharose. Durch SDS-Gelelektrophorese wurden sowohl die Proben der IP als auch der Lysate aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Membranen wurden anschließend mit Anti-V5-Antikörper inkubiert und dadurch gegen V5.Nck2 gefärbt. Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 18 dargestellt. Der Versuch wurde dreimalig durchgeführt (n=3) und die statistische Auswertung erfolgte mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Testes ($p=0,05$). Im Anhang 9 (Abb. 29) sind die Expressionsnachweise der Ig.-markierten Proteine und der Flag-markierten Proteine dargestellt.

Es konnte die bekannte Interaktion von Nephrin und Nck2 gezeigt werden. Die Interaktion von Ig.Nephrin und V5.Nck2 nimmt unter dem Einfluss von F.4.1O ab ($p=0,05$) (siehe Abb. 18).

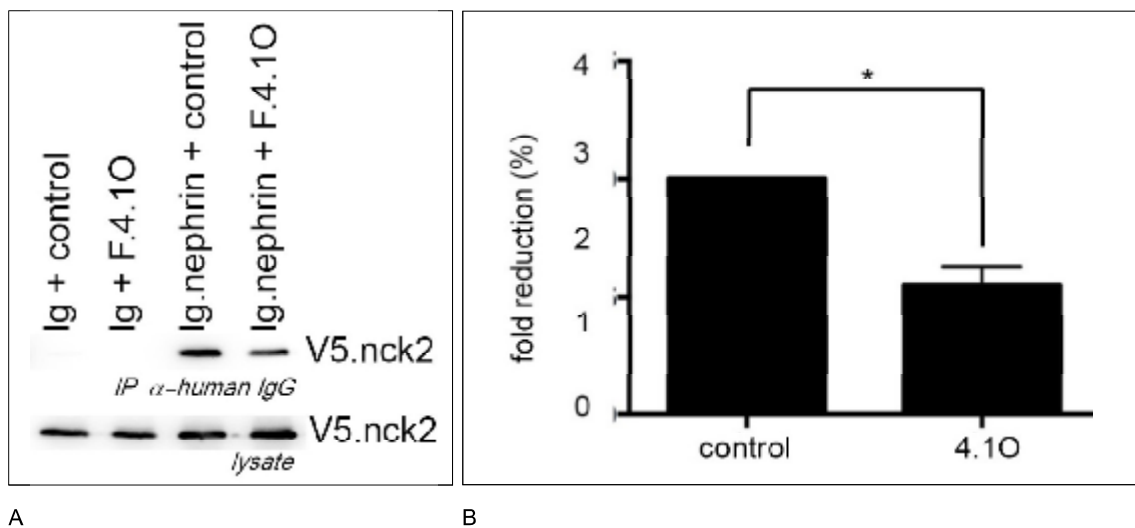


Abb. 18: 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten V5.Nck2, Ig.Nephlin cyt oder einen Ig.Leervektor als Negativkontrolle und entweder F.4.1O oder einen leeren Kontrollvektor. Nach Zelllyse wurde Ig.Nephlin mit Protein-G-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gegen Nck2 gefärbt. Oben: Die Signale in der Co-IP zeigen eine Interaktion zwischen Ig.Nephlin und V5.Nck2, die unter dem Einfluss von F.4.1O schwächer wird. Unten: Die Lysate zeigen eine gleiche Expression von V5.Nck2. (B) Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test ergab eine signifikante Hemmung der Nephlin/Nck2 Interaktion durch 4.1O ($n=3$, $p=0,05$).

4.3.2.2 4.1O hemmt die Phosphorylierung von Nephrin Y1217 und Y1176/1193

Da gezeigt werden konnte, dass 4.1O die Interaktion zwischen Nck2 und Nephlin inhibiert, sollte nun der Einfluss von 4.1O auf die Phosphorylierung von Nephlin an den Nck2-Bindungsstellen (pY1217 und pY1176/1193) (Jones, Blasutig et al. 2006) untersucht werden. Hierfür wurden Immunopräzipitationen durchgeführt, bei denen HEK293T-Zellen mit Nephlin transfiziert wurden. Um den Einfluss von 4.1O zu testen, wurde die Probe 1 zusätzlich mit einem leeren Kontrollvektor und die Probe 2 mit Flag-markiertem 4.1O (F.4.1O) transfiziert. Die HEK293T-Zellen wurden zunächst in Medium mit 25 mM Glukose und 10% FCS subkultiviert. 12-14 Stunden vor der Zellernte wurde das Medium auf 25 mM Glukose ohne FCS gewechselt. Nach Lyse der Zellen und Gewinnung der Lysate wurden die Proben zur Präzipitation mit Anti-Nephlin-Antikörper und Protein-A-Sepharose inkubiert. Die Proben der IP und der Lysate wurden anschließend durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei die IP dreifach geladen wurde. Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte mittels Western Blot. In der spezifischen Antikörperreaktion wurde die Membran mit den Lysaten und einer IP mit Anti-Nephlin-Antikörper gefärbt. Die beiden anderen IPs wurden zum Nachweis der Phosphorylierung mit Anti-phospho-Nephlin Y1217 oder Y1176/1193

Antikörper inkubiert. Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe ist in Abb. 19 dargestellt. Der Versuch wurde für Y1217 viermal ($n=4$) und für Y1176/1193 dreimal ($n=3$) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des nicht parametrischen Mann-Whitney-U-Tests (Y1217: $p=0,0143$, Y1176/1193: $p=0,05$).

Es konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von 4.1O die Phosphorylierung an Neph- rin Y1217 und Y1176/1193 signifikant abnimmt. (Y1217: $p=0,0143$, Y1176/1193: $p=0,05$) (siehe Abb. 19).

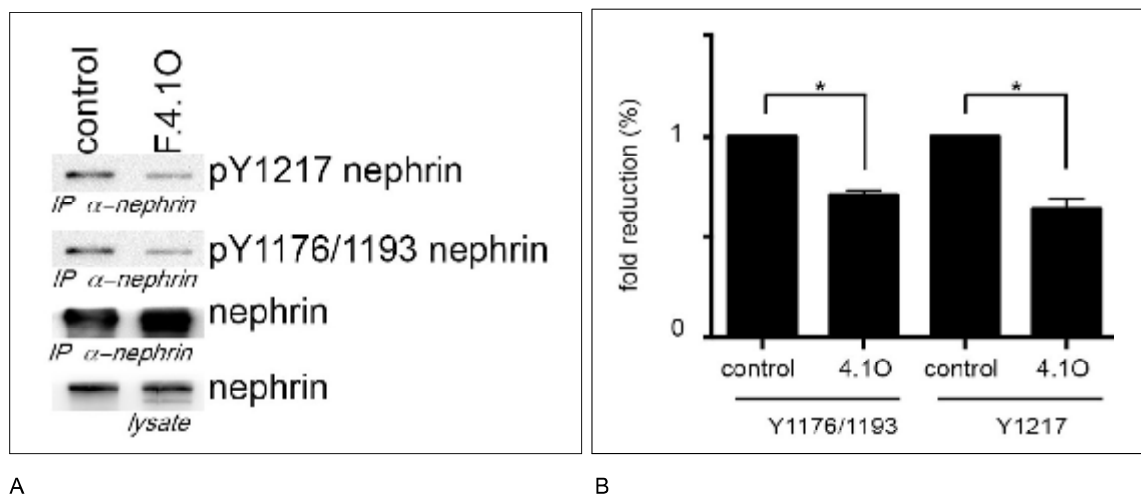


Abb. 19: 4.1O hemmt die Phosphorylierung an Neph- rin pY1217 und pY1176/1193.

(A) Die HEK293T-Zellen exprimierten Neph- rin und F.41O oder einen leeren Kontrollvektor. Nach Zellyse wurde Neph- rin mit Anti-Neph- rin-Antikörper und Protein-A-Sepharose präzipitiert und im Immunoblot gefärbt. Von oben nach unten: IP gefärbt mit Anti-phospho-Neph- rinY1217-Antikörper zeigt eine Abnahme der Phosphorylierung von Neph- rin pY1217 unter 4.1O. IP gefärbt mit Anti-phospho-Neph- rinY1176/1193-Antikörper zeigt eine Abnahme der Phosphorylierung von Neph- rin pY1176/1193 unter 4.1O. IP gefärbt mit Anti-Neph- rin-Antikörper. Lysate gefärbt mit Anti-Neph- rin-Antikörper zum Nachweis gleicher Expression von Neph- rin. (B) Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test. Signifikante Hemmung der Phosphorylierung von Neph- rin Y1217 ($n=4$, $p=0,0143$) und Neph- rin Y1175/1193 ($n=3$, $p=0,05$) unter 4.1O.

5 Diskussion und Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit erbrachte wichtige Erkenntnisse über die besondere Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten. Dabei gelang es erstmalig die Expression des Proteins 4.1O in der humanen Niere und humanen Podozyten nachzuweisen. Weiterhin konnten Interaktionen mit bekannten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran wie Nephrin, NEPH1 und GLEPP1 sowie Interaktionen mit bekannten Proteinen des podozytären Zytoskelettes wie Aktin und IQGAP1 nachgewiesen werden. In Funktionsstudien zeigte sich, dass das Protein 4.1O unter hyperosmolaren Bedingungen die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 hemmte und keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte. Des Weiteren schwächte das Protein 4.1O unter hyperosmolaren Bedingungen die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 und verminderte die Phosphorylierung der Tyrosine Y1217, Y1176 und Y1193 von Nephrin.

5.1 *FRMD3*, ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie

Bereits vor dem Beginn der vorliegenden Arbeit gab es zwei wichtige Hinweise darauf, dass das Protein 4.1O eine Bedeutung für die Funktion des Podozyten haben könnte.

Pezzolesi et al. identifizierten 2009 in einer genomweiten Assoziationsstudie bei Typ I Diabetikern das *FRMD3* Gen, welches für das Protein 4.1O kodiert, als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie. Beim untersuchten Kollektiv handelte es sich in dieser Studie vornehmlich um „Kaukasier“. Auch für die Afroamerikanische Bevölkerung konnte *FRMD3* als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie bestätigt werden (Freedman, Langefeld et al. 2011, McDonough, Palmer et al. 2011), während für die japanische Bevölkerung keine Assoziation mit *FRMD3* gezeigt werden konnte (Maeda, Araki et al. 2010). Die diabetische Nephropathie ist heutzutage der führende Grund für ein terminales Nierenversagen (Foley and Collins 2007). Als Frühsymptom zeigt sich eine Mikroalbuminurie (Parving, Oxenboll et al. 1982, Viberti, Hill et al. 1982, Mogensen 1984, Perkins, Ficociello et al. 2007) und mit zunehmender Proteinurie und abnehmender Nierenfunktion steigt gleichzeitig das kardiovaskuläre Risiko und die Gesamtmortalität deutlich an (Kalaitzidis and Bakris 2009, Klausen, Parving et al. 2009). Trotzdem entwickeln nur etwas 30-40% der Diabetiker überhaupt eine diabetische Nephropathie (Andersen, Christiansen et al. 1983, Krolewski, Warram et al. 1987, Hasslacher, Ritz et al. 1989, Krolewski, Eggers et al. 1996, Ritz and Orth 1999). Dies ist zum einen auf modifizierbare Risikofaktoren wie schlecht eingestellter Blutzucker oder Nikotinabusus zurückzuführen (Scott, Warram et al. 2001, Tapp, Shaw et al. 2004), zum anderen wurden mittlerweile 16 Gene identifiziert, deren Mutation mit der diabetischen Nephro-

pathie assoziiert werden (Mooyaart, Valk et al. 2011). Zu beachten ist dabei, dass eine genomweite Assoziationsstudie im Allgemeinen zunächst lediglich einen korrelativen Zusammenhang zwischen einem veränderten Gen und dem untersuchten Phänotyp aufzeigt. Aussagen über den kausalen Zusammenhang zwischen verändertem Gen und Phänotyp müssen durch andere Untersuchungen belegt werden (Begum, Ghosh et al. 2012).

Das Protein 4.1O könnte eine Rolle in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie spielen und besitzt dadurch möglicherweise eine enorme klinische Relevanz.

Außerdem konnten Kramer-Zucker et al. 2005 zeigen, dass die Deletion des 4.1 Orthologs im Zebrafisch zu einer abnormen Podozytenfunktion führt. Dies äußerte sich klinisch durch ein generalisiertes Ödem im Sinne einer großen Proteinurie und insuffizienten Funktion des Pronephros. Strukturell zeigte sich die fehlende Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran zwischen den podozytären Fußfortsätzen und eine beginnende Glomerulosklerose (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005).

Durch konventionelle PCR mit 4.1O Primern konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig die Expression des Proteins 4.1O in der humanen Niere, den humanen Podozyten und HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Ni et al. konnten 2003 das Protein 4.1O identifizieren, jedoch lediglich einen Expressionsnachweis im Gewebe des Ovars, fetalen Thymus, fetalen Skelettmuskels und fetalen Gehirns erbringen. Zum Nachweis verwendeten sie humane Multi-Gewebs-cDNA *Panels* als PCR *Template*. Auf diese Weise wurde zwar auch eine Expression in der Niere getestet, sie konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Ni, Ji et al. 2003). Betrachtet man das Expressionsmuster der weiteren Mitglieder der Proteinfamilie 4.1, so stellt man fest, dass diese Proteine ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden konnten (Conboy, Kan et al. 1986, Parra, Gascard et al. 1998, Walensky, Blackshaw et al. 1999, Parra, Gascard et al. 2000) und zumindest die Proteine 4.1R, 4.1N und 4.1B speziell im Bereich der Bowman Kapsel und des Tubulussystems der Niere exprimiert werden (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Entsprechend ist auch eine Expression von 4.1O über den von Ni et al. gestellten Nachweis hinaus wahrscheinlich und konnte im Bezug auf die Niere in dieser Arbeit belegt werden. Die gegensätzlichen Ergebnisse sind vermutlich auf das unterschiedliche methodische Vorgehen, wie beispielsweise der Verwendung unterschiedlicher Primer oder die Analyse von RNA aus humanem Nierengewebe, humanen Podozyten und HEK293T-Zellen anstatt der Verwendung von humanen Multi-Gewebs-cDNA *Panels* zurückzuführen.

Die Analyse der Aminosäuresequenz ergab das Vorhandensein zweier Splicevarianten des Proteins 4.1O, wobei das Protein 4.1O *long* N-terminal um 44 Aminosäuren länger ist als das Protein 4.1O *short*. Die Bildung verschiedener Splicevarianten aus einem Gen konnte ebenfalls für das Protein 4.1R gezeigt werden (Conboy, Chan et al. 1988, Gee, Aoyagi et al. 2000). Dabei zeigte sich, dass der Splicevorgang des Proteins 4.1R spezifisch für die einzel-

nen Gewebearte und Entwicklungsstufen erfolgt (Schischmanoff, Yaswen et al. 1997). Auch Ramez et al. identifizierten 2003 drei Splicevarianten des Proteins 4.1B in der Niere (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Die bisher bekannten Mitglieder der Proteinfamilie 4.1 definieren sich über einen ähnlichen strukturellen Aufbau. Dabei finden sich bei allen Mitgliedern mindestens die drei folgenden hochkonservierten Domänen: FERM-, SAB-, und CT-Domäne (Leto and Marchesi 1984, Conboy, Chan et al. 1988, Hoover and Bryant 2000). Die durchgeführte Analyse der Domänen des Proteins 4.1O zeigte, dass auch 4.1O diesem strukturellen Aufbau entspricht. N-terminal fand sich eine 32 kDa schwere FERM (4.1-Ezrin-Radixin-Moesin)-Domäne, sowie eine 5,3 kDa schwere FA (FERM-assoziierte)-Domäne. Anschließend folgte die 13 kDa schwere AB (Aktin-Bindungs)-Domäne und die 12 kDa schwere CT (C-terminale)-Domäne.

5.2 Die Rolle des Proteins 4.1O für die glomeruläre Schlitzmembran

5.2.1 Protein 4.1O interagiert mit Nephrin

Die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit zeigten deutlich, dass das Protein 4.1O sowohl für die glomeruläre Schlitzmembran, also auch für das podozytäre Zytoskelett von Bedeutung ist. Die glomeruläre Schlitzmembran ist ein hochspezialisierter, interzellulärer Zellkontakt, der aus einem dynamischen Multiproteinkomplex zwischen den gegenüberliegenden Fußfortsätzen gebildet wird (Benzing 2004, Huber and Benzing 2005, Tryggvason, Patrakka et al. 2006). Die Grundstruktur der glomerulären Schlitzmembran wird dabei von dem 185 kDa schweren Typ I Transmembranprotein Nephrin aus der Immunglobulin-Superfamilie gebildet (Kestila, Lenkkeri et al. 1998, Holzman, St John et al. 1999, Tryggvason, Patrakka et al. 2006). Die extrazelluläre Domäne von Nephrin interagiert homophil mit den gegenüberliegenden Nephrinmolekülen (Gerke, Huber et al. 2003, Khoshnoodi, Sigmundsson et al. 2003) und bildet auf diese Weise Poren für die größenselektive Filtration (Edwards, Daniels et al. 1999). Die besondere Bedeutung von Nephrin für die glomeruläre Schlitzmembran wird unter anderem dadurch klar, dass autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im Nephrin Gen *NPHS1* zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom Finnischen Typ führen (Kestila, Lenkkeri et al. 1998).

Um eine grobe Einordnung des Proteins 4.1O vornehmen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Interaktionsstudien mit bekannten Proteinen der glomerulären Schlitzmembran durchgeführt. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion des Proteins 4.1O mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin in der Co-Immunopräzipitation transfizierter

HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Domäne von Nephrin spielt eine zentrale Rolle für die Signalfunktion von Nephrin, welche durch Phosphorylierungsprozesse verschiedener zytoplasmatischer Motive reguliert wird (Lahdenpera, Kilpelainen et al. 2003, Verma, Wharram et al. 2003, Benzing 2004, Huber and Benzing 2005, Quack, Rump et al. 2006). Darüber hinaus konnte die Bindungsstelle für die Interaktion zwischen 4.1O und Nephrin auf die Aminosäuren 1158-1190 von Nephrin eingegrenzt werden. In dieser Aminosäuresequenz liegen zahlreiche posttranslational modifizierbare Motive. Andersherum lag die Bindungsstelle für die 4.1O/Nephrin Interaktion im Bereich der Aminosäuren 506-554 von 4.1O. Diese Sequenz entspricht einem Anteil der C-terminalen Domäne. In der Literatur hingegen findet sich bei den weiteren Mitgliedern der 4.1 Familie zumeist die FERM-Domäne als Interaktionsstelle für Membranproteine (Hemming, Anstee et al. 1995), während die CTD vor allem mit zytoplasmatischen Proteinen interagiert (Mattagajasingh, Huang et al. 1999, Hou, Tang et al. 2000).

5.2.2 *Protein 4.1O interagiert mit NEPH1*

Auch für das Protein NEPH1 konnte in dieser Arbeit eine Interaktion mit 4.1O in der Co-Immunopräzipitation transfizierter HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. NEPH1 ist ein weiteres Protein der glomerulären Schlitzmembran. Es zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu Nephrin und bildet über seinen extrazellulären Domänen Heterodimer mit Nephrin oder NEPH2 (Gerke, Huber et al. 2003, Sellin, Huber et al. 2003). Auch der Verlust von NEPH1 in *NEPH*^{-/-} knock out Mäusen führt zu massiver Proteinurie und perinataler Letalität (Donoviel, Freed et al. 2001).

5.2.3 *Protein 4.1O interagiert mit GLEPP1*

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine Interaktion des Protein 4.1O mit dem zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1 nachgewiesen werden. Zwar ist die Rezeptor Membran Protein Tyrosin Phosphatase (RPTP) GLEPP1 im apikalen Bereich des Podozyten lokalisiert (Thomas, Wharram et al. 1994, Wiggins, Wiggins et al. 1995), dennoch scheint sie eine Bedeutung für die glomeruläre Schlitzmembran zu haben, denn Untersuchungen konnten zeigen, dass beispielsweise der Verlust von GLEPP1 zu vermehrter Permeabilität der Schlitzmembran für Albumin in isolierten Glomeruli von Ratten und Kaninchen führt (Charba, Wiggins et al. 2009). Außerdem ist die Expression von GLEPP1 bei Erkrankungen mit ne-

phrotischem Syndrom wie primäre fokale Glomerulosklerose, Minimal Change Glomerulonephritis und IgA Nephritis nachgewiesenermaßen reduziert (Sharif, Goyal et al. 1998, Clement, Liu et al. 2007, Tian, Wang et al. 2007). Ozaltin et al. konnten darüber hinaus das Gen, welches für GLEPP1 kodiert, als ein Kandidatengen für das idiopathische Nephrotische Syndrom identifizieren (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Bisher unveröffentlichte elektronenmikroskopische Untersuchungen an Rattennieren lokalisierten zudem GLEPP1 in geringer Menge auch an der glomerulären Schlitzmembran (persönliche Kommunikation Prof. L.Sellin, Bilder von D. Kerjaschki/ R. Wiggins). Zudem hat GLEPP1 eine Bedeutung für das podozytäre Zytoskelett. Der Zusammenhang von GLEPP1, 4.1O und dem podozytären Zytoskelett wird im Verlauf diskutiert. In den vorliegenden Ergebnissen konnte die Bindungsstelle der Interaktion zwischen dem Protein 4.1O und GLEPP1 identifiziert werden. Sie lag im Bereich der Aminosäuren 936-1197 von GLEPP1. Dies entspricht der Phosphatasedomäne von GLEPP1, so dass sich vermuten lässt, dass 4.1O ein Substrat von GLEPP1 sein könnte und GLEPP1 auf diese Weise die Funktion von 4.1O steuert. Andersherum fand sich die Bindungsstelle von GLEPP1 im Bereich der Aminosäuren 1-181 von 4.1O. Diese entspricht der B41-Domäne, einem Teil der N-terminalen FERM-Domäne. Auch in der Literatur ist die FERM-Domäne der Mitglieder der Proteinfamilie als Bindungsstelle für Interaktionen mit transmembranären Proteinen beschrieben (Diakowski, Grzybek et al. 2006, Baines, Lu et al. 2014). Durch die Interaktion mit GLEPP1, welches im Bereich der apikalen Membrandomäne lokalisiert ist (Thomas, Wharram et al. 1994), wird auch eine Lokalisation von 4.1O in diesem Bereich möglich. Da die bisher unveröffentlichten Ergebnisse zur elektronenmikroskopischen Untersuchung an Rattennieren eine Lokalisation von GLEPP1 in geringen Mengen auch an der Schlitzmembran zeigen konnten und Interaktion mit Nephrin und NEPH1 in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurden, ist eine Lokalisation von 4.1O im lateralen Membranbereich des Podozyten anzunehmen. Fundierte Untersuchungen zur genauen Lokalisation von 4.1O müssen an dieser Stelle folgen.

5.2.4 Protein 4.1O nimmt Einfluss auf die dynamische Regulation der glomerulären Schlitzmembran

Im Anschluss an den Nachweis der Interaktionen von 4.1O mit Nephrin und NEPH1, den beiden wichtigen Proteinen der glomerulären Schlitzmembran, die bereits eindeutig auf eine Bedeutung des Proteins 4.1O im Bezug auf diese Struktur schließen lassen, sollte im Weiteren die Funktion des Proteins 4.1O für die glomeruläre Schlitzmembran untersucht werden. Entscheidend ist, dass die glomeruläre Schlitzmembran heutzutage nicht mehr bloß als ein

statisches molekulares Sieb angesehen wird, sondern vielmehr als ein dynamischer und funktioneller Proteinkomplex. Rekrutierung von verschiedenen Signalproteinen an diesen Proteinkomplex führen zu Signalübertragungen, welche die Biologie des Podozyten und die glomeruläre Funktion steuern. Eine zentrale Rolle spielt dabei die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin, dessen Phosphorylierungsstatus die Bindung weiterer intrazellulärer Adapterproteine und Signalmoleküle ermöglicht und daher wiederum streng reguliert ist (Lahdenpera, Kilpelainen et al. 2003, Verma, Wharram et al. 2003, Benzing 2004, Huber and Benzing 2005, Quack, Rump et al. 2006).

Folgendes Modell zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran war von besonderer Bedeutung für die vorliegende Arbeit: Quack et al. zeigten 2006, dass eine extrazelluläre Bindung von Nephrin an benachbartes Nephrin oder NEPH1 im Sinne einer intakten Schlitzmembran zur Phosphorylierung von Nephrin Y1193 durch Src-Kinasen wie z.B. Yes führt. Diese Phosphorylierung von Nephrin Y1193 ermöglicht die Interaktion mit Podocin, welche zu einer Verankerung von Nephrin in der Zellmembran und zu einer verstärkten Signalfunktion von Nephrin führt. Verliert Nephrin hingegen die extrazellulären Bindungen, kommt es zu einer Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 und damit zur Beendigung der Nephrin/Podocin Interaktion. Stattdessen führt die Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 zu einer Interaktion von Nephrin mit β -arrestin2. Folge dieser Bindung ist eine Endozytose von Nephrin mit Beeinträchtigung der Integrität der Schlitzmembran und eine Beendigung der Signalfunktion von Nephrin (Quack, Rump et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der Einfluss des Protein 4.1O auf die Interaktion von Nephrin und β -Arrestin in der Co-Immunopräzipitation transfizierter HEK293T-Zellen untersucht. Entscheidend war, dass diese Untersuchungen sowohl unter hohen Glukosespiegeln (25 mM), niedrigen Glucosespiegeln (5,5 mM) und unter Mannitol (5,5 mM Glukose und 19,5 mM Mannitol) durchgeführt wurden. Die Glukosekonzentrationen wurden so gewählt um den Effekt einer Hyperglykämie (25 mM entspricht 450 mg/dl), Normoglykämie (5,5 mM entspricht 100 mg/dl) und Hyperosmolarität bei Normoglykämie (5,5 mM Glukose und 19,5 mM Mannitol) in der Zellkultur nachzuahmen. Es zeigte sich, dass das Protein 4.1O die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter Hyperglykämie und Hyperosmolarität bei Normoglykämie signifikant hemmte. Bei Normoglykämie konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in Biotin-Assays aus HEK293T-Zellen nachgewiesen, dass das Protein 4.1O unter Hyperglykämie keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte. Ein weiteres wichtiges Ergebnis war zudem, dass unter Einfluss des Proteins 4.1O bei Hyperglykämie die Phosphorylierung der Tyrosine Y1217 und Y1176/1193 des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin abnahm.

Bringt man diese Ergebnisse in Zusammenhang mit dem Modell zur dynamischen Regulation der Schlitzmembran, dann kann man folgende Einordnung vornehmen: zunächst konnte

durch die vorliegenden Ergebnisse die bekannte Interaktion von β -arrestin und Nephrin bestätigt werden (Quack, Rump et al. 2006). Da das Protein 4.1O die Phosphorylierung an Nephrin Y1193 wie gezeigt abschwächte, müsste nach dem Modell zur dynamischen Regulation der Schlitzmembran von Quack et al. dadurch die Bindung von β -arrestin2 an Nephrin erleichtert werden (Quack, Rump et al. 2006). In den vorliegenden Ergebnissen konnte aber der gegenteilige Effekt nachgewiesen werden. Das Protein 4.1O hemmte die Interaktion von β -arrestin2 und Nephrin. Quack et al. stellten 2006 fest, dass die Bindungsstelle von β -arrestin2 an Nephrin zwar im Bereich der Aminosäuren 1120-1125 liegt, dafür aber die Aminosäuren 1177-1208 eine regulatorische Funktion für die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 haben. Die Bindungsstelle von 4.1O an Nephrin lag im Bereich der Aminosäuren 1158-1190 und damit im Bereich dieser regulatorischen Aminosäuren (Quack, Rump et al. 2006). 4.1O führte durch seine Bindung an Nephrin zur Regulation der Bindung von β -arrestin2. Unterstützt wird dieses Ergebnis zudem davon, dass die Endozytose von Nephrin unter 4.1O nicht beeinflusst wurde. Unter dem Einfluss von 4.1O wurde somit zwar die Phosphorylierung von Nephrin Y1193 abgeschwächt, gleichzeitig aber auch die Bindung von β -arrestin2 verhindert. Man kann also festhalten, dass das Protein 4.1O eine antagonistische Funktion zu β -arrestin2 und eine synergistische Funktion zu Podocin zu haben scheint, da es unter 4.1O nicht zu einer Endozytose von Nephrin kam. Podocin ist ein integrales Membranprotein (Boute, Gribouval et al. 2000), dass Nephrin in den Bereich der Lipid rafts rekrutiert (Huber, Simons et al. 2003) und zu einer Verankerung von Nephrin in der Zellmembran führt (Quack, Rump et al. 2006). Betrachtet man die Bindungsstellen für die Interaktionen von Podocin (Aminosäuren 1183-1208) und 4.1O (Aminosäuren 1158-1190) an Nephrin, dann stellt man eine Überlappung fest. Man könnte daher vermuten, dass Podocin und 4.1O nicht gleichzeitig an Nephrin binden können. Nach dem Modell der dynamischen Regulation der Schlitzmembran führt eine Schädigung dieser zu einer Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 und die Bindung von Podocin an Nephrin wird verhindert (Quack, Rump et al. 2006). Diese Dephosphorylierung fand unter Einfluss von 4.1O vermehrt statt und durch die dadurch bedingte Reduktion der Bindung von Podocin an Nephrin stand die Bindungsstelle an Nephrin für eine Interaktion mit 4.1O zur Verfügung. Man kann also spekulieren, dass 4.1O in diesem Fall die Verankerung von Nephrin in der Zellmembran für Podocin übernahm. Um diesen Zusammenhang jedoch zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen unter anderem zum Einfluss des Proteins 4.1O auf die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin durchgeführt werden. Ein weiterer Aspekt ist der Einfluss der verschiedenen Glukosespiegel auf diese Interaktion unter 4.1O. Der signifikante Effekt von 4.1O auf die Interaktion von β -arrestin2 und Nephrin trat nur unter Einfluss einer Hyperglykämie oder einer Hyperosmolarität bei Normoglykämie auf. Somit war der Einfluss eher durch den Effekt der Hyperosmolarität bedingt, als durch einen direkten Effekt der Glukose selbst. Man könnte demnach an-

nehmen, dass die Schädigung der Schlitzmembran durch eine Hyperosmolarität bedingt sein kann, wie es beispielsweise beim Diabetes mellitus der Fall ist. Die darauffolgende Dephosphorylierung von Nephrin Y1193 würde somit zur verstärkten Bindung von β -Arrestin an Nephrin sowie zur verminderten Bindung von Podocin an Nephrin und zum Verlust der Verankerung von Nephrin in der Zellmembran durch Podocin führen. Die Endozytose von Nephrin würde wiederum zu einer verminderten Integrität der Schlitzmembran führen. Die verminderte Expression von Nephrin an der Oberfläche spiegelt sich in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie in Form des Frühsymptoms der Mikroalbuminurie wieder (Langham, Kelly et al. 2002, Benigni, Gagliardini et al. 2004, Perkins, Ficociello et al. 2007). Wäre 4.1O jedoch vorhanden, dann würde die Beeinträchtigung der Schlitzmembran über Dephosphorylierung des Y1193 zwar auch zu einer verminderten Interaktion von Podocin und Nephrin führen, jedoch würde sich dadurch für 4.1O die Möglichkeit ergeben, an Nephrin zu binden, Nephrin in der Zellmembran zu verankern und somit die Endozytose von Nephrin zu verhindern. Als Mitglied der Proteinfamilie 4.1 ist auch für 4.1O anzunehmen, dass es sich um ein Adapterprotein handelt, welches die Proteine der Zellmembran mit dem Zytoskelett verbindet (Baines, Lu et al. 2014) und daher auch eine Verankerung von Nephrin bewirken kann. Das Protein 4.1O würde sozusagen als *backup* die Verankerung übernehmen, wenn schädigungsbedingt Podocin diese Aufgabe nicht mehr erfüllen kann. Gleichzeitig würde durch die Bindung von 4.1O an Nephrin die Interaktion von β -arrestin2 und Nephrin gehemmt.

Die vorliegende Arbeit postuliert somit eine protektive Funktion des Protein 4.1O für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran unter hyperosmolaren Bedingungen, die zum einen durch eine Hemmung der schädigenden Interaktion von β -arrestin und Nephrin, zum anderen hypothetisch durch den Ersatz der Funktion von Podocin erklärbar wäre (siehe Abb. 20).

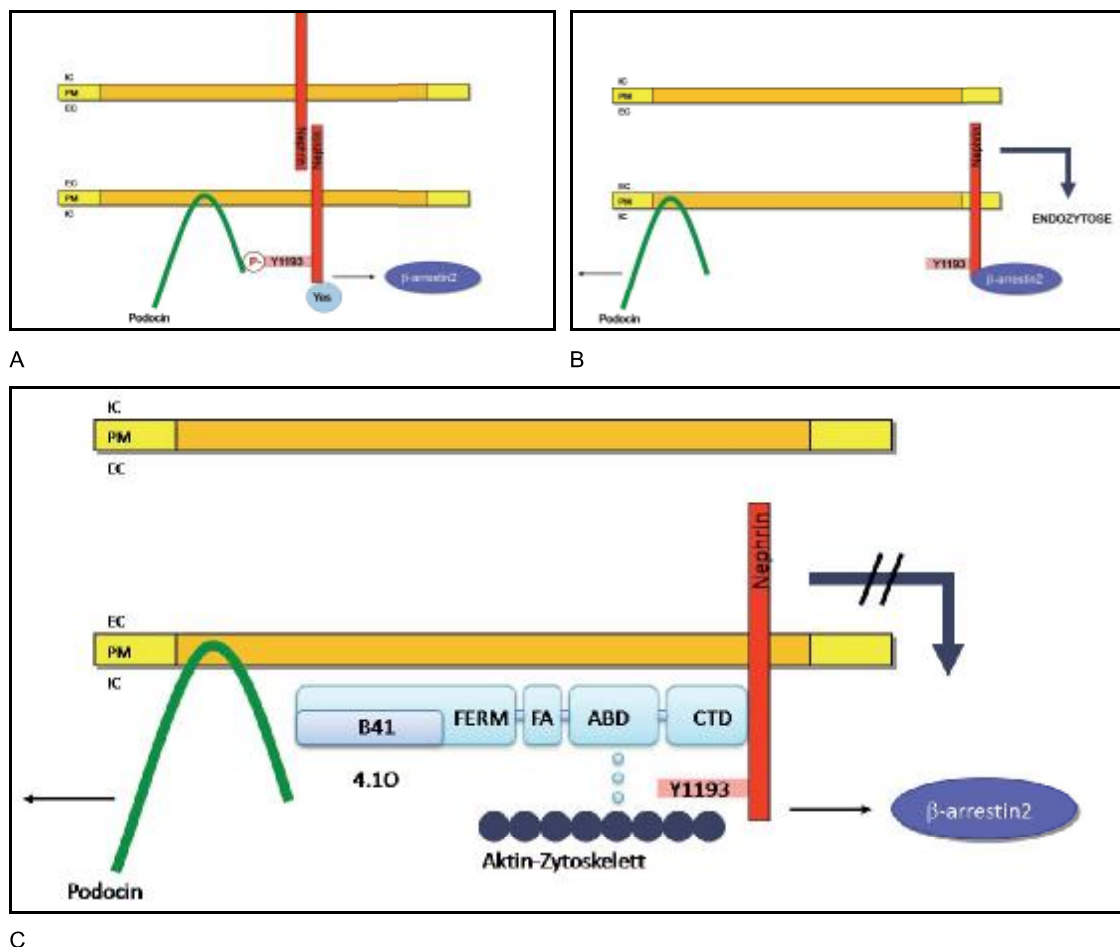
Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der genomweiten Assoziationsstudie zur diabetischen Nephropathie bei Typ 1 Diabetikern von Pezzolesi et al. aus dem Jahre 2009. Sie identifizierten das *FRMD3* Gen, welches für 4.1O codiert, als ein Kandidatengen für die diabetische Nephrophathie. Die Tatsache, dass nur etwa 30-40% der Patienten mit Diabetes mellitus eine diabetische Nephropathie entwickeln, wäre somit unter anderem auf Veränderungen im *FRMD3* Gen zurückzuführen. Selbstverständlich ist die Pathogenese der diabetischen Nephropathie jedoch multifaktoriell und Risikofaktoren wie schlecht eingestellter Blutzucker oder Nikotinabusus (Scott, Warram et al. 2001, Tapp, Shaw et al. 2004) spielen ebenso eine Rolle wie 15 weitere Kandidatengene (Mooyaart, Valk et al. 2011). Eine genomweite Assoziationsstudie ist außerdem nicht in der Lage, Aussagen darüber zu treffen, ob die Mutation des Gens zu einem Funktionsverlust (*loss of function*) oder eine Funktionssteigerung (*gain of function*) des Proteins führt. Nimmt man jedoch einen Funktionsverlust des Proteins 4.1O durch Mutation des *FRMD3* Gens an, dann könnten die vorliegenden Er-

gebnisse im Zusammenhang mit den Ergebnissen der genomweiten Assoziationsstudie wie folgt verknüpft werden. Die funktionelle Abwesenheit von 4.1O bei Diabetikern mit Hyperglykämie/Hyperosmolarität würde zu einer uneingeschränkten Interaktion von β -arrestin2 und Nephrin, zur Endozytose von Nephrin und damit zum Verlust der Integrität der Schlitzmembran mit Proteinurie führen. Bei Diabetikern ohne Veränderungen im *FRMD3* Gen und Anwesenheit von intaktem 4.1O würde die Interaktion von β -arrestin2 und Nephrin gehemmt, Nephrin durch 4.1O in der Zellmembran verankert und die Integrität der Schlitzmembran gewahrt werden.

Fraglich ist, welche Mechanismen dazu führten, dass das Protein 4.1O seine Effekte nur unter Hyperosmolarität ausübt. Zur genauen Beantwortung dieser Frage bedarf es weiterer Forschung. Zwei Hinweise könnten jedoch eine Rolle spielen.

Quack et al., aber auch Ha et al. konnten zeigen, dass eine Hyperglykämie zu einer Erhöhung der PKC α führt (Ha and Lee 2000, Quack, Woznowski et al. 2011). Die PKC α wiederum führt zu einer Phosphorylierung der Threonine 1120 und 1125 von Nephrin, verstärkt dadurch die Bindung von β -arrestin2 in diesem Bereich und führt so zu einer vermehrten Endozytose von Nephrin (Quack, Woznowski et al. 2011). Für das Protein 4.1R aus der Proteinfamilie 4.1 wurde eine Interaktion der FA Domäne mit PKC (Proteinkinasen C) nachgewiesen. Dabei dienen zwei Serine der FA-Domäne als Substat für die PKC. Eine Phosphorylierung dieser Serine führt zu einer Regulation der FERM-Domäne (Baines 2006). Man könnte daher vermuten, dass auch das Protein 4.1O eine solche Interaktion mit PKC eingeht. Die durch die Hyperglykämie bedingte Erhöhung der PKC α könnte somit zu einer Regulation des Protein 4.1O führen.

Ein zweiter Hinweis bezieht sich auf die Tatsache, dass die Proteine 4.1O und Podocin eine überlappende Bindungsstelle an Nephrin haben. Entsprechend muss zunächst eine Schädigung, z.B. durch Hyperosmolarität stattfinden, damit Nephrin Y1193 dephosphoryliert wird und Podocin seine Bindung an Nephrin reduziert. Nur so wäre die Bindungsstelle an Nephrin überhaupt frei für eine Interaktion mit 4.1O.



C

Abb. 20: Einordnung des Proteins 4.10 in das Model zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran nach Quack et al. 2006.

(vgl. Quack, I., Rump, L. C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T. & Sellin, L. 2006. β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14110-5).

PM= Plasmamembran (gelb) inkl. lipid rafts (orange), EC= Extrazellularraum, IC= Intrazellularraum

(A) Vorgänge an der intakten glomerulären Schlitzmembran unter normoosmolaren Bedingungen.

Die Homodimerisierung der Nephrin Moleküle benachbarter podozytärer Fußfortsätze führt zu einer Phosphorylierung des Tyrosins 1193 des intrazellulären Anteils von Nephrin durch die Src-Kinase Yes. Dies ermöglicht die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin. Auf diese Weise wird das Nephrin Molekül im Bereich der lipid rafts in der Zellmembran verankert. Eine Interaktion mit β -Arrestin2 findet nicht statt.

(B) Vorgänge an der geschädigten glomerulären Schlitzmembran z.B. bei hyperosmolaren Bedingungen und in der Abwesenheit des Proteins 4.10.

Der Verlust der extrazellulären Bindungen der Nephrin Moleküle führt zu einer Dephosphorylierung des Tyrosins 1193 des intrazellulären Anteils von Nephrin. Die Interaktion mit Podocin wird daraufhin beendet und gleichzeitig eine Interaktion von β -Arrestin2 an Nephrin ermöglicht. Die Interaktion mit β -Arrestin2 führt zu einer Endozytose von Nephrin und damit zu einem Verlust von intaktem Nephrin an der Oberfläche der podozytären Fußfortsätze und einer verminderten Integrität der glomerulären Schlitzmembran.

(C) Vorgänge an der geschädigten glomerulären Schlitzmembran z.B. bei hyperosmolaren Bedingungen und in Anwesenheit des Proteins 4.1O

Der Verlust der extrazellulären Bindungen der Nephrin Moleküle führt zu einer Dephosphorylierung des Tyrosins 1193 des intrazellulären Anteils von Nephrin. Die Interaktion mit Podocin wird daraufhin beendet. Allerdings wird durch die Anwesenheit des Proteins 4.1O auch die Interaktion zwischen Nephrin und β -Arrestin2 sowie die daraus resultierende Endozytose von Nephrin abgeschwächt. Das Protein 4.1O interagiert mit dem intrazellulären Anteil von Nephrin und vernetzt diesen in seiner Funktion als Adapterprotein vermutlich mit dem Aktin-Zytoskelett. Für das Protein 4.1O kann somit unter hyperosmolaren Bedingungen eine protektive Funktion für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran postuliert werden.

5.3 Die Rolle des Proteins 4.1O für das podozytäre Zytoskelett**5.3.1 *Protein 4.1O ist ein Adapterprotein zwischen glomerulärer Schlitzmembran und Aktinzytoskelett***

Das podozytäre Zytoskelett dient zum einen der Stabilisierung, zum anderen der dynamischen Flexibilität des Podozyten und ermöglicht so die Ausbildung von Zell-Zellkontakten wie der Schlitzmembran und Zell-Matrixkontakten zur glomerulären Basalmembran (Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Faul, Asanuma et al. 2007). Im Bereich der podozytären Fußfortsätze basiert das Zytoskelett auf Bündel von Aktinfilamenten (Vasmant, Maurice et al. 1984), die in jedem der drei Bereiche des Podozyten (apikale, laterale und basale Membrandomäne) über bestimmte Adapter- und Effektorproteine mit der Zellmembran verbunden sind und auf diese Weise reguliert werden (Faul, Asanuma et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines *Pulldown*-Assays gezeigt werden, dass das Protein 4.1O an Aktin band. Auch für alle weiteren Mitglieder der 4.1 Familie mit Ausnahme von 4.1N konnten ebenfalls Interaktionen mit Aktin nachgewiesen werden (Gimm, An et al. 2002). Für die Bindung an Aktin ist die 13 kDa schwere Aktin-Bindungsdomäne (ABD) des Protein 4.1O im Bereich der Aminosäuren 335-450 verantwortlich. Eine strukturell ähnliche Domäne findet sich bei allen Mitgliedern der 4.1 Familie. Sie wird durch ihre genaue Erforschung im Erythrozyten als Spektrin/Aktin Bindungsdomäne (SAB-Domäne) bezeichnet und dient auch hier der Interaktion mit dem Spektrin/Aktin-Zytoskelett des Erythrozyten und führt darüber hinaus zu einer Vernetzung der Bestandteile des Zytoskelettes untereinander (Leto and Marchesi 1984, Correas, Speicher et al. 1986, Conboy, Chan et al. 1988). Vermutlich besitzt daher auch das Protein 4.1O eine Funktion in der Organisation und Stabilisierung des Aktin-Zytoskelettes. Fasst man die Ergebnisse zur Interaktion mit den Transmembranproteinen Nephrin, NEPH1 und GLEPP1 sowie die Interaktion mit Aktin zusammen, dann zeigt sich, dass das Protein 4.1O die Funktion eines Adapterproteins besitzt. Es verbindet die

Transmembranproteine Nephrin, NEPH1 und GLEPP1 mit dem Aktin-Zytoskelett. Diese Funktion ist in der Literatur für die anderen Mitglieder der Proteinfamilie 4.1 bereits beschrieben. Sie gelten als Adapterproteine, die eine Vernetzung des Zytoskelettes mit der Zellmembran ermöglichen (Hoover and Bryant 2000, Diakowski, Grzybek et al. 2006, Baines, Lu et al. 2014). In der Literatur wird der Multiproteinkomplex der Schlitzmembran als eine Art Sensor beschrieben, der über Adapter- und Effektorproteine eine Anpassung des Aktinzytoskelettes des Podozyten an verschiedene Bedingungen ermöglicht, während ein intaktes podozytäres Zytoskelett unabdingbar für die Ausbildung der normalen Schlitzmembran ist. Schädigungen des Podozyten führen daher zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes mit abgeflachten, verkürzten und verschmolzenen Fußfortsätzen. Die Zell-Zellkontakte der Schlitzmembran und die Zell-Matrixkontakte zur GBM können nicht aufrecht erhalten werden und es kommt zum Verlust der Filterfunktion mit Proteinurie (Andrews 1975, Ryan, Rodewald et al. 1975, Kerjaschki 1978, Kanwar and Rosenzweig 1982, Shirato, Sakai et al. 1996, Pavenstadt, Kriz et al. 2003). Das Protein 4.1O könnte als Adapterprotein eine zentrale Rolle in dieser Signalkette übernehmen. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen von Kramer-Zucker et al. unterstützt. Der Verlust des Proteins 4.1O Orthologes im Zebrafisch führt dort zu abnormaler Podozytenmorphologie und Filterfunktion mit massiver Proteinurie (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005).

5.3.2 Protein 4.1O interagiert mit GLEPP1

Die im oberen Teil nachgewiesene Interaktion mit der apikal lokalisierten Rezeptor Membran Protein Tyrosin Phosphatase GLEPP1 (Thomas, Wharram et al. 1994), lässt vermuten, dass das Protein 4.1O auch im apikalen Anteil des Podozyten die Funktion eines Adapterproteins übernehmen könnte und GLEPP1 mit dem Aktin-Zytoskelett vernetzt. Da das Protein 4.1O, wie in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt, im Bereich der Phosphatasedomäne an GLEPP1 bindet, lässt sich vermuten, dass die Funktion von 4.1O durch GLEPP1 reguliert werden kann. GLEPP1 könnte somit über das Protein 4.1O Einfluss auf die Regulation des Zytoskelettes des Podozyten nehmen. Unterstützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen von Wharram et al. aus dem Jahre 2000. Der Verlust von GLEPP1 führt in *ptpro*^{-/-} *knockout*-Mäusen unter anderem zu einer Formänderung des Podozyten von einer oktopoiden hin zu einer amoeboiden Form durch Veränderung der primären Fortsätze und zu einer Verdickung und Verkürzung der sekundären Fußfortsätze (Wharram, Goyal et al. 2000). Zumindest die Veränderungen der sekundären Fußfortsätze beruhen auf Reorganisationen des Aktin-Zytoskelettes (Vasman, Maurice et al. 1984), bei denen die Funktion von 4.1O als Adapterprotein sehr gut denkbar wäre.

5.3.3 *Protein 4.1 O interagiert mit IQGAP1*

Des Weiteren zeigte die vorliegende Arbeit eine Interaktion des Proteins 4.1O mit IQGAP1. Rigotherier konnte 2012 für IQGAP1 im Podozyten eine Co-Lokalisation und Interaktion mit Proteinen der glomerulären Schlitzmembran, aber auch mit dem Aktinzytoskelett, nachweisen. Entsprechend ist IQGAP1 unter anderem ein Adapterprotein des Podozyten (Rigotherier, Auguste et al. 2012). Eine Interaktion der beiden Adapterproteine IQGAP1 und 4.1O mit dem Ziel der gemeinsamen Vernetzung der Zellmembranproteine mit dem Zytoskelett und/oder der Regulation dieser Verankerung im Bereich der lateralen Membrandomäne des Podozyten wäre somit denkbar. Im Allgemeinen ist IQGAP1 darüber hinaus ein Hauptregulator für die Cadherin-vermittelten Zellkontakte (Kuroda, Fukata et al. 1998, Fukata, Kuroda et al. 1999) sowie Zellpolarisation und Zellmigration (Mataraza, Briggs et al. 2003, Watanabe, Wang et al. 2004). Für das Protein 4.1R aus der Proteinfamilie 4.1 konnte 2011 durch Ruiz-Sáenz ebenfalls eine Interaktion mit IQGAP1 nachgewiesen werden. In humanen Epithelzellen (ECV304- und PC3-Zellen) colokalisieren und interagieren 4.1R und IQGAP1 im Bereich des Leitsaumes migrierender Zellen. 4.1R führt dabei zu einer Rekrutierung von IQGAP1 an den Leitsaum und ermöglicht so eine Zellmigration (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Durch die bekannten Homologien zwischen den Familienmitgliedern der 4.1 Familie scheint es somit wahrscheinlich, dass auch das Protein 4.1O eine Funktion im Bereich der Zellmigration von Podozyten haben könnte. Ruiz-Saenz identifizierte die FERM-Domäne von 4.1R als ein notwendiges Element für die Bindung zwischen IQGAP1 und 4.1R (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Auch für das Protein 4.1O konnte hier gezeigt werden, dass die Bindung an IQGAP1 mindestens im Bereich der ersten 272 Aminosäuren von 4.1O stattfand, welche die FERM-Domäne einschließen.

5.3.4 *Protein 4.1O und fokale Adhäsionen*

Für das Protein Paxillin hingegen konnte in den durchgeführten Co-Immunopräzipitationen keine Interaktion mit dem Protein 4.1O festgestellt werden. Paxillin gilt als ein wichtiges Adapterprotein der fokalen Adhäsionen, die im basalen Membranbereich des Podozyten das Aktinzytoskelett mit der glomerulären Basalmembran vernetzen (Glenney and Zokas 1989, Brown, Perrotta et al. 1996, Schaller and Schaefer 2001). Da fokale Adhäsionen jedoch aus über 180 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt werden (Zaidel-Bar, Itzkovitz et al. 2007, Zaidel-Bar and Geiger 2010), kann eine Beteiligung von 4.1O an der Bildung oder Regulation der fokalen Adhäsionen nicht ausgeschlossen werden. Im Gegenteil scheint es so-

gar wahrscheinlich, dass das Protein 4.1O ein Teil der fokalen Adhäsionen sein könnte, da für andere Proteine der 4.1 Superfamilie wie beispielsweise Talin eine Beteiligung an der Bildung fokaler Adhäsionen nachgewiesen werden konnte (Tadokoro, Shattil et al. 2003, Zaidel-Bar, Itzkovitz et al. 2007). Die FERM-Domäne spielt dabei eine wichtige Rolle in der Bindung und Aktivierung von β -Integrinen (Tadokoro, Shattil et al. 2003). Es müssen daher weitere Untersuchungen folgen, um die Bedeutung des Proteins 4.1O für die fokalen Adhäsionen zu klären. Außerdem gab es durch die fehlende Interaktion mit Paxillin aktuell keinen Hinweis auf die Lokalisation von 4.1O im Bereich der basalen Membranbereiche des Podozyten. Die Interaktion mit Nephrin und NEPH1 machten eine Lokalisation von 4.1O im lateralen Membranbereich und die Interaktion mit GLEPP1 im apikalen Membranbereich wahrscheinlich. Für andere Adapterproteine wie IQGAP1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie nur im Bereich der apikalen und lateralen Membranbereiche des Podozyten exprimiert werden (Rigothier, Auguste et al. 2012). Da eine Kolo-kalisation von IQGAP1 und dem Protein 4.1R in humanen Epithelzellen gezeigt werden konnte (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011), wäre auch eine exklusive Lokalisation von 4.1O in den apikalen und lateralen Anteilen des Podozyten möglich. Auch hier müssen weitere Untersuchungen folgen.

5.3.5 Protein 4.1O ersetzt die Funktion von Nck2 und hat Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Nephrin

Weiterhin sollte der Einfluss des Proteins 4.1O auf die bekannte Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 (Jones, Blasutig et al. 2006) untersucht werden. Nck2 ist ein Adapterprotein der Nck-Familie und dient unter anderem der Vernetzung von Nephrin mit dem Zytoskelett. Die Bindung an Nephrin erfolgt über eine SH2-Domäne, während die SH3-Domänen von Nck2 der Interaktion mit Effektorproteinen des Zytoskelettes dienen (Lehmann, Riethmüller et al. 1990, Jones, Blasutig et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte die bekannte Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 bestätigt werden (Jones, Blasutig et al. 2006). Des Weiteren zeigte sich, dass unter hyperosmolaren Bedingungen das Protein 4.1O die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 signifikant abschwächte. Theoretisch müsste die abgeschwächte Bindung von Nephrin und Nck2 zu einer Verminderung der Stabilität von Nephrin in der Zellmembran geführt haben. Da aber in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt werden konnte, dass das Protein 4.1O unter hyperosmolaren Bedingungen keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte, kann man annehmen, dass das Protein 4.1O möglicherweise zwar die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 hemmte, dann aber die Adapterfunktion von Nck2 durch das Protein 4.1O übernommen wurde. Unterstützt wird diese Annahme zum einen dadurch, dass Nck2 ein Adapterprotein ist (Jones, Blasutig et al. 2006) und sich auch für

das Protein 4.1O diese Funktion aus den vorliegenden Ergebnissen und den Erkenntnissen zur Proteinfamilie 4.1 ableiten lässt. Zum anderen unterstreichen folgende Untersuchungen diese Annahme: Jones et al. zeigten 2009, dass ein Verlust von Nck1 und Nck2 in der Maus zu Proteinurie, Glomerulosklerose und veränderter Podozytenmorphologie zu Folge hat (Jones, New et al. 2009). Ebenso zeigte Kramer-Zucker 2005, dass die Deletion des 4.1 Orthologs im Zebrafisch zu einer abnormen Podozytenfunktion mit Proteinurie, veränderter Podozytenmorphologie und beginnender Glomerulosklerose führt (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). Bei beiden Proteinen führt ein Verlust zu einem ähnlichen morphologischen Bild, so dass auch deren Funktion ähnlich sein muss.

Betrachtet man die weiteren Ergebnisse, dann zeigte sich, dass unter dem Einfluss des Proteins 4.1O bei hyperosmolaren Bedingungen außerdem die Phosphorylierung von Nephrin Y1217 und Y1176/1193 abgeschwächt wurde. Die Tyrosine Y1217, Y1176 und Y1193 sind Bestandteil der YDxV Motive des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin. Die phosphorylierten Tyrosine dienen dabei als Bindungsstellen für die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 (Jones, Blasutig et al. 2006, Verma, Kovari et al. 2006, Blasutig, New et al. 2008). Folglich könnte über die gezeigte Abschwächung der Phosphorylierung der Tyrosine Y1217, Y1176 und Y1193 in Anwesenheit des Proteins 4.1O eine verminderte Bindung zwischen Nephrin und Nck2 erklärt werden. Andersherum wäre auch folgende Erklärung plausibel: New et al. konnten 2013 zeigen, dass die Phosphorylierung von Nephrin unter anderem durch die Src Kinase Fyn erfolgt. Durch Bindung von Nck2 an die phosphorylierten Tyrosine werden die SH3-Domänen von Nck2 aktiviert und können auf diese Weise unter anderem wieder mit Fyn interagieren und dessen Wirkung verstärken. Diese positive Rückkopplung verleiht Nck2 eine zusätzliche Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion und in der Regulation der Schlitzmembran (New, Keyvani Chahi et al. 2013). Da das Protein 4.1O die Interaktion von Nck2 und Nephrin hemmte, kann auch die positive Rückkopplung der Phosphorylierung der Nephrin Tyrosine nicht mehr stattfinden. Die gezeigte Verminderung der Phosphorylierung unter dem Einfluss von 4.1O könnte somit auch auf diese Weise erklärt werden. Bislang wurden die gezeigten Co-Immunopräzipitationen zum Einfluss des Proteins 4.1O auf die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 und die Phosphorylierung von Nephrin Y1217, Y1176 und Y1193 nur unter hohen Glukosespiegeln von 25 mM durchgeführt. Dies entsprach einer deutlichen Hyperglykämie sowie einer Hyperosmolarität. Interessant wäre zu überprüfen, ob 4.1O auch hier seinen Einfluss nur unter Hyperosmolarität ausübt, so wie es oben für die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 gezeigt werden konnte.

Das Protein 4.1O scheint durch seinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus der Nephrin Tyrosine eine Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion und damit Regulation der glomerulären Schlitzmembran und des podozytären Zytoskelettes zu spielen, da die Phosphorylier-

ung von Nephrin als Signalprotein eine zentrale Schaltstelle für diese Prozesse darstellt (Benzing 2004, Huber and Benzing 2005). Das Protein 4.1O hat somit nicht nur eine Funktion für die Regulation der glomerulären Schlitzmembran und die Regulation des podozytären Zytoskelettes, sondern stellt auch eine wichtige strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen diesen beiden Komponenten dar.

5.4 Schlussfolgerung

Der Nachweis der Expression des Proteins 4.1O konnte in der vorliegenden Arbeit für die humane Niere, humane Podozyten und HEK293T-Zellen erbracht werden. Im Bezug auf die weiteren Ergebnisse muss natürlich beachtet werden, dass es sich um molekularbiologische *in vitro* Versuche handelt. Die Versuche zur Co-Immunopräzipitation, zum Biotin-Assay und *Pulldown*-Assay wurden mit transfizierten HEK293T-Zellen durchgeführt und stellen somit ein *in vitro* Modell für die realen Vorgänge im Podozyten dar. Bestätigung der Funktionsstudien an immortalisierten Podozyten oder genetisch veränderten Podozyten (4.1O *knock-down*) werden erwartet. Ob also die beschriebenen Ergebnisse auch *in vivo* in der gleichen Weise zu beobachten sind, ist naturgemäß nicht sicher zu sagen. Es müssen daher in weiteren Schritten Untersuchungen *in vivo* erfolgen. Nichtsdestotrotz kann man sagen, dass sich die bestehenden Untersuchungen zu 4.1O *in vivo*, wie die genomweite Assoziationsstudie bei Typ I Diabetikern und die Erkenntnisse aus der Deletion des 4.1O Orthologes im Zebrafisch, gut mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinen lassen.

Zusammenfassend ist das Protein 4.1O ein neues Adapterprotein des Podozyten, welches einerseits sowohl mit den transmembranären Proteinen Nephrin, NEPH1 und GLEPP1, andererseits mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten interagiert und dadurch, wie auch die anderen Mitglieder der Proteinfamilie 4.1, vermutlich die lokale Organisation des Zytoskelettes übernimmt. Das Protein 4.1O hat somit nicht nur eine Bedeutung für die glomeruläre Schlitzmembran einerseits und das podozytäre Zytoskelett andererseits, sondern ist vielmehr verantwortlich für die strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen beiden Anteilen. Unter hyperosmolaren Bedingungen hemmte das Protein 4.1O die Interaktion von Nephrin und dem Adapterprotein Nck2 und ersetzte auf diese Weise vermutlich die Funktion von Nck2. Durch seine Interaktion mit IQGAP1 lässt sich auch auf eine Rolle des Proteins 4.1O im Zusammenhang mit der Migration der Zellen schließen. Im Bezug auf die glomeruläre Schlitzmembran besitzt das Protein 4.1O unter hypersomolaren Zuständen eine protektive Funktion, da es die Interaktion von Nephrin und β -arrestin2 verminderte, die Funktion von Podocin ersetzte und keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin hatte. Im Zusammenhang mit

der Identifikation des *FRMD3* Gens, als ein Kandidatengen für die diabetische Nephropathie, lässt sich in der Pathogenese dieser Erkrankung ein Verlust des Proteins 4.1O und seiner protektiven Funktion vermuten, woraufhin möglicherweise die Integrität der Schlitzmembran verloren geht.

6 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Proteinkomplexes, welcher die glomeruläre Schlitzmembran bildet.	4
Abb. 2: Schematische Darstellung des Modells zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran.....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung des latero-basalen Anteils eines podozytären Fußfortsatzes.	12
Abb. 4: Darstellung der zwei Splicevarianten des Proteins 4.1O.	41
Abb. 5: Nachweis der 4.1O Expression in humanen Podozyten, humanem Nierengewebe und HEK293T-Zellen mittels PCR und Westernblot.....	42
Abb. 6: Schematische Darstellung der Domänen des Proteins 4.1O.....	43
Abb. 7: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1158-1190 von Nephrin.....	45
Abb. 8: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 506-554 von 4.1O.....	46
Abb. 9: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und NEPH1.	47
Abb. 10: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 936-1197 von GLEPP1.	48
Abb. 11: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1-181 von 4.1O.....	49
Abb. 12: Nachweis der Interaktion des Protein 4.1O mit sich selbst und Eingrenzung der Interaktionsstelle auf die AA 1-181 und AA 450-554.....	50
Abb. 13: 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter hyperosmolaren Bedingungen.	52
Abb. 14: 4.1O hat keinen Einfluss auf die Endozytose von Nephrin im Biotin-Assay.	54
Abb. 15: Nachweis der Interaktion zwischen der Aktin-Bindungsdomäne von 4.1O und G-Aktin im <i>Pulldown-Assay</i>	55
Abb. 16: Co-Immunopräzipitation zwischen Protein 4.1O und Paxillin zeigt keine Interaktion.	56
Abb. 17: Nachweis der Interaktion zwischen Protein 4.1O und IQGAP1.	57

Abb. 18: 4.1O hemmt die Interaktion zwischen Nephrin und Nck2.	59
Abb. 19: 4.1O hemmt die Phosphorylierung an Nephrin pY1217 und pY1176/1193.	60
Abb. 20: Einordnung des Proteins 4.1O in das Model zur dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran nach Quack et al. 2006.....	70

7 Literaturverzeichnis

Adler, S. (1994). "Structure-function relationships associated with extracellular matrix alterations in diabetic glomerulopathy." *J Am Soc Nephrol* **5**(5): 1165-1172.

An, X., X. Zhang, G. Debnath, A. J. Baines and N. Mohandas (2006). "Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins." *Biochemistry* **45**(18): 5725-5732.

Andersen, A. R., J. S. Christiansen, J. K. Andersen, S. Kreiner and T. Deckert (1983). "Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study." *Diabetologia* **25**(6): 496-501.

Andrews, P. M. (1975). "Scanning electron microscopy of the nephrotic kidney." *Virchows Arch B Cell Pathol* **17**(3): 195-211.

Andrews, P. M. (1981). "Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus." *Kidney Int* **20**(5): 549-562.

Arakawa, M. (1971). "A scanning electron microscope study of the human glomerulus." *Am J Pathol* **64**(2): 457-466.

Arkill, K. P., K. Qvortrup, T. Starborg, J. M. Mantell, C. Knupp, C. C. Michel, S. J. Harper, A. H. Salmon, J. M. Squire, D. O. Bates and C. R. Neal (2014). "Resolution of the three dimensional structure of components of the glomerular filtration barrier." *BMC Nephrol* **15**: 24.

Attramadal, H., J. L. Arriza, C. Aoki, T. M. Dawson, J. Codina, M. M. Kwatra, S. H. Snyder, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family." *J Biol Chem* **267**(25): 17882-17890.

Aumailley, M., H. Wiedemann, K. Mann and R. Timpl (1989). "Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV." *Eur J Biochem* **184**(1): 241-248.

Avasthi, P. S. and V. Koshy (1988). "Glomerular endothelial glycocalyx." *Contrib Nephrol* **68**: 104-113.

Baines, A. J. (2006). "A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function." *BMC Genomics* **7**: 85.

Baines, A. J., H. C. Lu and P. M. Bennett (2014). "The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins." *Biochim Biophys Acta* **1838**(2): 605-619.

Ballestrem, C., B. Hinz, B. A. Imhof and B. Wehrle-Haller (2001). "Marching at the front and dragging behind: differential α 5 β 3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior." *J Cell Biol* **155**(7): 1319-1332.

Begum, F., D. Ghosh, G. C. Tseng and E. Feingold (2012). "Comprehensive literature review and statistical considerations for GWAS meta-analysis." *Nucleic Acids Res* **40**(9): 3777-3784.

Bellis, S. L., J. T. Miller and C. E. Turner (1995). "Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase." *J Biol Chem* **270**(29): 17437-17441.

Benigni, A., E. Gagliardini, S. Tomasoni, M. Abbate, P. Ruggenenti, R. Kalluri and G. Remuzzi (2004). "Selective impairment of gene expression and assembly of nephrin in human diabetic nephropathy." *Kidney Int* **65**(6): 2193-2200.

Benzing, T. (2004). "Signaling at the slit diaphragm." *J Am Soc Nephrol* **15**(6): 1382-1391.

Bjorn, S. F., H. J. Bangstad, K. F. Hanssen, G. Nyberg, J. D. Walker, G. C. Viberti and R. Osterby (1995). "Glomerular epithelial foot processes and filtration slits in IDDM patients." *Diabetologia* **38**(10): 1197-1204.

Blasutig, I. M., L. A. New, A. Thanabalasuriar, T. K. Dayarathna, M. Goudreault, S. E. Quaggin, S. S. Li, S. Gruenheid, N. Jones and T. Pawson (2008). "Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization." *Mol Cell Biol* **28**(6): 2035-2046.

Bohrer, M. P., C. Baylis, H. D. Humes, R. J. Glassock, C. R. Robertson and B. M. Brenner (1978). "Permselectivity of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations." *J Clin Invest* **61**(1): 72-78.

Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet and C. Antignac (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." *Nat Genet* **24**(4): 349-354.

Brown, M. C., M. S. Curtis and C. E. Turner (1998). "Paxillin LD motifs may define a new family of protein recognition domains." *Nat Struct Biol* **5**(8): 677-678.

Brown, M. C., J. A. Perrotta and C. E. Turner (1996). "Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding." *J Cell Biol* **135**(4): 1109-1123.

Brown, M. C. and C. E. Turner (2004). "Paxillin: adapting to change." *Physiol Rev* **84**(4): 1315-1339.

Byers, H. R., T. Etoh, J. Vink, N. Franklin, S. Gattoni-Celli and M. C. Mihm, Jr. (1992). "Actin organization and cell migration of melanoma cells relate to differential expression of integrins and actin-associated proteins." *J Dermatol* **19**(11): 847-852.

Chang, R. L., W. M. Deen, C. R. Robertson and B. M. Brenner (1975). "Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions." *Kidney Int* **8**(4): 212-218.

Charba, D. S., R. C. Wiggins, M. Goyal, B. L. Wharram, J. E. Wiggins, E. T. McCarthy, R. Sharma, M. Sharma and V. J. Savin (2009). "Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb))." *Am J Physiol Renal Physiol* **297**(1): F138-144.

Claing, A., W. Chen, W. E. Miller, N. Vitale, J. Moss, R. T. Premont and R. J. Lefkowitz (2001). "beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis." *J Biol Chem* **276**(45): 42509-42513.

Cleland, W. W. (1964). "Dithiothreitol, a New Protective Reagent for Sh Groups." *Biochemistry* **3**: 480-482.

Clement, L. C., G. Liu, I. Perez-Torres, Y. S. Kanwar, C. Avila-Casado and S. S. Chugh (2007). "Early changes in gene expression that influence the course of primary glomerular disease." *Kidney Int* **72**(3): 337-347.

Conboy, J., Y. W. Kan, S. B. Shohet and N. Mohandas (1986). "Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(24): 9512-9516.

Conboy, J. G., J. Chan, N. Mohandas and Y. W. Kan (1988). "Multiple protein 4.1 isoforms produced by alternative splicing in human erythroid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23): 9062-9065.

Correas, I., D. W. Speicher and V. T. Marchesi (1986). "Structure of the spectrin-actin binding site of erythrocyte protein 4.1." *J Biol Chem* **261**(28): 13362-13366.

Craft, C. M., D. H. Whitmore and A. F. Wiechmann (1994). "Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family." *J Biol Chem* **269**(6): 4613-4619.

Daniels, B. S. (1993). "The role of the glomerular epithelial cell in the maintenance of the glomerular filtration barrier." *Am J Nephrol* **13**(5): 318-323.

Dawid, I. B., J. J. Breen and R. Toyama (1998). "LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions." *Trends Genet* **14**(4): 156-162.

de Carcer, G., M. J. Lallena and I. Correas (1995). "Protein 4.1 is a component of the nuclear matrix of mammalian cells." *Biochem J* **312** (Pt 3): 871-877.

Diakowski, W., M. Grzybek and A. F. Sikorski (2006). "Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily." *Folia Histochem Cytobiol* **44**(4): 231-248.

Discher, D. E., R. Winardi, P. O. Schischmanoff, M. Parra, J. G. Conboy and N. Mohandas (1995). "Mechanochemistry of protein 4.1's spectrin-actin-binding domain: ternary complex interactions, membrane binding, network integration, structural strengthening." *J Cell Biol* **130**(4): 897-907.

Donoviel, D. B., D. D. Freed, H. Vogel, D. G. Potter, E. Hawkins, J. P. Barrish, B. N. Mathur, C. A. Turner, R. Geske, C. A. Montgomery, M. Starbuck, M. Brandt, A. Gupta, R. Ramirez-Solis, B. P. Zambrowicz and D. R. Powell (2001). "Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN." *Mol Cell Biol* **21**(14): 4829-4836.

Doublier, S., G. Salvidio, E. Lupia, V. Ruotsalainen, D. Verzola, G. Deferrari and G. Camussi (2003). "Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II." *Diabetes* **52**(4): 1023-1030.

Drenckhahn, D. and R. P. Franke (1988). "Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man." *Lab Invest* **59**(5): 673-682.

Drumond, M. C. and W. M. Deen (1994). "Structural determinants of glomerular hydraulic permeability." *Am J Physiol* **266**(1 Pt 2): F1-12.

Dunlevy, J. R. and J. R. Couchman (1993). "Controlled induction of focal adhesion disassembly and migration in primary fibroblasts." *J Cell Sci* **105** (Pt 2): 489-500.

Duran-Salgado, M. B. and A. F. Rubio-Guerra (2014). "Diabetic nephropathy and inflammation." *World J Diabetes* **5**(3): 393-398.

Edwards, A., B. S. Daniels and W. M. Deen (1999). "Ultrastructural model for size selectivity in glomerular filtration." Am J Physiol **276**(6 Pt 2): F892-902.

El Mesallamy, H. O., H. H. Ahmed, A. A. Bassyouni and A. S. Ahmed (2012). "Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy." Clin Biochem **45**(9): 646-650.

Farquhar, M. G., S. L. Wissig and G. E. Palade (1961). "Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall." J Exp Med **113**: 47-66.

Faul, C., K. Asanuma, E. Yanagida-Asanuma, K. Kim and P. Mundel (2007). "Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton." Trends Cell Biol **17**(9): 428-437.

Foley, R. N. and A. J. Collins (2007). "End-stage renal disease in the United States: an update from the United States Renal Data System." J Am Soc Nephrol **18**(10): 2644-2648.

Fowler, V. M. (1990). "Tropomodulin: a cytoskeletal protein that binds to the end of erythrocyte tropomyosin and inhibits tropomyosin binding to actin." J Cell Biol **111**(2): 471-481.

Freedman, B. I., C. D. Langefeld, L. Lu, J. Divers, M. E. Comeau, J. B. Kopp, C. A. Winkler, G. W. Nelson, R. C. Johnson, N. D. Palmer, P. J. Hicks, M. A. Bostrom, J. N. Cooke, C. W. McDonough and D. W. Bowden (2011). "Differential effects of MYH9 and APOL1 risk variants on FRMD3 Association with Diabetic ESRD in African Americans." PLoS Genet **7**(6): e1002150.

Fries, J. W., D. J. Sandstrom, T. W. Meyer and H. G. Rennke (1989). "Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat." Lab Invest **60**(2): 205-218.

Fuchshuber, A., G. Jean, O. Gribouval, M. C. Gubler, M. Broyer, J. S. Beckmann, P. Niaudet and C. Antignac (1995). "Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis." Hum Mol Genet **4**(11): 2155-2158.

Fukata, M., S. Kuroda, M. Nakagawa, A. Kawajiri, N. Itoh, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara, H. Fujisawa, A. Kikuchi and K. Kaibuchi (1999). "Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin." J Biol Chem **274**(37): 26044-26050.

Funayama, N., A. Nagafuchi, N. Sato, S. Tsukita and S. Tsukita (1991). "Radixin is a novel member of the band 4.1 family." J Cell Biol **115**(4): 1039-1048.

Furness, P. N., L. L. Hall, J. A. Shaw and J. H. Pringle (1999). "Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome." Nephrol Dial Transplant **14**(5): 1234-1237.

Gee, S. L., K. Aoyagi, R. Lersch, V. Hou, M. Wu and J. G. Conboy (2000). "Alternative splicing of protein 4.1R exon 16: ordered excision of flanking introns ensures proper splice site choice." Blood **95**(2): 692-699.

Gerke, P., T. B. Huber, L. Sellin, T. Benzing and G. Walz (2003). "Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1." J Am Soc Nephrol **14**(4): 918-926.

- Gerke, P., L. Sellin, O. Kretz, D. Petraschka, H. Zentgraf, T. Benzing and G. Walz (2005). "NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases." *J Am Soc Nephrol* **16**(6): 1693-1702.
- Gimm, J. A., X. An, W. Nunomura and N. Mohandas (2002). "Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins." *Biochemistry* **41**(23): 7275-7282.
- Glenney, J. R., Jr. and L. Zokas (1989). "Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton." *J Cell Biol* **108**(6): 2401-2408.
- Gould, K. L., A. Bretscher, F. S. Esch and T. Hunter (1989). "cDNA cloning and sequencing of the protein-tyrosine kinase substrate, ezrin, reveals homology to band 4.1." *EMBO J* **8**(13): 4133-4142.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." *Virology* **52**(2): 456-467.
- Graham, R. C., Jr. and M. J. Karnovsky (1966). "Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers." *J Exp Med* **124**(6): 1123-1134.
- Groffen, A. J., M. A. Ruegg, H. Dijkman, T. J. van de Velden, C. A. Buskens, J. van den Born, K. J. Assmann, L. A. Monnens, J. H. Veerkamp and L. P. van den Heuvel (1998). "Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane." *J Histochem Cytochem* **46**(1): 19-27.
- Gu, M. X., J. D. York, I. Warshawsky and P. W. Majerus (1991). "Identification, cloning, and expression of a cytosolic megakaryocyte protein-tyrosine-phosphatase with sequence homology to cytoskeletal protein 4.1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(13): 5867-5871.
- Ha, H. and H. B. Lee (2000). "Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose." *Kidney Int Suppl* **77**: S19-25.
- Han, B. G., W. Nunomura, Y. Takakuwa, N. Mohandas and B. K. Jap (2000). "Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization." *Nat Struct Biol* **7**(10): 871-875.
- Haraldsson, B. and J. Sorensson (2004). "Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier." *News Physiol Sci* **19**: 7-10.
- Hasslacher, C., E. Ritz, P. Wahl and C. Michael (1989). "Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus." *Nephrol Dial Transplant* **4**(10): 859-863.
- Hemming, N. J., D. J. Anstee, M. A. Staricoff, M. J. Tanner and N. Mohandas (1995). "Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte." *J Biol Chem* **270**(10): 5360-5366.
- Herold, G. (2011). *Innere Medizin*, Aufl. 2011 Köln: Gerd Herold, 699.
- Holthofer, H., H. Ahola, M. L. Solin, S. Wang, T. Palmen, P. Luimula, A. Miettinen and D. Kerjaschki (1999). "Nephrin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney." *Am J Pathol* **155**(5): 1681-1687.
- Holzman, L. B., P. L. St John, I. A. Kovari, R. Verma, H. Holthofer and D. R. Abrahamson (1999). "Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell." *Kidney Int* **56**(4): 1481-1491.

- Hoover, K. B. and P. J. Bryant (2000). "The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 229-234.
- Hou, C. L., C. Tang, S. R. Roffler and T. K. Tang (2000). "Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus." Blood **96**(2): 747-753.
- Huang, T. W. and J. C. Langlois (1985). "Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium." J Exp Med **162**(1): 245-267.
- Huang, W., Y. Gallois, N. Bouby, P. Bruneval, D. Heudes, M. F. Belair, J. H. Krege, P. Meneton, M. Marre, O. Smithies and F. Alhenc-Gelas (2001). "Genetically increased angiotensin I-converting enzyme level and renal complications in the diabetic mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(23): 13330-13334.
- Huber, T. B. and T. Benzing (2005). "The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function." Curr Opin Nephrol Hypertens **14**(3): 211-216.
- Huber, T. B., M. Simons, B. Hartleben, L. Sernetz, M. Schmidts, E. Gundlach, M. A. Saleem, G. Walz and T. Benzing (2003). "Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains." Hum Mol Genet **12**(24): 3397-3405.
- Huttunen, N. P. (1976). "Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients." Arch Dis Child **51**(5): 344-348.
- Inoue, T., E. Yaoita, H. Kurihara, F. Shimizu, T. Sakai, T. Kobayashi, K. Ohshiro, H. Kawachi, H. Okada, H. Suzuki, I. Kihara and T. Yamamoto (2001). "FAT is a component of glomerular slit diaphragms." Kidney Int **59**(3): 1003-1012.
- Jeansson, M. and B. Haraldsson (2006). "Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier." Am J Physiol Renal Physiol **290**(1): F111-116.
- Jensen, A. M. and M. Westerfield (2004). "Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation." Curr Biol **14**(8): 711-717.
- Jones, N., I. M. Blasutig, V. Eremina, J. M. Ruston, F. Bladt, H. Li, H. Huang, L. Larose, S. S. Li, T. Takano, S. E. Quaggin and T. Pawson (2006). "Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes." Nature **440**(7085): 818-823.
- Jones, N., L. A. New, M. A. Fortino, V. Eremina, J. Ruston, I. M. Blasutig, L. Aoudjit, Y. Zou, X. Liu, G. L. Yu, T. Takano, S. E. Quaggin and T. Pawson (2009). "Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier." J Am Soc Nephrol **20**(7): 1533-1543.
- Jons, T. and D. Drenckhahn (1992). "Identification of the binding interface involved in linkage of cytoskeletal protein 4.1 to the erythrocyte anion exchanger." EMBO J **11**(8): 2863-2867.
- Kalaitzidis, R. and G. Bakris (2009). "Pathogenesis and treatment of microalbuminuria in patients with diabetes: the road ahead." J Clin Hypertens (Greenwich) **11**(11): 636-643.
- Kanwar, Y. S. and M. G. Farquhar (1979). "Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(3): 1303-1307.

- Kanwar, Y. S. and L. J. Rosenzweig (1982). "Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium." *Kidney Int* **21**(4): 565-574.
- Kefalides, N. A. (1971). "Isolation of a collagen from basement membranes containing three identical - chains." *Biochem Biophys Res Commun* **45**(1): 226-234.
- Kerjaschki, D. (1978). "Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B." *Lab Invest* **39**(5): 430-440.
- Kerjaschki, D. (2001). "Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis." *J Clin Invest* **108**(11): 1583-1587.
- Kerjaschki, D., P. P. Ojha, M. Susani, R. Horvat, S. Binder, A. Hovorka, P. Hillemanns and R. Pytela (1989). "A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli." *Am J Pathol* **134**(2): 481-489.
- Kerjaschki, D., D. J. Sharkey and M. G. Farquhar (1984). "Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell." *J Cell Biol* **98**(4): 1591-1596.
- Kestila, M., U. Lenkkeri, M. Mannikko, J. Lamerdin, P. McCready, H. Putaala, V. Ruotsalainen, T. Morita, M. Nissinen, R. Herva, C. E. Kashtan, L. Peltonen, C. Holmberg, A. Olsen and K. Tryggvason (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." *Mol Cell* **1**(4): 575-582.
- Khoshnoodi, J., K. Sigmundsson, L. G. Ofverstedt, U. Skoglund, B. Obrink, J. Wartiovaara and K. Tryggvason (2003). "Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions." *Am J Pathol* **163**(6): 2337-2346.
- Kim, B. K., H. K. Hong, J. H. Kim and H. S. Lee (2002). "Differential expression of nephrin in acquired human proteinuric diseases." *Am J Kidney Dis* **40**(5): 964-973.
- Kim, J. J., J. J. Li, D. S. Jung, S. J. Kwak, D. R. Ryu, T. H. Yoo, S. H. Han, H. Y. Choi, H. J. Kim, D. S. Han and S. W. Kang (2007). "Differential expression of nephrin according to glomerular size in early diabetic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* **18**(8): 2303-2310.
- Klausen, K. P., H. H. Parving, H. Scharling and J. S. Jensen (2009). "Microalbuminuria and obesity: impact on cardiovascular disease and mortality." *Clin Endocrinol (Oxf)* **71**(1): 40-45.
- Koop, K., M. Eikmans, H. J. Baelde, H. Kawachi, E. De Heer, L. C. Paul and J. A. Bruijn (2003). "Expression of podocyte-associated molecules in acquired human kidney diseases." *J Am Soc Nephrol* **14**(8): 2063-2071.
- Kramer-Zucker, A. G., S. Wiessner, A. M. Jensen and I. A. Drummond (2005). "Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes." *Dev Biol* **285**(2): 316-329.
- Krauss, S. W., C. A. Larabell, S. Lockett, P. Gascard, S. Penman, N. Mohandas and J. A. Chasis (1997). "Structural protein 4.1 in the nucleus of human cells: dynamic rearrangements during cell division." *J Cell Biol* **137**(2): 275-289.
- Kretzler, M., I. Koeppen-Hagemann and W. Kriz (1994). "Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat." *Virchows Arch* **425**(2): 181-193.

Kricka, L. J. and T. P. Whitehead (1987). "Chemiluminescent and bioluminescent immunoassays." *J Pharm Biomed Anal* **5**(8): 829-833.

Krolewski, A. S., J. H. Warram, L. I. Rand and C. R. Kahn (1987). "Epidemiologic approach to the etiology of type I diabetes mellitus and its complications." *N Engl J Med* **317**(22): 1390-1398.

Krolewski, M., P. W. Eggers and J. H. Warram (1996). "Magnitude of end-stage renal disease in IDDM: a 35 year follow-up study." *Kidney Int* **50**(6): 2041-2046.

Kuhlman, P. A., C. A. Hughes, V. Bennett and V. M. Fowler (1996). "A new function for adducin. Calcium/calmodulin-regulated capping of the barbed ends of actin filaments." *J Biol Chem* **271**(14): 7986-7991.

Kuroda, S., M. Fukata, M. Nakagawa, K. Fujii, T. Nakamura, T. Ookubo, I. Izawa, T. Nagase, N. Nomura, H. Tani, I. Shoji, Y. Matsuura, S. Yonehara and K. Kaibuchi (1998). "Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion." *Science* **281**(5378): 832-835.

Kurzchalia, T. V. and R. G. Parton (1999). "Membrane microdomains and caveolae." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 424-431.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-685.

Lahdenpera, J., P. Kilpelainen, X. L. Liu, T. Pikkarainen, P. Reponen, V. Ruotsalainen and K. Tryggvason (2003). "Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases." *Kidney Int* **64**(2): 404-413.

Langham, R. G., D. J. Kelly, A. J. Cox, N. M. Thomson, H. Holthofer, P. Zaoui, N. Pinel, D. J. Cordonnier and R. E. Gilbert (2002). "Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition." *Diabetologia* **45**(11): 1572-1576.

Lankes, W. T. and H. Furthmayr (1991). "Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8297-8301.

Laporte, S. A., R. H. Oakley, J. Zhang, J. A. Holt, S. S. Ferguson, M. G. Caron and L. S. Barak (1999). "The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3712-3717.

Laurens, W., C. Battaglia, C. Foglieni, R. De Vos, B. Malanchini, B. Van Damme, Y. Vanrenterghem, G. Remuzzi and A. Remuzzi (1995). "Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo." *Kidney Int* **47**(4): 1078-1086.

Lehmann, J. M., G. Riethmuller and J. P. Johnson (1990). "Nck, a melanoma cDNA encoding a cytoplasmic protein consisting of the src homology units SH2 and SH3." *Nucleic Acids Res* **18**(4): 1048.

Leto, T. L. and V. T. Marchesi (1984). "A structural model of human erythrocyte protein 4.1." *J Biol Chem* **259**(7): 4603-4608.

Lim, A. K. and G. H. Tesch (2012). "Inflammation in diabetic nephropathy." *Mediators Inflamm* **2012**: 146154.

- Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1990). "beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function." *Science* **248**(4962): 1547-1550.
- Loyter, A., G. Scangos, D. Juricek, D. Keene and F. H. Ruddle (1982). "Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy." *Exp Cell Res* **139**(1): 223-234.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). *Taschenlehrbuch Histologie*, Zweite Auflage Stuttgart: George Thieme Verlage, 437-457.
- Lynch, D. K., S. C. Winata, R. J. Lyons, W. E. Hughes, G. M. Lehrbach, V. Wasinger, G. Corthals, S. Cordwell and R. J. Daly (2003). "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**(24): 21805-21813.
- Maeda, S., S. Araki, T. Babazono, M. Toyoda, T. Umezono, K. Kawai, M. Imanishi, T. Uzu, H. Watada, D. Suzuki, A. Kashiwagi, Y. Iwamoto, K. Kaku, R. Kawamori and Y. Nakamura (2010). "Replication study for the association between four Loci identified by a genome-wide association study on European American subjects with type 1 diabetes and susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes." *Diabetes* **59**(8): 2075-2079.
- Marfatia, S. M., R. A. Lue, D. Branton and A. H. Chishti (1994). "In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C." *J Biol Chem* **269**(12): 8631-8634.
- Mataraza, J. M., M. W. Briggs, Z. Li, A. Entwistle, A. J. Ridley and D. B. Sacks (2003). "IQGAP1 promotes cell motility and invasion." *J Biol Chem* **278**(42): 41237-41245.
- Mattagajasingh, S. N., S. C. Huang, J. S. Hartenstein and E. J. Benz, Jr. (2000). "Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton." *J Biol Chem* **275**(39): 30573-30585.
- Mattagajasingh, S. N., S. C. Huang, J. S. Hartenstein, M. Snyder, V. T. Marchesi and E. J. Benz (1999). "A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein." *J Cell Biol* **145**(1): 29-43.
- McDonough, C. W., N. D. Palmer, P. J. Hicks, B. H. Roh, S. S. An, J. N. Cooke, J. M. Hester, M. R. Wing, M. A. Bostrom, M. E. Rudock, J. P. Lewis, M. E. Talbert, R. A. Blevins, L. Lu, M. C. Ng, M. M. Sale, J. Divers, C. D. Langefeld, B. I. Freedman and D. W. Bowden (2011). "A genome-wide association study for diabetic nephropathy genes in African Americans." *Kidney Int* **79**(5): 563-572.
- McGregor, L. (1929). "The Finer Histology of the Normal Glomerulus." *Am J Pathol* **5**(6): 545-558 541.
- Mogensen, C. E. (1984). "Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes." *N Engl J Med* **310**(6): 356-360.
- Mooyaart, A. L., E. J. Valk, L. A. van Es, J. A. Bruijn, E. de Heer, B. I. Freedman, O. M. Dekkers and H. J. Baelde (2011). "Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis." *Diabetologia* **54**(3): 544-553.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol* **155**: 335-350.

Navarro-Gonzalez, J. F. and C. Mora-Fernandez (2008). "The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **19**(3): 433-442.

New, L. A., A. Keyvani Chahi and N. Jones (2013). "Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins." *J Biol Chem* **288**(3): 1500-1510.

Ni, X., C. Ji, G. Cao, H. Cheng, L. Guo, S. Gu, K. Ying, R. C. Zhao and Y. Mao (2003). "Molecular cloning and characterization of the protein 4.1O gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary." *J Hum Genet* **48**(2): 101-106.

Ochodnický, P., S. Vettoretti, R. H. Henning, H. Buikema, R. P. Van Dokkum and D. de Zeeuw (2006). "Endothelial dysfunction in chronic kidney disease: determinant of susceptibility to end-organ damage and therapeutic response." *J Nephrol* **19**(3): 246-258.

Ohlson, M., J. Sorensson, K. Lindstrom, A. M. Blom, E. Fries and B. Haraldsson (2001). "Effects of filtration rate on the glomerular barrier and clearance of four differently shaped molecules." *Am J Physiol Renal Physiol* **281**(1): F103-113.

Ozaltin, F., T. Ibsirlioglu, E. Z. Taskiran, D. E. Baydar, F. Kaymaz, M. Buyukcelik, B. D. Kilic, A. Balat, P. Iatropoulos, E. Asan, N. A. Akarsu, F. Schaefer, E. Yilmaz, A. Bakkaloglu and C. PodoNet (2011). "Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome." *Am J Hum Genet* **89**(1): 139-147.

Parra, M., P. Gascard, L. D. Walensky, J. A. Gimm, S. Blackshaw, N. Chan, Y. Takakuwa, T. Berger, G. Lee, J. A. Chasis, S. H. Snyder, N. Mohandas and J. G. Conboy (2000). "Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain." *J Biol Chem* **275**(5): 3247-3255.

Parra, M., P. Gascard, L. D. Walensky, S. H. Snyder, N. Mohandas and J. G. Conboy (1998). "Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family." *Genomics* **49**(2): 298-306.

Parving, H. H., B. Oxenboll, P. A. Svendsen, J. S. Christiansen and A. R. Andersen (1982). "Early detection of patients at risk of developing diabetic nephropathy. A longitudinal study of urinary albumin excretion." *Acta Endocrinol (Copenh)* **100**(4): 550-555.

Patrakka, J., M. Kestila, J. Wartiovaara, V. Ruotsalainen, P. Tissari, U. Lenkkeri, M. Mannikko, I. Visapaa, C. Holmberg, J. Rapola, K. Tryggvason and H. Jalanko (2000). "Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients." *Kidney Int* **58**(3): 972-980.

Patrakka, J., V. Ruotsalainen, I. Ketola, C. Holmberg, M. Heikinheimo, K. Tryggvason and H. Jalanko (2001). "Expression of nephrin in pediatric kidney diseases." *J Am Soc Nephrol* **12**(2): 289-296.

Pavenstadt, H., W. Kriz and M. Kretzler (2003). "Cell biology of the glomerular podocyte." *Physiol Rev* **83**(1): 253-307.

Perkins, B. A., L. H. Ficociello, B. E. Ostrander, K. H. Silva, J. Weinberg, J. H. Warram and A. S. Krolewski (2007). "Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes." *J Am Soc Nephrol* **18**(4): 1353-1361.

Peterson, J. C., S. Adler, J. M. Burkart, T. Greene, L. A. Hebert, L. G. Hunsicker, A. J. King, S. Klahr, S. G. Massry and J. L. Seifter (1995). "Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study." *Ann Intern Med* **123**(10): 754-762.

Petit, V., B. Boyer, D. Lentz, C. E. Turner, J. P. Thiery and A. M. Valles (2000). "Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells." *J Cell Biol* **148**(5): 957-970.

Pezzolessi, M. G., G. D. Poznik, J. C. Mychaleckyj, A. D. Paterson, M. T. Barati, J. B. Klein, D. P. Ng, G. Placha, L. H. Canani, J. Bochenski, D. Waggott, M. L. Merchant, B. Krolewski, L. Mirea, K. Wanic, P. Katavetin, M. Kure, P. Wolkow, J. S. Dunn, A. Smiles, W. H. Walker, A. P. Boright, S. B. Bull, D. E. R. Group, A. Doria, J. J. Rogus, S. S. Rich, J. H. Warram and A. S. Krolewski (2009). "Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes." *Diabetes* **58**(6): 1403-1410.

Quack, I., L. C. Rump, P. Gerke, I. Walther, T. Vinke, O. Vonend, T. Grunwald and L. Sellin (2006). "beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(38): 14110-14115.

Quack, I., M. Woznowski, S. A. Potthoff, R. Palmer, E. Konigshausen, S. Sivritas, M. Schiffer, J. Stegbauer, O. Vonend, L. C. Rump and L. Sellin (2011). "PKC alpha mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia." *J Biol Chem* **286**(15): 12959-12970.

Raats, C. J., J. van den Born, M. A. Bakker, B. Oppers-Walgreen, B. J. Pisa, H. B. Dijkman, K. J. Assmann and J. H. Berden (2000). "Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies." *Am J Pathol* **156**(5): 1749-1765.

Raats, C. J., J. Van Den Born and J. H. Berden (2000). "Glomerular heparan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria." *Kidney Int* **57**(2): 385-400.

Ramez, M., M. Blot-Chabaud, F. Cluzeaud, S. Chanan, M. Patterson, L. D. Walensky, S. Marfatia, A. J. Baines, J. A. Chasis, J. G. Conboy, N. Mohandas and P. Gascard (2003). "Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron." *Kidney Int* **63**(4): 1321-1337.

Rees, D. J., S. E. Ades, S. J. Singer and R. O. Hynes (1990). "Sequence and domain structure of talin." *Nature* **347**(6294): 685-689.

Reiser, J., W. Kriz, M. Kretzler and P. Mundel (2000). "The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction." *J Am Soc Nephrol* **11**(1): 1-8.

Rennke, H. G., Y. Patel and M. A. Venkatachalam (1978). "Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat." *Kidney Int* **13**(4): 278-288.

Rennke, H. G. and M. A. Venkatachalam (1977). "Structural determinants of glomerular permselectivity." *Fed Proc* **36**(12): 2519-2526.

Rigothier, C., P. Auguste, G. I. Welsh, S. Lepreux, C. Deminiere, P. W. Mathieson, M. A. Saleem, J. Ripoche and C. Combe (2012). "IQGAP1 interacts with components of the slit diaphragm complex in podocytes and is involved in podocyte migration and permeability in vitro." *PLoS One* **7**(5): e37695.

Ritz, E. and S. R. Orth (1999). "Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus." *N Engl J Med* **341**(15): 1127-1133.

Rodewald, R. and M. J. Karnovsky (1974). "Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse." *J Cell Biol* **60**(2): 423-433.

Roselli, S., O. Gribouval, N. Boute, M. Sich, F. Benessy, T. Attie, M. C. Gubler and C. Antignac (2002). "Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area." Am J Pathol **160**(1): 131-139.

Ruiz-Saenz, A., L. Kremer, M. A. Alonso, J. Millan and I. Correas (2011). "Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge." J Cell Sci **124**(Pt 15): 2529-2538.

Ruotsalainen, V., P. Ljungberg, J. Wartiovaara, U. Lenkkeri, M. Kestila, H. Jalanko, C. Holmberg and K. Tryggvason (1999). "Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7962-7967.

Ryan, G. B., R. Rodewald and M. J. Karnovsky (1975). "An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis." Lab Invest **33**(5): 461-468.

Sato, N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, S. Tsukita and S. Tsukita (1992). "A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites." J Cell Sci **103** (Pt 1): 131-143.

Sato, S. B. and S. Ohnishi (1983). "Interaction of a peripheral protein of the erythrocyte membrane, band 4.1, with phosphatidylserine-containing liposomes and erythrocyte inside-out vesicles." Eur J Biochem **130**(1): 19-25.

Sawada, H., H. Stukenbrok, D. Kerjaschki and M. G. Farquhar (1986). "Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium." Am J Pathol **125**(2): 309-318.

Schaller, M. D. and J. T. Parsons (1995). "pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk." Mol Cell Biol **15**(5): 2635-2645.

Schaller, M. D. and E. M. Schaefer (2001). "Multiple stimuli induce tyrosine phosphorylation of the Crk-binding sites of paxillin." Biochem J **360**(Pt 1): 57-66.

Schischmanoff, P. O., P. Yaswen, M. K. Parra, G. Lee, J. A. Chasis, N. Mohandas and J. G. Conboy (1997). "Cell shape-dependent regulation of protein 4.1 alternative pre-mRNA splicing in mammary epithelial cells." J Biol Chem **272**(15): 10254-10259.

Schmidt, R., Lang, F. (2007). Physiologie des Menschen, 30. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 684-719.

Schnabel, E., J. M. Anderson and M. G. Farquhar (1990). "The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium." J Cell Biol **111**(3): 1255-1263.

Schwarz, K., M. Simons, J. Reiser, M. A. Saleem, C. Faul, W. Kriz, A. S. Shaw, L. B. Holzman and P. Mundel (2001). "Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin." J Clin Invest **108**(11): 1621-1629.

Scott, L. J., J. H. Warram, L. S. Hanna, L. M. Laffel, L. Ryan and A. S. Krolewski (2001). "A nonlinear effect of hyperglycemia and current cigarette smoking are major determinants of the onset of microalbuminuria in type 1 diabetes." Diabetes **50**(12): 2842-2849.

Seaquist, E. R., F. C. Goetz, S. Rich and J. Barbosa (1989). "Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy." N Engl J Med **320**(18): 1161-1165.

Seiler, M. W., M. A. Venkatachalam and R. S. Cotran (1975). "Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations." *Science* **189**(4200): 390-393.

Sellin, L., T. B. Huber, P. Gerke, I. Quack, H. Pavenstadt and G. Walz (2003). "NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins." *FASEB J* **17**(1): 115-117.

Sharif, K., M. Goyal, D. Kershaw, R. Kunkel and R. Wiggins (1998). "Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome." *Exp Nephrol* **6**(3): 234-244.

Shih, N. Y., J. Li, R. Cotran, P. Mundel, J. H. Miner and A. S. Shaw (2001). "CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain." *Am J Pathol* **159**(6): 2303-2308.

Shinohara, T., B. Dietzschold, C. M. Craft, G. Wistow, J. J. Early, L. A. Donoso, J. Horwitz and R. Tao (1987). "Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(20): 6975-6979.

Shirato, I., T. Sakai, K. Kimura, Y. Tomino and W. Kriz (1996). "Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis." *Am J Pathol* **148**(4): 1283-1296.

Simons, M., K. Schwarz, W. Kriz, A. Miettinen, J. Reiser, P. Mundel and H. Holthofer (2001). "Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm." *Am J Pathol* **159**(3): 1069-1077.

Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto and M. P. Lisanti (1999). "Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction." *Mol Cell Biol* **19**(11): 7289-7304.

Smilenov, L. B., A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio and G. G. Gundersen (1999). "Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts." *Science* **286**(5442): 1172-1174.

Smith, S. R., L. P. Svetkey and V. W. Dennis (1991). "Racial differences in the incidence and progression of renal diseases." *Kidney Int* **40**(5): 815-822.

Smith, W. C. (1996). "A splice variant of arrestin from human retina." *Exp Eye Res* **62**(6): 585-592.

Smoyer, W. E., P. Mundel, A. Gupta and M. J. Welsh (1997). "Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 2): F150-157.

Steffes, M. W., D. Schmidt, R. McCrery, J. M. Basgen and G. International Diabetic Nephropathy Study (2001). "Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients." *Kidney Int* **59**(6): 2104-2113.

Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg and D. A. Calderwood (2003). "Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation." *Science* **302**(5642): 103-106.

Takahashi, Y., M. Iwai, T. Kawai, A. Arakawa, T. Ito, M. Sakurai-Yageta, A. Ito, A. Goto, M. Saito, F. Kasumi and Y. Murakami (2012). "Aberrant expression of tumor suppressors CADM1 and 4.1B in invasive lesions of primary breast cancer." *Breast Cancer* **19**(3): 242-252.

Takakuwa, Y. (2001). "Regulation of red cell membrane protein interactions: implications for red cell function." Curr Opin Hematol **8**(2): 80-84.

Takakuwa, Y., G. Tchernia, M. Rossi, M. Benabadji and N. Mohandas (1986). "Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1." J Clin Invest **78**(1): 80-85.

Takeuchi, K., A. Kawashima, A. Nagafuchi and S. Tsukita (1994). "Structural diversity of band 4.1 superfamily members." J Cell Sci **107** (Pt 7): 1921-1928.

Tapp, R. J., J. E. Shaw, P. Z. Zimmet, B. Balkau, S. J. Chadban, A. M. Tonkin, T. A. Welborn and R. C. Atkins (2004). "Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset: results from the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab)." Am J Kidney Dis **44**(5): 792-798.

Tchernia, G., N. Mohandas and S. B. Shohet (1981). "Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability." J Clin Invest **68**(2): 454-460.

Terada, N., N. Ohno, H. Yamakawa, T. Baba, Y. Fujii, G. Christofori, O. Ohara and S. Ohno (2003). "Protein 4.1B in mouse islets of Langerhans and beta-cell tumorigenesis." Histochem Cell Biol **120**(4): 277-283.

Thomas, P. E., B. L. Wharram, M. Goyal, J. E. Wiggins, L. B. Holzman and R. C. Wiggins (1994). "GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit." J Biol Chem **269**(31): 19953-19962.

Tian, J., H. P. Wang, Y. Y. Mao, J. Jin and J. H. Chen (2007). "Reduced glomerular epithelial protein 1 expression and podocyte injury in immunoglobulin A nephropathy." J Int Med Res **35**(3): 338-345.

Tong, X., R. Salgia, J. L. Li, J. D. Griffin and P. M. Howley (1997). "The bovine papillomavirus E6 protein binds to the LD motif repeats of paxillin and blocks its interaction with vinculin and the focal adhesion kinase." J Biol Chem **272**(52): 33373-33376.

Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.

Tran, Y. K., O. Bogler, K. M. Gorse, I. Wieland, M. R. Green and I. F. Newsham (1999). "A novel member of the NF2/ERM/4.1 superfamily with growth suppressing properties in lung cancer." Cancer Res **59**(1): 35-43.

Tryggvason, K. (1999). "Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm." J Am Soc Nephrol **10**(11): 2440-2445.

Tryggvason, K., J. Patrakka and J. Wartiovaara (2006). "Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria." N Engl J Med **354**(13): 1387-1401.

Tsilibary, E. C. (2003). "Microvascular basement membranes in diabetes mellitus." J Pathol **200**(4): 537-546.

Turner, C. E., J. R. Glenney, Jr. and K. Burridge (1990). "Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions." J Cell Biol **111**(3): 1059-1068.

Vasmant, D., M. Maurice and G. Feldmann (1984). "Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat." *Anat Rec* **210**(1): 17-24.

Venkatachalam, M. A., R. S. Cotran and M. J. Karnovsky (1970). "An ultrastructural study of glomerular permeability in aminonucleoside nephrosis using catalase as a tracer protein." *J Exp Med* **132**(6): 1168-1180.

Verma, R., I. Kovari, A. Soofi, D. Nihalani, K. Patrie and L. B. Holzman (2006). "Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization." *J Clin Invest* **116**(5): 1346-1359.

Verma, R., B. Wharram, I. Kovari, R. Kunkel, D. Nihalani, K. K. Wary, R. C. Wiggins, P. Killen and L. B. Holzman (2003). "Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin." *J Biol Chem* **278**(23): 20716-20723.

Viberti, G. C., R. D. Hill, R. J. Jarrett, A. Argyropoulos, U. Mahmud and H. Keen (1982). "Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus." *Lancet* **1**(8287): 1430-1432.

Walensky, L. D., S. Blackshaw, D. Liao, C. C. Watkins, H. U. Weier, M. Parra, R. L. Huganir, J. G. Conboy, N. Mohandas and S. H. Snyder (1999). "A novel neuron-enriched homolog of the erythrocyte membrane cytoskeletal protein 4.1." *J Neurosci* **19**(15): 6457-6467.

Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama and K. Kaibuchi (2004). "Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration." *Dev Cell* **7**(6): 871-883.

Weissbach, L., J. Settleman, M. F. Kalady, A. J. Snijders, A. E. Murthy, Y. X. Yan and A. Bernards (1994). "Identification of a human rasGAP-related protein containing calmodulin-binding motifs." *J Biol Chem* **269**(32): 20517-20521.

Welsch, T., N. Endlich, W. Kriz and K. Endlich (2001). "CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes." *Am J Physiol Renal Physiol* **281**(4): F769-777.

Wharram, B. L., M. Goyal, P. J. Gillespie, J. E. Wiggins, D. B. Kershaw, L. B. Holzman, R. C. Dysko, T. L. Saunders, L. C. Samuelson and R. C. Wiggins (2000). "Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate." *J Clin Invest* **106**(10): 1281-1290.

Wiggins, R. C., J. E. Wiggins, M. Goyal, B. L. Wharram and P. E. Thomas (1995). "Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13." *Genomics* **27**(1): 174-181.

Wong, S. Y., H. Haack, J. L. Kissil, M. Barry, R. T. Bronson, S. S. Shen, C. A. Whittaker, D. Crowley and R. O. Hynes (2007). "Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(31): 12784-12789.

Yang, D. H., M. Goyal, K. Sharif, D. Kershaw, P. Thomas, R. Dysko and R. Wiggins (1996). "Glomerular epithelial protein 1 and podocalyxin-like protein 1 in inflammatory glomerular disease (crescentic nephritis) in rabbit and man." *Lab Invest* **74**(3): 571-584.

Yang, Q. and N. K. Tonks (1991). "Isolation of a cDNA clone encoding a human protein-tyrosine phosphatase with homology to the cytoskeletal-associated proteins band 4.1, ezrin, and talin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(14): 5949-5953.

Young, F. E. and J. Spizizen (1961). "Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **81**: 823-829.

Yu, J., D. A. Fischman and T. L. Steck (1973). "Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents." J Supramol Struct **1**(3): 233-248.

Zaidel-Bar, R. and B. Geiger (2010). "The switchable integrin adhesome." J Cell Sci **123**(Pt 9): 1385-1388.

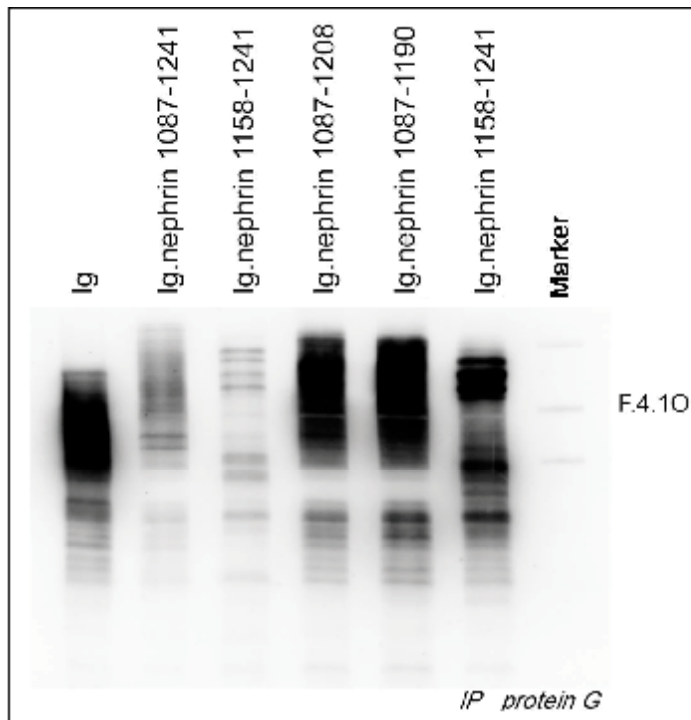
Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar and B. Geiger (2007). "Functional atlas of the integrin adhesome." Nat Cell Biol **9**(8): 858-867.

Zhang, Y., R. Xu, G. Li, X. Xie, J. Long and H. Wang (2012). "Loss of expression of the differentially expressed in adenocarcinoma of the lung (DAL-1) protein is associated with metastasis of non-small cell lung carcinoma cells." Tumour Biol **33**(6): 1915-1925.

Ziyadeh, F. N. and G. Wolf (2008). "Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy." Curr Diabetes Rev **4**(1): 39-45.

8 Anhang

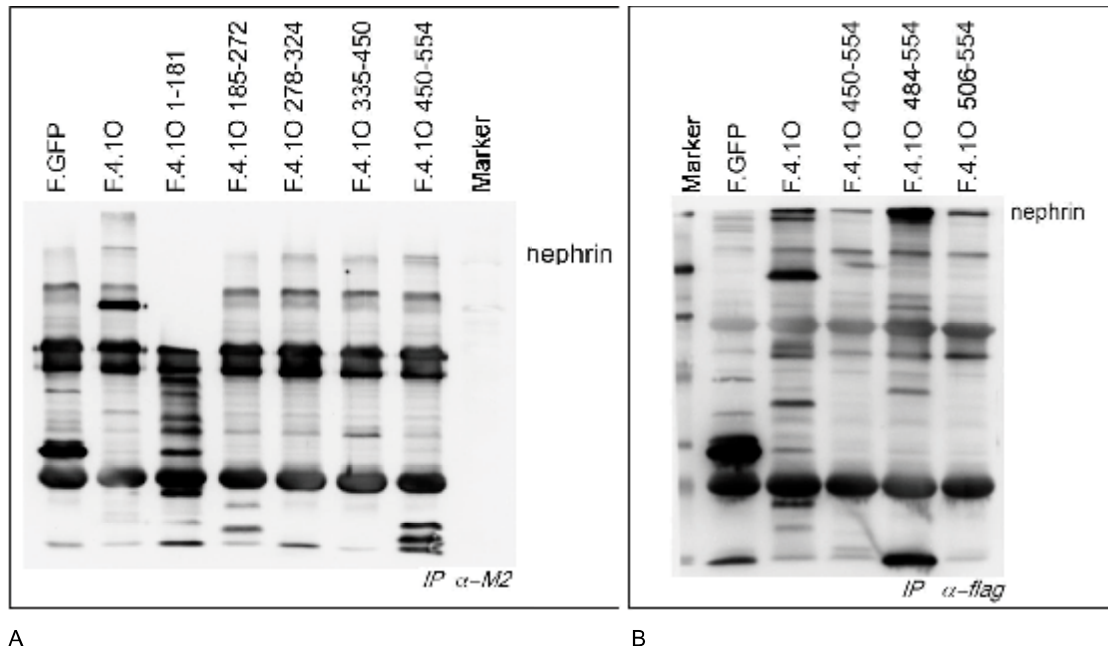
Anhang 1: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1158-1190 von Nephrin (siehe 4.2.1.1.1).



Anhang Abb. 21: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1158-1190 von Nephrin.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.1O, Ig.Nephrin cyt, verschiedene Ig.Nephrin Truncations und einen Ig.Leervektor. Nach Zelllyse wurden der Ig.Leervektor, Ig.Nephrin und die Ig.Nephrin Truncations mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb. 7 (siehe 4.2.1.1.1) ist die Färbung des Blots gegen F.4.1O dargestellt. Zum Nachweis der Expression von Ig.Nephrin cyt AA1087-1241, der Ig.Nephrin Truncations AA 1158-1241, AA 1087-1208, AA 1087-1190, AA 1158-1208 und dem Ig.Leervektor, wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-human-IgG Antikörper nachgefärbt. Die Expression von Ig.Nephrin AA158-1241 ist schwächer als die weiteren Ig.Nephrin Truncations.

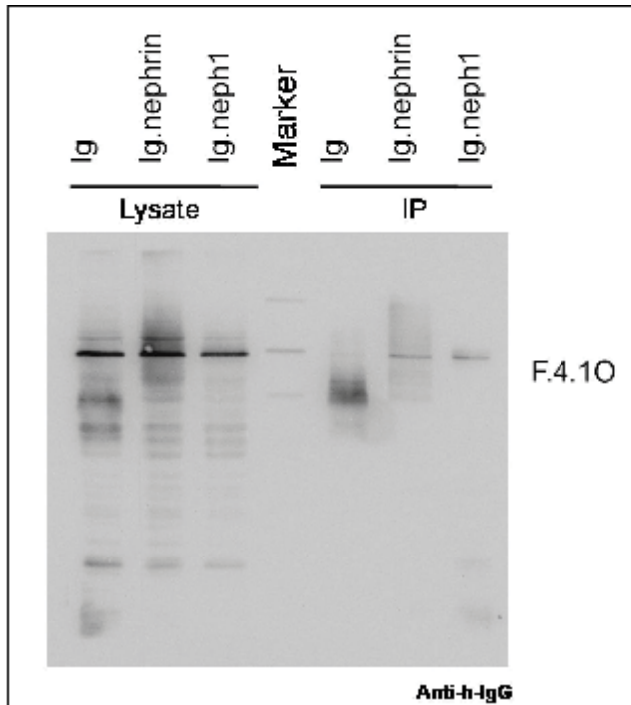
Anhang 2: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 506-554 von 4.1O (siehe 4.2.1.1.2).



Anhang Abb. 22: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 506-554 von 4.1O.

(A) und (B) Die HEK293T-Zellen exprimierten Nephrin, F.4.1O, verschiedene F.4.1O Truncations und eine Negativkontrolle (F.GFP). Nach Zellyse wurden F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O Truncations mit M2-Beads präzipitiert. In der Abb. 8 (siehe 4.2.1.1.2) ist die Färbung des Blots gegen Nephrin gezeigt. Zum Nachweis der Expression von F.GFP, F.4.1O, der F.4.1O Truncations AA 1-181, AA 185-272, AA 278-324, AA 335-450, AA 450-554 (A) und F.GFP, F.4.1O sowie der F.4.1O Truncations AA 450-554, AA 484-554, AA 506-554 (B), wurden die hier dargestellten Blots zusätzlich mit Anti-Flag-Antikörper nachgefärbt.

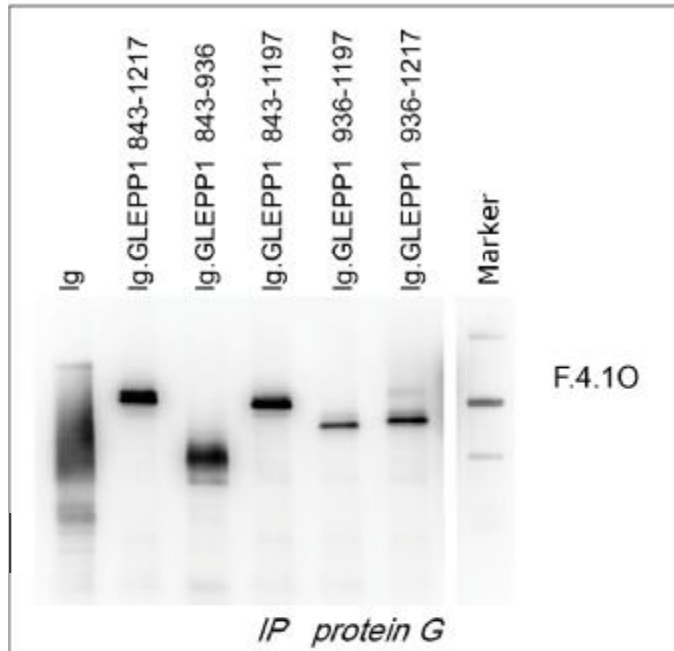
Anhang 3: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und NEPH1 (siehe 4.2.1.2).



Anhang Abb. 23: Nachfärbung zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und NEPH1.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.1O, Ig.NEPH1, Ig.Nephrin und einen Ig.Leervektor. Nach Zelllyse wurden Ig.Nephrin, Ig.Nephrin und der Ig.Leervektor mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb. 9 (siehe 4.2.1.2) ist die Färbung des Blots gegen F.4.1O gezeigt. Die Nachfärbung von Ig.Nephrin, Ig.NEPH1 und des Ig.Leervektors mit Anti-human-IgG-Antikörper zeigt sich hier sehr schwach und lässt ein Problem mit dem Antikörper vermuten.

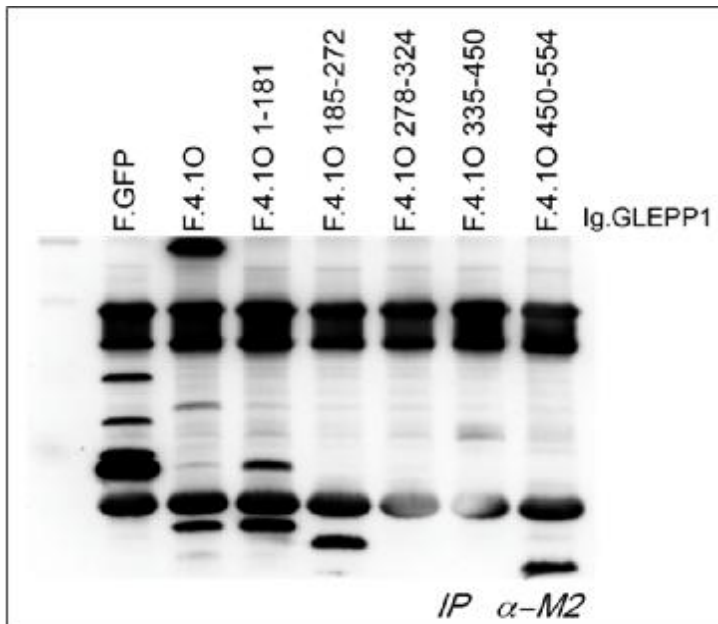
Anhang 4: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 936-1197 von GLEPP1. (siehe 4.2.1.3.1)



Anhang Abb. 24: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 936-1197 von GLEPP1.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.4.1O, Ig.GLEPP1 cyt, verschiedene Ig.GLEPP1 Truncations und einen Ig.Leervektor. Nach Zelllyse wurden Ig.GLEPP1 cyt, verschiedene Ig.GLEPP1 Truncations und der Ig.Leervektor mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb. 10 (siehe 4.2.1.3.1.) ist die Färbung des Blots gegen F.4.1O gezeigt. Zum Nachweis gleicher Expression von Ig.GLEPP1 cyt, der Ig.GLEPP1 Truncations AA 843-936, AA 843-1197, AA 936-1197, AA 936-1217 und des Ig.Leervektors wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-human-IgG-Antikörper nachgefärbt.

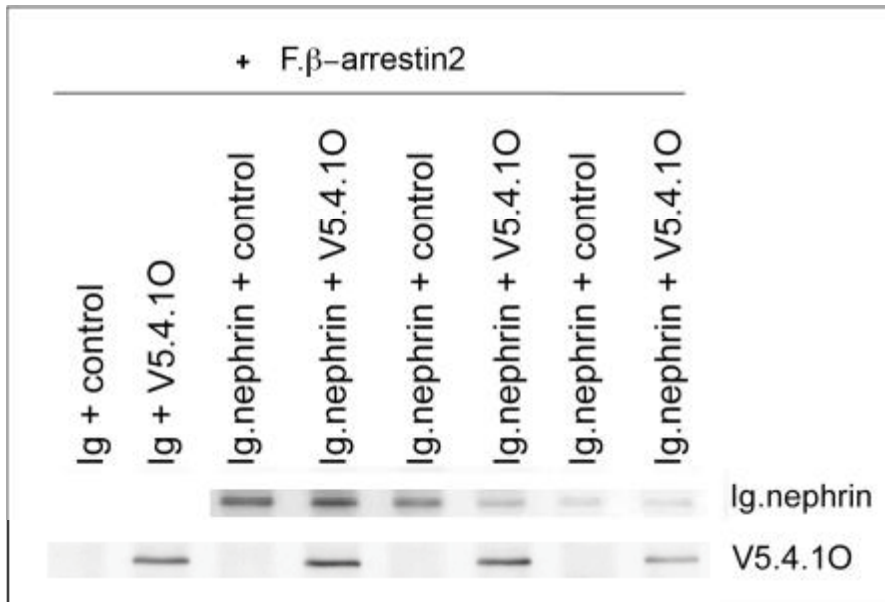
Anhang 5: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1-181 von 4.1O. (siehe 4.2.1.3.2.)



Anhang Abb. 25: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und GLEPP1 und Eingrenzung der Bindungsstelle auf die AA 1-181 von 4.1O.

Die HEK293T-Zellen exprimierten Ig.GLEPP1 cyt, F.4.1O, verschiedene F.4.1O Truncations und eine Negativkontrolle (F.GFP). Nach Zelllyse wurden F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O Truncations mit M2-Beads präzipitiert. In der Abb. 25 (siehe 4.2.1.3.2.) ist die Färbung des Blots gegen Ig.GLEPP1 gezeigt. Zum Nachweis der Expression von F.GFP, F.4.1O, der F.4.1O Truncations AA 1-181, AA 185-272, AA 278-324, AA 335-450 wurden der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-Flag-Antikörper nachgefärbt.

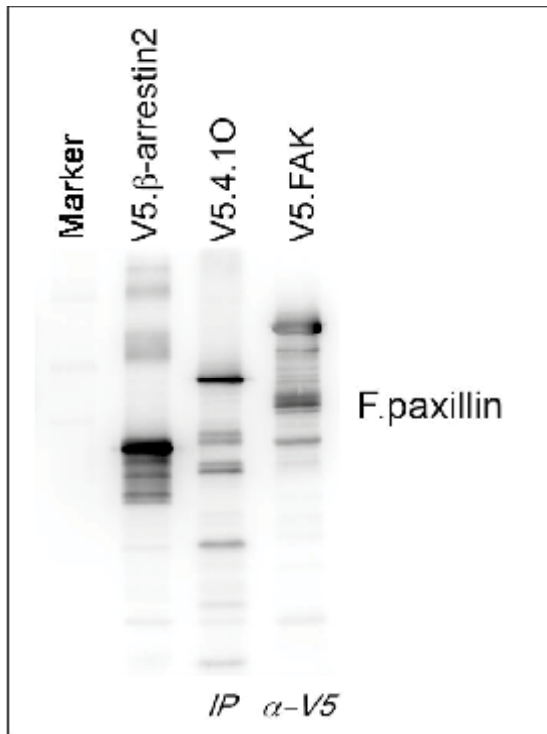
Anhang 6: Expressionsnachweis zur Co-Immunopräzipitation zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter dem Einfluss von Protein 4.1O (siehe 4.2.2.1.)



Anhang Abb. 26: Expressionsnachweis zur Co-Immunopräzipitation zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter dem Einfluss von Protein 4.1O

Die HEK293T-Zellen exprimierten F. β -arrestin2, Ig.Nephrin oder einen Ig.-Leervektor als Negativkontrolle. In den Proben 2, 4, 6 und 8 wurde zusätzlich V5.4.1O transfiziert. Die übrigen Proben exprimierten einen leeren Kontrollvektor. Die Zellen der Proben 1 + 2 und 5 + 6 wurden nach dem Mediumwechsel unter hohen Glukosekonzentrationen (25 mM), Zellen der Probe 3 + 4 unter niedrigen Glukosekonzentrationen (5,5 mM) und Zellen der Proben 7 + 8 unter niedriger Glukosekonzentration (5,5 mM) und Mannitol (19,5 mM) kultiviert. Nach Zelllyse wurde Ig.Nephrin mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb. 13 (siehe 4.2.2.1.) wurde der Immunoblot gegen F. β -arrestin2 gefärbt. Oben: Zum Nachweis der Expression von Ig. Nephrin wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-Nephrin -Antikörper nachgefärbt. Unten: Zum Nachweis der Expression von V5.4.1O wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-V5-Antikörper nachgefärbt.

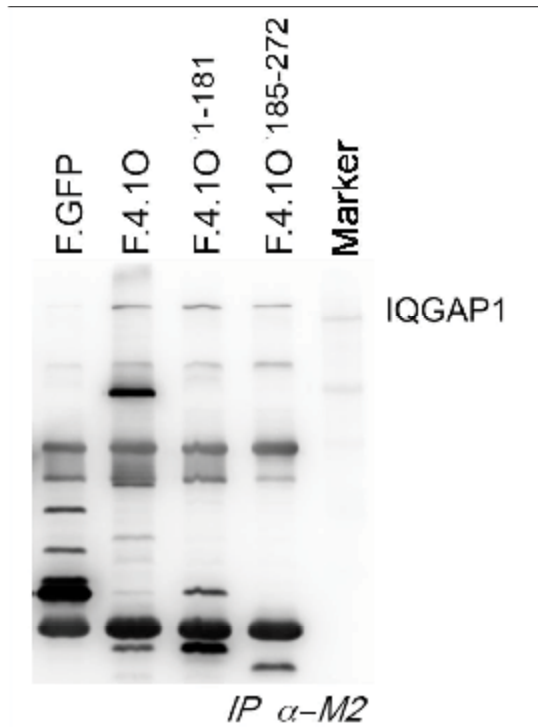
Anhang 7: Expressionsnachweis zur Co-Immunopräzipitation zwischen Protein 4.1O und Paxillin. (siehe 4.3.1.2.)



Anhang Abb. 27: Expressionsnachweis zur Co-Immunopräzipitation zwischen Protein 4.1O und Paxillin.

Die HEK293T-Zellen exprimierten F.Paxillin, V5.4.1O, V5 FAK und eine Negativkontrolle (V5.β-arrestin2). Nach Zelllyse wurden V5.4.1O, V5 FAK und V5.β-arrestin2 mit V5-Antikörper inkubiert und mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb. 16 (siehe 4.3.1.2.) ist die Färbung des Blots gegen F.Paxillin gezeigt. Zum Nachweis der Expression von V5.4.1O, V5 FAK und V5.β-arrestin2, wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-Flag-Antikörper nachgefärbt.

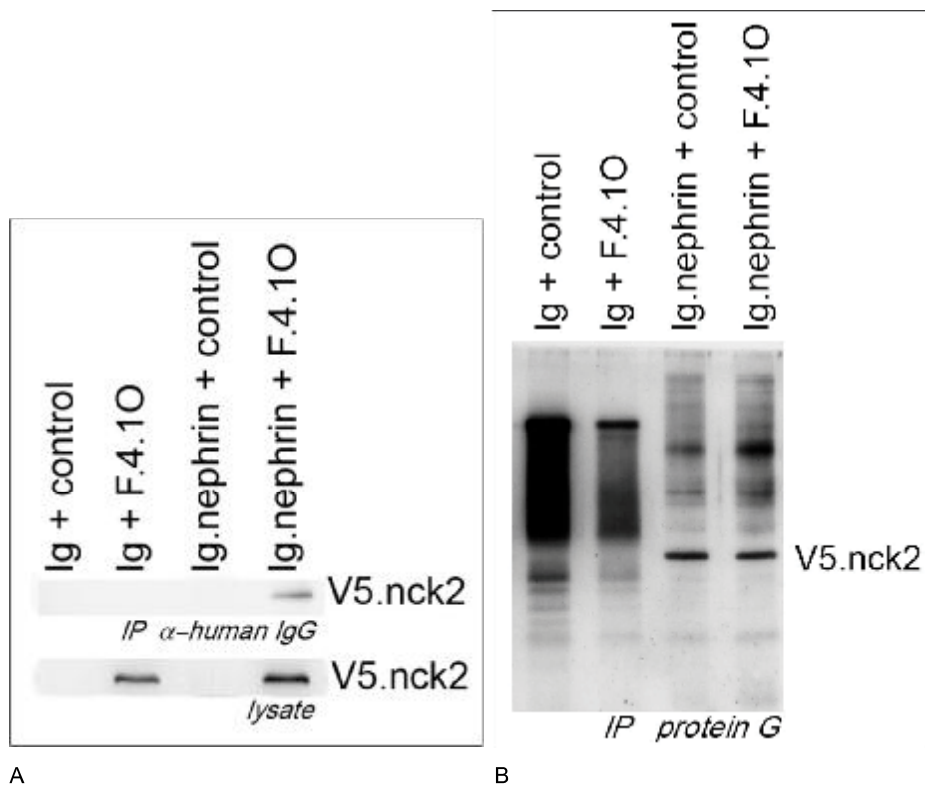
Anhang 8: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und IQGAP1 (siehe 4.3.1.3).



Anhang Abb. 28: Expressionsnachweis zur Interaktion zwischen Protein 4.1O und IQGAP1.

Die HEK293T-Zellen exprimierten IQGAP1, F.4.1O, verschiedene F.4.1O Truncations und eine Negativkontrolle (F.GFP). Nach Zellyse wurden F.GFP, F.4.1O und die F.4.1O Truncations mit M2-Beads präzipitiert. In der Abb. 17 (siehe 4.3.1.3) ist die Färbung des Blots gegen IQGAP1 gezeigt. Zum Nachweis der Expression von F.GFP, F.4.1O und der F.4.1O Truncations AA 1-181, AA 185-272 wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-Flag-Antikörper nachgefärbt.

Anhang 9: Expressionsnachweis Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 unter Einfluss des Proteins 4.1O (siehe 4.3.2.1).



A

B

Anhang Abb. 29: Expressionsnachweis Interaktion zwischen Nephrin und Nck2 unter Einfluss des Proteins 4.1O.

Die HEK293T-Zellen exprimierten V5.Nck2, Ig.Nephrin cyt oder einen Ig.Leervektor als Negativkontrolle und entweder F.4.1O oder einen leeren Kontrollvektor. Nach Zelllyse wurde Ig.Nephrin mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. In der Abb.18 (siehe 4.3.2.1) ist die Färbung des Blots gegen Nck2 gezeigt. (A) Zum Nachweis der Expression von F.4.1O wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-Flag-Antikörper nachgefärbt. (B) Zum Nachweis der Expression von Ig.Nephrin cyt und dem Ig.Leervektor wurde der hier dargestellte Blot zusätzlich mit Anti-human-IgG-Antikörper nachgefärbt.

Danksagung

Herr Prof. Dr. med. Lorenz Sellin, Ihnen danke ich herzlich für die freundliche Überlassung dieses hochspannenden Themas und die exzellente Betreuung in jeder Phase dieser Arbeit. Durch Ihre große wissenschaftliche Kompetenz und Erfahrung wurde diese Arbeit stets zielgerichtet geleitet.

Mein besonderer Dank geht darüber hinaus an meine Betreuerin Frau Dr. med. Eva Königshausen. Eva, während der gesamten Arbeit hast du mich professionell, aber auch sehr engagiert und herzlich betreut. Jederzeit konnte ich auf deine Unterstützung und kompetente Hilfe vertrauen. Du hast mir nicht nur viel technisches Wissen, sondern auch die Freude an der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt. Durch deine Unterstützung bei der Planung der einzelnen Experimente verlief die Arbeit im Labor stets zielgerichtet. Vielen Dank für Alles!

Blanka Duvnjak, Helen Schulte, Christina Schwandt und Helen Schulte, euch danke ich für die wertvolle Unterstützung im Bezug auf technische Fragen und das herzliche Miteinander im Labor.

Daneben möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der experimentellen Nephrologie für die stets kollegiale und freundliche Atmosphäre und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen danken.

Zuletzt danke ich meinen Eltern Kristina und Henning Ohlsson, meiner Schwester Kristin Ohlsson und meinem Freund Dr. med. Benedikt Höing für ihre fortwährende Unterstützung, ihr Interesse an meiner Arbeit und die zahlreichen produktiven Ratschläge und Korrekturen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 01.05.2018

Sinja Ohlsson