

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

**Die Funktionen von GLEPP1 im Podozyten und
dessen Bedeutung für die Integrität der
glomerulären Schlitzmembran**

Dissertation

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

vorgelegt von
Sarah Johanna Grabowski

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

gewidmet

Pauline und Karlotta

Zusammenfassung

Proteinurische Nierenerkrankungen stellen seit Jahren eine zunehmende Herausforderung für die Medizin und die Gesundheitssysteme dar. Vergangene Studien zeigten, dass bei einigen proteinurischen Nierenerkrankungen die Expression von GLEPP1 stark herabgesetzt ist [1, 2]. GLEPP1 ist eine Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase (RPTP), die sich am apikalen Pol des podozytären Fußfortsatzes befindet. Mäuse mit fehlerhafter Bildung von GLEPP1 zeigten unter Belastung und beim Altern eine renale Symptomatik [3].

Ziel der durchgeführten Experimente war es, die physiologische Funktion von GLEPP1 im Podozyten zu erforschen und die Bedeutung von GLEPP1 für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran genauer zu untersuchen.

Dazu wurden *Human Embryonic Kidney 293 T Zellen* (HEK 293 T Zellen) in der Zellkultur mit GLEPP1 und den zu untersuchenden möglichen Interaktionspartnern von GLEPP1 (z.B. verschiedene Src-Kinasen) transfiziert. Die Zellen wurden am nächsten Tag lysiert. Um eine Interaktion der über Nacht exprimierten Proteine nachzuweisen, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass GLEPP1 sowohl mit Nephrin, als auch Podocin, sowie mit den Src-Familien-Kinasen (SFK) Fyn und Src interagiert. Des Weiteren zeigte sich, dass GLEPP1 Src am Tyrosin 527 dephosphoryliert und somit aktiviert. Die Nephrin-Podocin-Interaktion wurde durch GLEPP1 verstärkt und die Nephrin- β -arrestin2-Interaktion wurde durch GLEPP1 geschwächt. Abschließend wurde gezeigt, dass GLEPP1 die Endozytose von Nephrin reduziert.

Wir konnten mit dieser Studie dazu beitragen, wichtige neue Erkenntnisse über die RPTP GLEPP1 zu gewinnen. Die Ergebnisse unserer Versuche passen zu der Theorie, dass GLEPP1 über seine Phosphatase-Aktivität SFK dephosphoryliert und somit aktiviert. Die SFKs können Nephrin vermehrt phosphorylieren und Podocin bindet und stabilisiert daraufhin Nephrin in der Schlitzmembran. Die Endozytose von Nephrin wird somit von GLEPP1 verringert. Die Bestätigung dieser Theorie durch unsere Ergebnisse hilft uns, ein genaueres Bild über die Funktionen und Aufgaben von GLEPP1 im Podozyten zu zeichnen. Es wird immer deutlicher, dass die Phosphatase-Aktivität von GLEPP1 essenziell an der physiologischen Regulation und Funktion des glomerulären Filters beteiligt ist. Deshalb gilt es, die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit durch weiterführende *in vivo* Versuche zu bestätigen und das beschriebene Bild von GLEPP1 zu vervollständigen.

Abstract

Proteinuric kidney diseases have been an increasing challenge for medical therapies and health care systems for years. Past studies have shown that in some proteinuric kidney diseases the expression of GLEPP1 is strongly reduced [1, 2]. GLEPP1 is a receptor protein tyrosine phosphatase (RPTP) located at the apical pole of the podocyte foot processes. Mice with lack of GLEPP1 expression showed renal symptoms if challenged or at advanced age [3].

The experiments in this study aimed to discover the molecular physiological functions of GLEPP1 in the podocyte and to investigate the further role of GLEPP1 for the integrity of the glomerular slit diaphragm.

Therefore, Human Embryonic Kidney 293 T cells (HEK 293 T cells) were transfected with GLEPP1 and the potential interaction partners of GLEPP1 (i.e. Src kinases). The cells were lysed the following day, followed by a co-immunoprecipitation to detect the interacting proteins.

We were able to show that GLEPP1 interacts with both nephrin and podocin, as well as with the Src family kinases (SFK) Fyn and Src. Furthermore, we demonstrated that GLEPP1 dephosphorylates and thus activates Src at tyrosine 527. Nephrin-podocin-interaction was increased by GLEPP1 and the nephrin- β -arrestin2-interaction was decreased by GLEPP1. Finally, as a result of the increased interaction with β -arrestin2, GLEPP1 reduces the endocytosis of nephrin.

With this study we contributed to new discoveries about the molecular function of the RPTP GLEPP1. The results of our experiments fit the theory that GLEPP1 dephosphorylates and thus activates SFKs through its phosphatase activity. The activated SFKs can therefore increase the phosphorylation of nephrin. Podocin binds to phosphorylated nephrin and stabilizes nephrin in the slit diaphragm. Thus, the endocytosis of nephrin is decreased by GLEPP1. By confirming this theory with our results, we gained better understanding of GLEPP1 functions in the podocyte. It is increasingly clear that the phosphatase activity of GLEPP1 is an essential part of the physiological regulation and function of the glomerular filter. Hopefully the results of this study will be confirmed and expanded through further *in vivo* experiments so we can reach a complete and detailed understanding of GLEPP1 *in vivo*.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulphate
<i>aqua dest.</i>	<i>aqua destillata</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CaCl₂	Kalziumchloriddihydrat
CASK	Kalzium/ Calmodulin-abhängige Serin Protein Kinase
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
CNF	kongenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ
CO₂	Kohlendioxid
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
DEP-1	<i>Density-Enhanced Phosphatase 1</i>
ddH₂O	Demineralisiertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4 Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Anion
FBS	Fetale Bowine Serum

FSGS	fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLEPP1	<i>Glomerular Epithelial Protein 1</i>
HEBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IP	Immunopräzipitation
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH₂PO₄	Kaliumhydrogenphosphat
LB	Luria Bertani
M	Mol
MCD	<i>Minimal Change Disease</i>
MgCl₂	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
mM	Millimol
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
NaCO₃	Natriumcarbonat
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat

NaH₂PO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
n.s.	nicht signifikant
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAN	Puromycin Aminoglycosid Nephropathie
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PHN	passive Heymann Nephritis
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinasen
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTPRO	Rezeptor-Typ Tyrosin-Protein-Phosphatase O
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPTP	Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase
SDS	Natriumdodecylphosphat
SFK	Src-Familien-Kinasen
S/min	Schläge pro Minute
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido) Hexanoat
TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Temed	Tetramethylethylendiamin
Tet.	Tetracyclin

TLC	Tetracyclin Hydrochlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VE-PTP	vaskuläre endotheliale Protein-Tyrosin-Phosphatase
Y	Tyrosin
ZO-1	<i>Zonula Occludens 1</i>
-/-	<i>Knock-Out</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 <i>Klinische Relevanz der Proteinurie</i>	1
1.2 <i>Der glomeruläre Filter</i>	2
1.2.1 Die Niere.....	2
1.2.2 Die Filterbarriere.....	2
1.2.3 Die glomeruläre Schlitzmembran.....	5
1.3 <i>Nephrin</i>	6
1.3.1 Regulierung der Nephrin-Signaltansduktion an der Schlitzmembran	7
1.3.2 Podocin.....	8
1.3.3 β -arrestin2	8
1.3.4 Src-Familien-Kinasen.....	9
1.4 <i>GLEPP1</i>	10
1.4.1 Die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase.....	10
1.4.2 GLEPP1 in Mäusen und Ratten.....	11
1.4.3 GLEPP1 im Menschen, renale Funktion	11
1.5 <i>Ziel der Arbeit</i>	12
2 Material und Methoden	14
2.1 <i>Material</i>	14
2.1.1 Zellkultur	14
2.1.2 Transfektion.....	14
2.1.3 Plasmide.....	15
2.1.4 Transformation und Amplifikation	16
2.1.5 Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation	17
2.1.6 DNA Restriktion und Gelelektrophorese.....	17

2.1.7	Zellernte.....	18
2.1.8	Immunopräzipitation.....	19
2.1.9	SDS- Gelelektrophorese.....	20
2.1.10	<i>Western Blot</i>	22
2.1.11	Immunofärbung – Antikörper.....	22
2.1.12	Chemilumineszenz.....	23
2.1.13	Endozytoseassay mittels Biotinmarkierung.....	24
2.2	<i>Zellkultur</i>	25
2.2.1	Kultivierung der Zelllinie HEK 293T.....	25
2.2.2	Aussaat der Zellen für die Transfektion.....	25
2.2.3	Transfektion.....	25
2.3	<i>Proteinaufbereitung und Isolierung</i>	26
2.3.1	Ernte von HEK 293T Zellen.....	26
2.3.2	Co-Immunopräzipitation.....	26
2.3.3	SDS-Gelelektrophorese.....	27
2.3.4	<i>Western Blot</i>	28
2.3.5	Immunofärbung.....	29
2.3.6	Blotentwicklung – Chemilumineszenz.....	30
2.4	<i>Plasmide</i>	30
2.4.1	Transformation und Amplifikation.....	30
2.4.2	Mini-Kulturen.....	31
2.4.3	Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation.....	31
2.4.4	DNA-Restriktion und Gelelektrophorese.....	31
2.5	<i>Endozytose Assay mittels Biotinmarkierung</i>	32
2.6	<i>Densitometrie und Statistik</i>	33
3	Ergebnisse	34
3.1	<i>Interaktionspartner von GLEPP1</i>	34
3.1.1	Nephrin interagiert mit GLEPP1.....	34
3.1.2	Podocin interagiert mit GLEPP1.....	35
3.1.3	Die Kinasen Src und Fyn interagieren mit GLEPP1 und Nephrin.....	36
3.2	<i>GLEPP1 dephosphoryliert Src und Fyn Tyrosin 527</i>	38
3.2.1	Src Tyrosin 527.....	39
3.2.2	Fyn Tyrosin 527.....	40

3.3	<i>Einfluss von GLEPP1 auf Nephrin-Podocin bzw. Nephrin-β-arrestin 2 Interaktion..</i>	41
3.3.1	Nephrin-Podocin-Interaktion wird durch GLEPP1 verstärkt.....	41
3.3.2	Nephrin- β -arrestin2-Interaktion wird unter Glepp1 abgeschwächt	42
3.4	<i>GLEPP1 reduziert die Endozytose von Nephrin</i>	44
4	Diskussion.....	46
4.1	<i>Die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Studienlage und Schlussfolgerungen.....</i>	46
4.1.1	GLEPP1 Interaktionspartner	46
4.1.2	GLEPP1 aktiviert Src-Familien-Kinasen.....	47
4.1.3	GLEPP1 stärkt die Interaktion von Nephrin mit Podocin, schwächt die Interaktion von Nephrin mit β -arrestin2 und reduziert die Nephrin Endozytose	49
4.1.4	GLEPP1 und Proteinurie.....	50
4.2	<i>Stärken und Schwächen der Arbeit.....</i>	51
5	Literaturverzeichnis.....	52
6	Anhang.....	59
	Danksagung.....	

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Niere im Detail	3
Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Podozyten auf einer glomerulären Kapillare	4
Abb. 3: Die glomeruläre Schlitzmembran	6
Abb. 4: GLEPP1 interagiert intrazellulär mit Nephrin	35
Abb. 5: Der zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 AA 1197-1217 interagiert mit Podocin	36
Abb. 6: GLEPP1 interagiert zytoplasmatisch mit der Src-Kinase Src	37
Abb. 7: Die Src-Kinase Fyn interagiert mit dem zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1	38
Abb. 8: GLEPP1 führt zur Dephosphorylierung von Src am Tyrosin 527	39
Abb. 9: Dephosphorylierung von Fyn am Tyrosin 527 unter dem Einfluss von GLEPP1	39
Abb. 10: GLEPP1 verstärkt die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin	42
Abb. 11: GLEPP1 schwächt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2	43
Abb. 12: GLEPP1 reduziert die Endozytose von Nephrin	45
Abb. 13: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Src-Familien-Kinase durch eine Protein-Tyrosin-Phosphatase	47

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz der Proteinurie

Die Zahl nierenerkrankter Patienten steigt weltweit und stellt zunehmend eine medizinische und gesundheitsökonomische Herausforderung für die Gesellschaft dar. 10 bis 16% der Erwachsenenbevölkerung von Nordamerika, Europa, Asien und Australien sind von einer chronischen Nierenerkrankung betroffen [4-7]. 2001 lagen die Kosten für die Behandlung von Patienten mit renalen Erkrankungen im Endstadium (nierentransplantierte Patienten ausgenommen) weltweit bei 70 bis 75 Milliarden Dollar [8]. Hypertension und Diabetes mellitus stellen weltweit die Hauptursache für terminale Nierenerkrankungen dar [9]. Dies erklärt teilweise die steigenden Zahlen der Nierenerkrankungen, da auch eine deutliche Zunahme dieser beiden Krankheiten zu verzeichnen ist. Darüber hinaus stellen chronische Nierenerkrankungen einen unabhängigen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen und Ereignisse dar und sind somit für eine Steigerung der Morbidität und Mortalität in der Allgemeinbevölkerung durch kardiovaskuläre Erkrankungen mitverantwortlich [10, 11].

Die Ursachen für Nierenerkrankungen sind vielfältig, von den primären, hereditären Nephritiden bis zur diabetischen Nephropathie gibt es ein weites Spektrum der unterschiedlichsten Pathophysiologien. Sehr viele dieser Erkrankungen gehen mit einer Proteinurie einher oder werden erst durch das Auftreten einer Proteinurie diagnostiziert. Die Proteinurie zeigt hier wie ein Marker strukturelle renale Veränderungen an. Es ist erwiesen, dass eine Proteinurie selbst zu einem glomerulären Zellschaden führt und insbesondere die Apoptose von Podozyten induzieren kann [12]. Damit ist eine Proteinurie, unabhängig von ihrer Ursache, für eine Progredienz renaler Erkrankungen entscheidend verantwortlich [13-18]. Die Art und das Ausmaß der Proteinurie ist somit auch ein wichtiger Parameter für die Prognose und den Verlauf einer renalen Erkrankung [19].

Eine Proteinurie ist bei chronisch Nierenerkrankten mit weiteren Erkrankungen und Gesundheitsrisiken assoziiert. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass sie ein wichtiger Prädiktor für die Entwicklung eines Schlaganfalls ist [20]. Des Weiteren besteht eine enge Assoziation zwischen einer Proteinurie und kardiovaskulären Erkrankungen [10, 11]. Es wird an dieser Stelle deutlich, welche weitreichenden Konsequenzen und Relevanz die Proteinurie für die verschiedensten Erkrankungen und Risikoabwägungen hat. Auf Grund dessen gilt es, die Funktionsweisen des glomerulären Filters und die Pathomechanismen, die zu seiner Störung führen, möglichst genau zu erforschen und zu verstehen. Wenn genau geklärt ist, wie eine Proteinurie entsteht, bzw. welche Faktoren die glomeruläre Filterfunktion regulieren, die Integrität der Schlitzmembran stärken oder schwächen und mit beeinflussen,

dann ergeben sich hieraus auch neue therapeutische Ansatzmöglichkeiten. Diese neuen Therapien könnten die Entstehung, das Fortschreiten und den Verlauf von renalen Erkrankungen positiv beeinflussen, somit die Morbidität und Mortalität in der Gesellschaft senken und das Gesundheitssystem entlasten.

1.2 Der glomeruläre Filter

1.2.1 Die Niere

Die Niere ist eines der komplexesten Organe des menschlichen Körpers. Neben der Regulation des Kreislaufs und des Blutdrucks, der Steuerung endokriner Prozesse und der Blutbildung besteht ihre Hauptaufgabe in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen. Die Niere gliedert sich auf in die Nierenmark und die Nierenrinde (Abb. 1). Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, von dem sich ca. eine Millionen in einer Niere befinden. Die Nephrone filtern den Primärharn aus dem Blutplasma ab. Sie halten durch Rückresorption und Sezernierung von Elektrolyten, Harnstoff und Wasser den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers in Homöostase. Ein Nephron besteht aus dem Glomerulum und dem sich nach distal anschließenden Tubulussystem. Die Glomeruli befinden sich überwiegend in der Nierenrinde. Sie bestehen aus einem Gefäßknäuel, das von der Bowmannschen-Kapsel umgeben ist. Hier werden täglich ca. 180 Liter Primärharn abfiltriert. Der Primärharn ist fast eiweißfrei und wird im Tubulussystem großteilig rückresorbiert, so dass nur 1-1,5 Liter Sekundärharn täglich von der Niere ausgeschieden werden.

1.2.2 Die Filterbarriere

Der Primärharn ist ein Ultrafiltrat, das im Glomerulum abfiltriert wird. Die glomeruläre Filterbarriere ermöglicht es, Wasser und kleinen Plasmabestandteilen zu passieren. Albumin und größere Moleküle werden abfiltriert. Je nach Größe, Form und Ladung können die Moleküle die Filterbarriere passieren [21]. Die glomeruläre Filterbarriere setzt sich aus drei Schichten zusammen: Dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten.

Das Kapillarendothel ist großflächig gefenestert. Die gefenesterten Bereiche besitzen einen Durchmesser von ca. 60 nm. In den gefenesterten Bereichen befindet sich keine Membran,

die als Filter fungieren könnte [22]. Jedoch befindet sich auf der Oberfläche der glomerulären Endothelzellen eine Glykokalyx, die aus negativ geladenen Sialoproteinen und Proteoglykanen bestehen. Die Sialoproteine und Proteoglykane bedingen wahrscheinlich die Ladungsselektivität des Filters [23, 24].

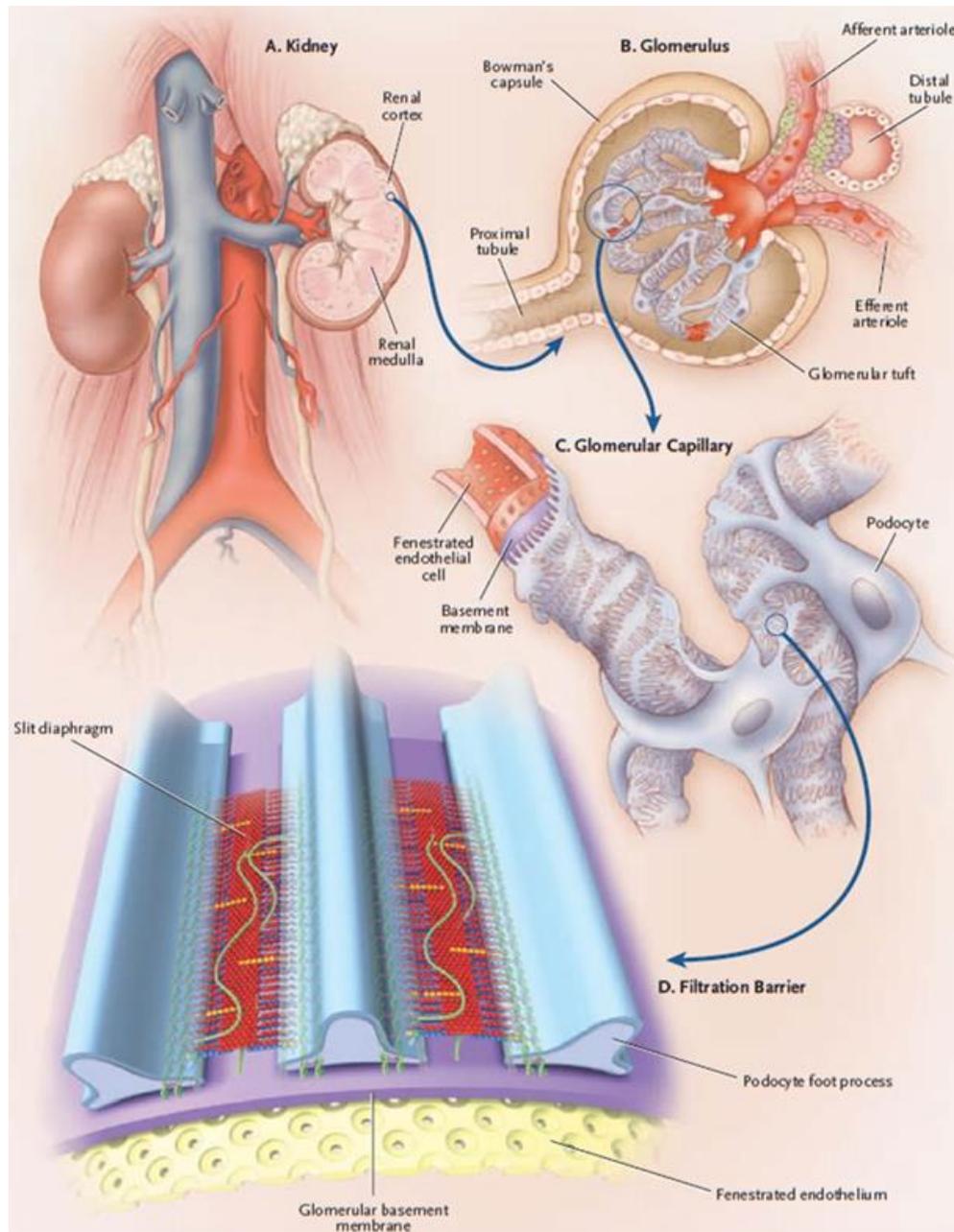


Abb. 1: Die Niere im Detail

A Paarig angelegte Niere im Saggittalschnitt; **B** seitlich eröffneter Glomerulus; **C** glomeruläre Kapillarschlinge mit ineinander verzahnten, aufgelagerten Podozyten; **D** dreischichtige Filterbarriere bestehend aus der Schlitzmembran, der glomerulären Basalmembran und dem fenestrierten Kapillarendothel. *Reproduced with permission from The New England Journal of Medicine 2006; 354: 1388, Copyright Massachusetts Medical Society [21]*

Die mittlere Schicht der Filterbarriere wird von der GBM gebildet. Die GBM ist 300-350 nm dick. Die azelluläre Matrix der GBM setzt sich aus Kollagen Typ IV, Proteoglykanen, Laminin und Nidogen zusammen [25]. Die quervernetzten Kollagenfasern vom Typ IV geben der Membran Stabilität, jedoch erfüllen sie wahrscheinlich keine Filterfunktion [26]. Trotz allem ist das Netzwerk aus Kollagen IV und Laminin äußerst wichtig für die Filterfunktion. Ein Defekt in der Laminin- β 2-Kette führt bereits in der Neonatalphase zu massiven Proteinurien bei Maus und Mensch [27, 28].

Die dritte Schicht der Filterbarriere bilden die Podozyten. Die Podozyten sind viszerale Epithelzellen des Glomerulums. Sie haben große Zellkörper und lang ausgezogene, zytoplasmatische Fußfortsätze. Die Fußfortsätze dieser Zellen umgeben das Gefäßknäuel des Glomerulums vollständig und sind ineinander verzahnt (Abb. 2). In dem schmalen Spalt zwischen den ineinandergreifenden Podozyten befindet sich der 40 nm breite Filtrationsschlitz, über dem sich die glomeruläre Schlitzmembran aufspannt [29].

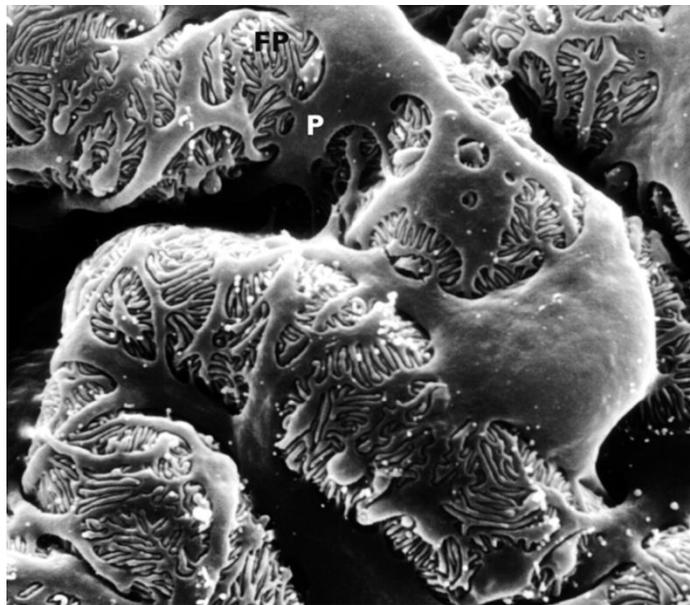


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Podozyten auf einer glomerulären Kapillare
Die Podozyten befinden sich mit ihren Zellkörpern (P) über den glomerulären Kapillaren. Sie bilden zunächst Primärfortsätze und teilen sich weiter in ineinander verzahnte Fußfortsätze (FP) auf. Die zytoplasmatischen Fußfortsätze umgeben das Gefäßknäuel vollständig. Zwischen den verzahnten Fußfortsätzen befindet sich der Filtrationsschlitz. Rattenniere, Vergrößerung $x \approx 6000$. Abbildung von: *Physiological Reviews* 2003; 83: 257 [29]

1.2.3 Die glomeruläre Schlitzmembran

Rodewald und Karnovsky entdeckten 1974 durch elektronenmikroskopische Analysen, dass die Schlitzmembran eine Reißverschlussartige Struktur besitzt [30]. Der molekulare Aufbau der Schlitzmembran blieb jedoch weitere Jahrzehnte ungeklärt, bis Kestial *et al.* 1998 das Protein Nephrin in der Schlitzmembran identifizierten [31]. Sie zeigten, dass eine Mutation im Gen NPHS1 die Ursache für das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (CNF) ist. Patienten mit CNF besitzen keine glomeruläre Schlitzmembran und entwickeln schon intrauterin eine massive Proteinurie. Das Gen NPHS1 kodiert Nephrin, ein Protein, das wesentlicher Bestandteil der glomerulären Schlitzmembran ist. Aufgrund dieser bahnbrechenden Entdeckung setzte sich ein neues Modell für den Aufbau der Schlitzmembran durch. Es wird davon ausgegangen, dass die Schlitzmembran durch Interaktionen von Nephrin-Molekülen benachbarter Podozyten Fußfortsätzen gebildet wird (Abb. 3) [32]. Das Modell beinhaltet die Vorstellung eines dynamisch regulierten glomerulären Filters, der auf Schädigungen und zelluläre Veränderungen kurzfristig reagiert und die Organisation des Zytoskeletts, Apoptose- und Endozytose-Prozesse reguliert. Dieses Modell wird dadurch bestätigt, dass in den vergangenen Jahren viele weitere regulierende Moleküle der glomerulären Schlitzmembran entdeckt wurden. Zu diesen gehören *Zonula Occludens 1* (ZO-1) [33], P-Cadherin [34], FAT1 [35], Nephrin [36, 37], Nephrin-2, Nephrin-3 [38], Podocin [39], β -arrestin2 [40] und *Glomerular Epithelial Protein 1* (GLEPP1) [41]. Für einige dieser Moleküle konnten schon wichtige Funktionen für den Aufbau und die Regulation der Schlitzmembran gezeigt werden, für andere gilt es noch zu zeigen, wo ihre Bedeutung und Funktion für die glomeruläre Filterfunktion liegt.

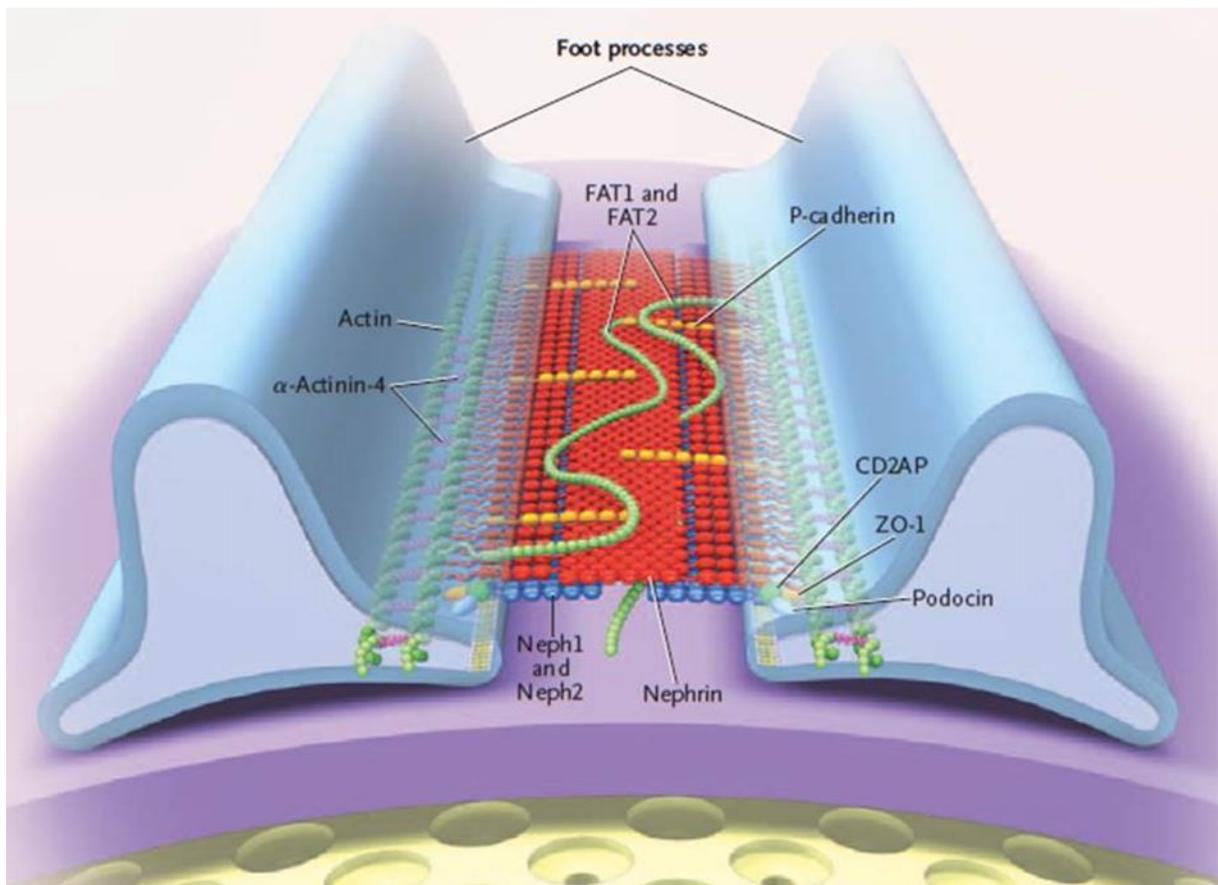


Abb. 3: Die glomeruläre Schlitzmembran

Überlappende Nephrin-Moleküle (rot) von gegenüberliegenden Podozyten bilden zusammen mit Neph1- und Neph2-Molekülen (blau) eine reißverschlussartige Membran. An den Multiproteinkomplexen, die die Schlitzmembran bilden, sind weitere Moleküle wie unter anderem Podocin, P-Cadherin, *Zonula Occludens 1* (ZO-1), CD2 assoziiertes Protein (CD2AP) beteiligt. *Reproduced with permission from The New England Journal of Medicine 2006; 354: 1394, Copyright Massachusetts Medical Society [21]*

1.3 Nephrin

Nephrin ist ein transmembranäres 185-200 kDa schweres Protein und gehört zur Ig-Superfamilie. Es besitzt eine kurze intrazelluläre Domäne und eine extrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne besteht aus acht distal gelegenen IgG-artigen Motiven und einer proximalen Fibronectin-Typ-III-artigen Domäne [32]. Die extrazellulären Nephrin-Domänen von gegenüberliegenden Podozyten binden in homodimerisierender Weise aneinander und bilden so eine reißverschlussartige Membran [37]. Hochauflösende elektrotomographische Analysen zeigten, dass die Nephrin-Moleküle sich in der Mitte des Filtrationsschlitzes überlappend aneinander anlagern und so eine Membran bilden. An den Seiten der Nephrin-Verdichtungen besitzt diese Membran Poren, die der Größe von Albumin oder kleiner entsprechen [42]. Nephrin-Moleküle bilden zusammen mit weiteren Transmembranproteinen

(Neph1 und Neph2) die glomeruläre Schlitzmembran und sind somit unverzichtbare strukturelle Komponenten der Filterbarriere. Die Bedeutung von Nephrin geht weit über die Funktion als „Bauelement“ der Schlitzmembran hinaus. Nephrin erfüllt nicht nur strukturelle Funktionen, sondern spielt eine entscheidende Rolle in der zellulären Signalübertragung im Podozyten.

Nephrin ist wichtig für die podozytären Zell-Zell-Kontakte. Die Schlitzmembran ist der einzige Zell-Zell-Kontakt vom Podozyten. Nephrin ist eine Komponente des Multiproteinkomplexes, der aus Zelladhäsions-Rezeptoren und zytosolischen Gerüst-Proteinen besteht. Die Gerüst-Proteine vernetzen den Komplex zum Aktinzytoskelett und dem Signalübertragungsnetzwerk der Zelle. Der Multiprotein-Komplex wird von Nephrin, Cadherin, p120 Catenin und den junctionalen Gerüst-Proteinen *Zonula Occludens 1* (ZO-1), CD2 assoziiertes Protein (CD2AP) und der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Serin Protein Kinase (CASK) gebildet [43]. Die Schlitzmembran, die unter anderem durch Nephrin gebildet wird, ähnelt somit einer modifizierten *Adherens Junction* [44]. Diese Zellkontakte bedingen strukturelle Zellprozesse, die unverzichtbar für das zelluläre Überleben sind.

Wie oben bereits angedeutet spielt Nephrin eine bedeutsame Rolle bei der Organisation des podozytären Zytoskeletts. Die Adaptermoleküle ZO-1 und CD2AP verbinden den zytoplasmatischen Abschnitt der Schlitzmembran-Proteine mit dem Aktinzytoskelett [45, 46]. Auch für das Gerüst-Protein CASK wurde eine Interaktion mit Nephrin gezeigt [43]. Es wird vermutet, dass CASK den Nephrin-Cadherin-Protein-Komplex stabilisiert und diesen Multiproteinkomplex mit dem Aktinzytoskelett verbindet. Die Injektion von Antiserum gegen die extrazelluläre Domäne von Nephrin und Neph1 führte schnell zu einer Desorganisation des Aktinzytoskeletts und Auslöschung der podozytären Fußfortsätze [47, 48]. Dies verdeutlicht die Relevanz von Nephrin für die Aufrechterhaltung der zytoskelettalen Architektur im Podozyten.

1.3.1 Regulierung der Nephrin-Signaltransduktion an der Schlitzmembran

Es wurden bereits die vielseitigen Aufgaben und Funktionen von Nephrin diskutiert. Nun stellt sich die Frage, wie die Signaltansduktion durch Nephrin an der Schlitzmembran reguliert wird. Es ist bekannt, dass Tyrosinphosphorylierung des zytoplasmatischen Abschnitts von Nephrin die Signaltransduktion in den Podozyten induziert [49]. Der intrazelluläre Abschnitt von Nephrin besitzt drei potentielle Phosphorylierungsstellen für die Src-Familien-Kinasen [50]. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Nephrin kann experimentell

durch das Binden von Antikörpern gegen den extrazellulären Abschnitt von Nephrin ausgelöst werden. Diese Antikörper simulieren das Zusammenlagern von Nephrin-Molekülen im glomerulären Filterschlitz [51]. Verma *et al.* konnten zeigen, dass die Src-Kinase Fyn Nephrin am C-Terminus phosphoryliert [52]. Liegt der C-Terminus von Nephrin phosphoryliert vor, kann das Ankerprotein Podocin an diesen binden und Nephrin wird in der Schlitzmembran stabilisiert. Quack *et al.* zeigten, dass Nephrin im dephosphorylierten Zustand durch β -arrestin2 gebunden und internalisiert wird. Das Binden von Podocin und β -arrestin2 wird vom Phosphorylierungsstatus Nephrins Tyrosin 1193 invers reguliert. Podocin und β -arrestin2 stellen somit direkte Gegenspieler in der Regulation von Nephrin dar.

1.3.2 Podocin

Die Entschlüsselung der Genmutation NPHS2 führte zur Entdeckung von Podocin. Das NPHS2 Gen kodiert Podocin. Bei Mutation von NPHS2 kommt es zum frühkindlichen Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom mit fokal segmentaler Glomerulosklerose und rasch fortschreitender Niereninsuffizienz [39]. Podocin ist in der Schlitzmembran lokalisiert. Dieses Haarnadel-förmige 42 kDa große Protein der Stomatinprotein-Familie zeigt mit beiden Enden in den intrazellulären Raum [39]. Es wurde gezeigt, dass Podocin zu den sogenannten „*Lipid-Raft*-assoziierten“ Proteinen der Schlitzmembran gehört [53]. In den *Lipid-Rafts* reichern sich Signaltransduktionskomponenten in der Plasmamembran an. Podocin führt zur Rekrutierung von Nephrin in die *Lipid-Rafts* und verstärkt so die Nephrin-vermittelte Signaltransduktion im Podozyten [54, 55]. Die C-terminale Domäne von Podocin kann den zytoplasmatischen Abschnitt von Nephrin binden. Diese Nephrin-Podocin-Interaktion erleichtert das Nephrin-*Signaling*. Es wurde gezeigt, dass Nephrin vor allem im phosphorylierten Zustand von Podocin gebunden wird [56].

1.3.3 β -arrestin2

β -arrestine sind ubiquitär vorkommende multifunktionelle Adaptermoleküle, die in vielfältiger Weise transmembranäre Rezeptoren regulieren. β -arrestin2 wird in fast allen Geweben des Menschen exprimiert [40]. Es gehört zu einer Gruppe von Proteinen, welche die Internalisierung von Membranrezeptoren vermitteln. Es dient als Adapter-Molekül, das Rezeptor und Endozytose-Maschinerie miteinander verbindet [57, 58]. β -arrestin2 interagiert auch mit Nephrin und vermittelt so dessen Endozytose. Liegt Nephrin am Tyrosin 1193 dephosphoryliert vor, kann β -arrestin2 binden und die Endozytose von Nephrin induzieren.

Nephrin wird internalisiert und die Nephrin abhängige Signaltransduktion an der glomerulären Schlitzmembran nimmt ab [56].

1.3.4 Src-Familien-Kinasen

Die Src-Familien-Kinasen (SFK) gehören zu der großen Familie der *Non*-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Sie haben die Eigenschaft ihr Substrat zu phosphorylieren. Die SFKs befinden sich in *lipid rafts* in der Zellmembran und beteiligen sich an Signaltransduktionswegen der Zelle [59, 60]. Sie sind 52-62 kDa groß und bestehen aus sechs abgegrenzten funktionellen Einheiten: Der SH4-Domäne, der unique-Domäne, die für alle Mitglieder einzigartig ist, der SH3-Domäne, der SH2-Domäne, der katalytischen Domäne und dem kurzen negativ regulatorischen Schwanz. Liegt ein bestimmtes Tyrosin (Y527) in dem C-terminalen Anteil phosphoryliert vor, dann befindet sich die SFK in einem inaktiven Zustand. Hierbei kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der die intrinsische SH2-Domäne das phosphorylierte C-terminale Ende bindet. Dies verhindert die Aktivierung der katalytischen Domäne der SFK und das Substrat der SFK kann nicht binden. Die SFK wird aktiviert, wenn eine Protein-Phosphatase das Y527 am C-Terminus der SFK dephosphoryliert [61]. Es ist bekannt, dass die SFKs Fyn und Src an der Tyrosinphosphorylierung von verschiedenen signalübertragenden Proteinen der Ig-Superfamilie beteiligt sind und eine wichtige Rolle für Zell-Adhäsionen spielen [61-63].

Zu den SFK zählen unter anderem Fyn, Src, Lyn und Yes. Diese vier ubiquitär vorkommenden SFK werden auch im Podozyten exprimiert. Alle vier induzieren eine Nephrin Phosphorylierung. Die stärkste Phosphorylierung zeigte sich bei der Co-Expression von Src oder Fyn mit Nephrin [51]. Verma *et al.* zeigten 2003, dass Fyn Nephrin mit seiner SH3-Domäne direkt bindet und phosphoryliert [52]. Darauf folgend wurde 2004 von Li *et al.* die zytoplasmatische Domäne von Nephrin als Substrat von Fyn identifiziert. Sie zeigten, dass Fyn Nephrin phosphoryliert und diese Tyrosinphosphorylierung die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin moduliert [50]. Fyn ist absolut notwendig für die Entwicklung und die Erhaltung von morphologisch normalen Fußfortsätzen. *Fyn-Knock-Out*-Mäuse (*Fyn* *-/-*) zeigen eine Auslöschung der podozytären Fußfortsätze und entwickelten eine signifikante Proteinurie [64]. Das gleiche Bild zeigte sich bei *Fyn* *-/-* *Yes* *-/-* doppel *Knock-Out*-Mäusen. Zusätzlich wiesen diese Mäuse eine merkliche Reduzierung der Nephrin Phosphorylierung auf [52].

Die SFKs stellen durch ihre Phosphorylierungseigenschaften einen wichtigen Baustein in der Regulation und der Erhaltung der Integrität des glomerulären Filters dar. Durch Tyrosinphosphorylierung haben sie einen bedeutsamen Einfluss auf die Stabilität von Nephrin in der Schlitzmembran. Ihre Aktivität wiederum hängt vom eigenen Phosphorylierungszustand ab. Es wird eine Protein-Phosphatase benötigt, um die SFKs am Tyrosin 527 zu dephosphorylieren und zu aktivieren. Es gilt zu klären, welche Phosphatase die SFKs der glomerulären Schlitzmembran durch Dephosphorylierung reguliert und somit eine wichtige Rolle in den molekularen Regulationsprozessen des Nierenfilters einnimmt.

1.4 GLEPP1

1.4.1 Die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase

Auf der Suche nach Glomerulum spezifischen Proteinen entdeckten Thomas *et al.* 1994 die Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase *Glomerular Epithelial Protein 1*, kurz GLEPP1 (PTPRO) [41]. GLEPP1 ist hochkonserviert in Kaninchen, Ratten, Mäusen und Menschen. Das GLEPP1 kodierende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 12 [65]. Dieses transmembranäre Protein gehört zu den Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTP) des Subtyp R3 [66]. Bisher sind fünf *spiced* Isoformen von GLEPP1 bekannt [67]. Drei verkürzte Isoformen, denen die extrazelluläre Domäne fehlt, werden in B-Zellen [68], Makrophagen [69] und Osteoklasten [70] exprimiert. Die zwei anderen transmembranären Isoformen werden im hochpolarisierten Zellen des Gehirns [67, 71] und der Niere [3, 72] exprimiert. In der Niere wird GLEPP1 spezifisch in den Podozyten des renalen Glomerulum exprimiert [41]. Hier befindet es sich am apikalen Pol des Podozyten-Fußfortsatzes [41]. Es ist wie die RPTPs vom Subtyp R3 typisch aufgebaut. Es besitzt eine große extrazelluläre Domäne, bestehend aus acht Fibronectin-Typ-III Wiederholungen, einen hydrophoben transmembranären Abschnitt und eine einzelne zytoplasmatische Phosphatase Domäne [41]. Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) binden und dephosphorylieren ihr Substrat. Dadurch erfüllen sie verschiedenste wichtige Funktionen in der Regulation zellulärer Prozesse wie Zell Proliferation, Differenzierung und Migration [73]. Ein wichtiger Regulationsweg läuft über die Aktivierung der SFKs. Diese werden durch Dephosphorylierung an ihrem C-terminal gelegenen Tyrosin 527 aktiviert. Für die RPTPs *Density-Enhanced Phosphatase 1* (DEP-1) [74] und der vaskulären endothelialen Protein-Tyrosine-Phosphatase (VE-PTP), die wie GLEPP1 zum Subtyp R3 gehören, konnte diese regulatorische Funktion bereits gezeigt werden [75, 76]. Es ist anzunehmen, dass GLEPP1 über den selben Signaltransduktionsweg wie die anderen R3 RPTPs regulatorische

Aufgaben im Podozyten erfüllt. Bisher wurde dies jedoch noch nicht gezeigt. Es gilt zu klären, ob die SFKs Fyn und Src Substrate von GLEPP1 sind.

1.4.2 GLEPP1 in Mäusen und Ratten

GLEPP1 wird hoch konserviert in Kaninchen, Ratten, Mäusen und Menschen exprimiert [65]. Wharram *et al.* untersuchten im Jahr 2000 GLEPP1-*Knock-Out*-Mäuse. Die Podozyten dieser Mäuse wiesen eine verplumpte, mehr amöboide als normal oktopoide Zellmorphologie auf. Die Fußfortsätze waren kürzer und breiter als normal. Die Mäuse hatten eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und entwickelten einen Hypertonus nach Uninephrektomie. Eine Proteinurie entwickelten sie nicht [72].

Charba *et al.* untersuchten den Effekt von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von GLEPP1 auf die Albuminpermeabilität des glomerulären Filters. Hierfür verwendeten sie isolierte Kaninchen und Ratten Glomeruli. Die Interaktion der Antikörper mit der extrazellulären Domäne von GLEPP1 erhöhte die glomeruläre makromolekulare Permeabilität und führte zu einer Abnahme der Phosphatase Aktivität von GLEPP1. Charba *et al.* vermuten, dass eine tonische Phosphatase-Aktivität benötigt wird, um die normale Charakteristik der glomerulären Filterbarriere aufrecht zu erhalten [77].

1.4.3 GLEPP1 im Menschen, renale Funktion

Klinische Studien lassen den Schluss zu, dass GLEPP1 sowohl bei angeborenen Erkrankungen, bei denen eine Mutation im GLEPP1 Gen vorliegt, als auch bei erworbenen Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle spielt und somit hochrelevant für die physiologische Funktion der menschlichen Niere ist.

In einer kürzlich publizierten Studie beschreiben Ozaltin *et al.* zwei konsanguine türkische Familien mit einem nephrotischen Syndrom im Kindesalter, bei denen die typischen Mutationen (z.B. Podocin) ausgeschlossen werden konnten [78]. Bei beiden Familien konnte je eine Mutation im GLEPP1 Gen identifiziert werden. Dies führte bei einer Familie zum kompletten Verlust von GLEPP1, bei der zweiten Familie zum Verlust eines Exons, dessen Funktion bisher unklar ist. Bioptisch wiesen aus beiden Familien je ein Kind eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) und eine *Minimal Change Disease* (MCD) auf.

Diese Fälle lassen vermuten, dass GLEPP1 auch im Menschen wichtig für die Filterfunktion der Schlitzmembran ist und Mutationen im GLEPP1 Gen zu drastischen Störungen der glomerulären Filterfunktion führen können.

Des Weiterem wird GLEPP1 seit Jahren als Marker für eine glomeruläre Schädigung bei erworbenen Nierenerkrankungen mit Proteinurie angesehen. Die Expression von GLEPP1 ist bei Erkrankungen wie Ig-A Nephropathie, MCD etc. deutlich reduziert [1, 2]. Dabei ist der Verlust der GLEPP1 Expression größer als der Verlust von Podozyten, so dass der Verlust von GLEPP1 nicht durch einen Verlust von Podozyten zu erklären ist. Die reduzierte Expression von GLEPP1 korreliert mit dem klinischen und pathologischen Ausprägungsgrad der Ig-A Nephropathie [2]. Delville *et al.* identifizierten 2014 Auto-Antikörper in Blutseren von Patienten mit rezurrenter FSGS [79]. Diese Antikörper ermöglichen eine Vorhersage über das erneue Auftreten einer FSGS nach Nierentransplantation. Zu den sieben identifizierten Auto-Antikörpern gehörte auch ein Antikörper gegen GLEPP1. Es deutet vieles darauf hin, dass die physiologischen Funktionen von GLEPP1 wichtig für das Verständnis des Pathomechanismus von erworbenen und angeborenen Nierenerkrankungen sind.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionsweisen der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatase (RPTP) GLEPP1 im Podozyten genauer zu erforschen. Die Funktionsweisen und die Regulationsmechanismen des renalen Filters sind noch nicht vollständig verstanden. Und auch beim Verständnis der Entstehung von renalen Erkrankungen, die mit einer Proteinurie einhergehen, gilt es noch, große Lücken zu schließen und unbekannte Faktoren zu identifizieren. GLEPP1 ist einer dieser wenig erforschten und verstandenen Proteine des glomerulären Filters. Durch die experimentelle Untersuchung von GLEPP1 sollte somit ein weiterer Baustein für ein detailliertes Verständnis über Funktionsweisen des menschlichen Nierenfilters und die Entstehung einer Proteinurie und deren Pathomechanismen geliefert werden. Um dies zu erreichen, wurden Experimente im Zellmodell durchgeführt. Ziel der Experimente war es:

- Interaktionspartner von GLEPP1 zu identifizieren.
- Die Rolle von GLEPP1 im Zusammenhang mit den Src-Familien-Kinasen zu definieren.
- Zu untersuchen, ob GLEPP1 die Nephrin-Podocin-/ Nephrin- β -arrestin2-Interaktionen beeinflusst.

-
- Den Einfluss von GLEPP1 auf die Nephrin Endozytose zu untersuchen.
 - Die Bedeutung von GLEPP1 für das Auftreten einer Proteinurie und für die Integrität des renalen Filters genauer zu beleuchten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

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

HEK 293T Zellen (*Human Embryonic Kidney*)

FBS Superior (Fetale Bowine Serum) Biochrom AG, Berlin, Deutschland

PBS Dulbecco (*Phosphate Buffered Saline*) w/o Ca⁺⁺, w/o Mg⁺⁺, *low endotoxin* Biochrom AG, Berlin, Deutschland

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

2.1.2 Transfektion

0,25 M Kalziumchlorid-Dihydrat p.A. Merck, Darmstadt, Deutschland

2x HEBS pH 7,05, sterilfiltriert 49,8 mM HEPES, 280,6 mM NaCl, 1,47 mM Na₂HPO₄ wasserfrei

2.1.3 Plasmide

cdm8

cdm.F.Podocin

cdm.F.β-arrestin2

cdm.Nephrin F. WT

cdm.slg

cdm.slg.GLEPP1 cyt

cdm.slg.GLEPP1 cyt T4

cdm.slg.GLEPP1 cyt T5

cdm.slg.Nephrin cyt

pcDNA3.V5.GLEPP1 cyt

pRK5c Fyn-WT

Src-WT

V-Src

2.1.4 Transformation und Amplifikation

Ampicillin.Na ⁺ -Salt	Serva <i>Electrophoresis</i> GmbH, Heidelberg, Deutschland
E. coli MC1061 mit/ oder ohne P3 Plasmid	
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
LB (Luria Bertani) Agar <i>Powder</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tetracyclin Hydrochloride Minimum 95% (TLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>Ampicillin-Stammlösung:</u>	10 mg Ampicillin/1 ml ddH ₂ O
<u>Kanamycin-Stammlösung:</u>	50 µg Kanamycin/1 ml ddH ₂ O
<u>Tetracyclin-Stammlösung:</u>	1 mg Tetracyclin/1ml ddH ₂ O + 50 ml Ethanol
<u>LB-Agar Platten:</u>	8,75 g LB-Agar Powder auf 250 ml ddH ₂ O mit 150 µl 5 M NaOH autoklavieren, im Wasserbad auf ca. 60°C herunterkühlen. Anschließend Zugabe von Antibiotika entsprechend der Resistenzen im Verhältnis: Tetracyclin : 1 mg/ml ; Ampicillin : 10 mg/ml

 2.1.5 Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation

LB-Broth-Base	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Qiagen® Plasmid <i>Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<u>LB-Broth-Base Medium mit Ampicillin:</u>	1 ml Ampicillin-Stammlösung/100 ml LB-Medium (autoklaviert); Endkonzentration: 100 µg/ml
<u>LB-Broth-Base Medium mit Ampicillin/Tetracyclin:</u>	250 µl Ampicillin-Stammlösung und 750 µl Tetracyclin-Stammlösung/100 ml LB-Medium (autoklaviert); Endkonzentrationen: Amp. 25 µg/ml, Tet. 7,5 µg/ml

2.1.6 DNA Restriktion und Gelelektrophorese

10x Enzym Puffer Konzentrat 1-4	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
100 bp DNA- <i>Ladder</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Agarose NEEO Ultra Qualität Roti®garose, für DNA/RNA Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 100%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium Bromidlösung 0,025 % i.d. Tropfflasche, wässrige Lösung, 250 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

(EDTA) pH 8,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Lambda DNA-BstE II Digest, 500 µg/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<u>1x TAE Puffer:</u>	0,04 M Tris Base, 0,02 M Essigsäure, 0,5 M EDTA pH 8,0
<u>1 % Agarosegel:</u>	1 g Agarose auf 100 ml 1x TAE, 4 Tropfen Ethidium Bromidlösung 0,025 %
2.1.7 Zellernte	
2-Propanol, 100 %	VWR International S.A.S, Fontenaysous Bois, Frankreich
Complete Mini	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchloride (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

<i>Sodium Chloride Molecular Biology Grade</i> (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Sodium Orthovanadate</i>	ICN Biomedicals INC., Aurora, Ohio, USA
Tris HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton X-100, 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>PBS:</u>	136,8 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 4,28 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,46 mM KH ₂ PO ₄
<u>PMSF-Stocklösung:</u>	10 mM PMSF in 100 % 2-Propanol
<u>2x Lysispuffer:</u>	40 mM Tris HCl pH 7,5 , 2 mM EDTA pH 8,0, 300 mM KCl
<u>IP-Puffer:</u>	1 % Triton-Lysis Puffer, Ansatz für 50 ml: 1 Tablette Complete Mini, 5 ml 10 % Triton X- 100, 500 µl <i>Sodium Orthovanadate</i> , 25 ml 2 x Lysispuffer, 19,5 ml ddH ₂ O , 220 µl PMSF- Stocklösung

2.1.8 Immunopräzipitation

1,4 Dithiothreitol (DTT)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
--------------------------	-----------------------------------

Anti-FLAG M2 <i>Affinity</i> Gel	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Bovine Serum Albumin <i>Heat Shock Protease Free Powder</i> (BSA) pH 7,0	VWR International Ltd., Leics, England
Bromphenol Blau	Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Schweden
Gamma Bind™ Plus Sepharose in 20 % Ethanol	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Tween 20 <i>Polysorbate</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<u>Reduzierender Proteinpuffer nach Lämmli (2x Lämmli):</u>	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,2% Bromphenol blau, 1 M NaCO ₃ , 100 mM DDT
<u>1x Proteinwaschpuffer:</u>	170 ml 1 M Tris HCl pH 7,5, 340 ml 5 M NaCl, 17 ml Tween 20
<u>BSA in Proteinwaschpuffer:</u>	5 % BSA in Proteinwaschpuffer

2.1.9 SDS-Gelelektrophorese

Ammoniumperoxodisulphate (APS), 10%	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
-------------------------------------	---

Ethanol, 99,9 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protein-Marker	
Rotiphorese Gel® 30 (30 % Acrylamid/ Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Temed 99% p.A. für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Pufferan (= Tris Base) ≥ 99,9 % p.A.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>Trenngelpuffer, pH 8,8:</u>	360 mM Trizma Hydrochlorid, 1140 mM Tris Base ≥ 99,9 % p.A., 14 mM SDS
<u>Sammelgelpuffer, pH 6,9:</u>	484 mM Trizma Hydrochlorid, 16 mM Tris Base, 14 mM SDS
<u>Polyacrylamidgelzusammensetzung :</u>	
• Trenngel, 10% für 2 Gele :	3 ml Rotiphorese, 1,5 ml ddH ₂ O; 4,5 ml Trenngelpuffer; 90 µl APS; 15 µl Temed
• Sammelgel, 10 % für 2 Gele :	0,535 ml Rotiphorese; 1,135 ml ddH ₂ O; 1,665 ml Sammelgelpuffer; 40 µl 10% APS; 5 µl Temed

1x Laufpuffer: 191,8 mM Glycin p.A., 3,46 mM SDS, 23,93 mM Tris Base

2.1.10 Western Blot

Glycin p.A. AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Methanol p.A. AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Nitrocellulose Transfer Membran Protran Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

1x Transferpuffer: 383,6 mM Glycin p.A.; 49,52 mM Tris Base; 20 % Methanol p.A.

2.1.11 Immunofärbung – Antikörper

Primärantikörper:

Anti-Src 1:500 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

Anti-V5 *Antibody* Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Fyn *Antibody* (15) Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Monoclonal Anti-FLAG® M2 1:400 Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Phospho-Src (Tyr527) *Antibody* 1:100 Cell Singnaling Technology, Danvers, USA

Streptavidin-HRP 1:500

Thermo Fisher Scientific, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA

Sekundärantikörper:

Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP 1:10000
Dako, Glostrup, Dänemark

Anti-Rabbit 1:10000

2.1.12 Chemilumineszenz

Luminol Fluka, 250mM in DMSO

Fluka Bio Chemika, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

P-Coumaric Acid, 90 mM in DMSO

Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂) Rotipuran®
p.a., stabilisiert

Carl Roth GmbH + CoKG, Karlsruhe, Deutschland

Elektrochemilumineszenz (ECL):

- Lösung A:
100 mM Tris Base pH 8,5, ddH₂O, 0,4 mM Coumarin, 2,5 mM Luminol
- Lösung B:
100 mM Tris Base pH 8,5, ddH₂O, 1,5% H₂O₂

2.1.13 Endozytoseassay mittels Biotinmarkierung

Kalziumchloriddihydrat (CaCl ₂) Approx. 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EZ-Link® (Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)Hexanoate)	Sulfo-NHS-LC-Biotin Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<u>PBS for Biotin Labeling (PBS+ Ca²⁺/Mg²⁺), pH 8,0:</u>	0,1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgCl ₂ , 136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
<u>PBS for Biotin byproducts remove, pH 8,0 (Waschlösung):</u>	500 ml werden aus der Flasche mit PBS for Biotin Labeling entnommen und mit 100 mM Glycin versetzt.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivierung der Zelllinie HEK 293T

Für die durchgeführten Versuche wurden *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T Zellen verwendet. Die Zellen wurden in 10 cm Schalen mit 10 ml Nährmedium (DMEM-Medium + 10% fetalem Kälberserum) bei 37 °C und einem CO₂ Gehalt von 5% im Brutschrank kultiviert. Ca. alle 48 Stunden wurden die HEK 293T Zellen unter den sterilen Bedingungen der Sterilbank im Verhältnis 1:3-1:8 subkultiviert. Für die Subkultivierung wurde das Nährmedium mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und das PBS sofort wieder abgesaugt. Um die Zellen von der Schale zu lösen, wurde 1 ml Trypsin in die Mitte der Schale gegeben und diese für 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von frischem DMEM-Medium nach 5 Minuten gestoppt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des DMEM-Mediums, ließen sich die Zellen von der Schale ablösen und vereinzeln. 1 ml dieser Zellsuspension wurde auf eine weitere 10 cm Schale überführt. Um eine optimale Verteilung zu erreichen, wurde die Zell-Mediumsuspension ausgiebig gemischt.

2.2.2 Aussaat der Zellen für die Transfektion

Um eine hohe Transfektions-Effizienz zu erreichen, sollten die Zellen vereinzelt in der Schale liegen. Die Zellen für die Transfektion wurden ca. 12 Stunden vor der Transfektion gesplittet und in neue 10 cm Schalen ausgesät (siehe 2.2.1). Anders als bei der Subkultivierung wurde daher hierfür eine höhere Verdünnung (1:9-1:14) gewählt.

2.2.3 Transfektion

Die Transfektion der HEK 293T Zellen wurde nach der Kalziumphosphat-Methode durchgeführt [80]. Es wurden von jedem zu transfizierenden DNA-Konstrukt (in Form von Plasmid-DNA) 5-10 µg in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert (pro Datenpunkt zwei Ansätze), so dass von jedem Datenpunkt zwei 10 cm Schalen mit HEK 293T Zellen transfiziert werden konnten. Unter der Sterilbank wurde zu jedem Eppendorf-Gefäß 500 µl Kalziumchlorid 0,25 M pipettiert und anschließend unter Vortexen tropfweise 500 µl HEBs dazu gegeben. Diese Transfektionslösung wurde tropfenweise auf einer 10 cm Schale der vorbereiteten HEK 293T Zellen verteilt. Unter dem Mikroskop wurde die Bildung von DNA-Kalziumphosphat-Kristallen

überprüft. Die DNA-Kalziumphosphat-Kristalle haften der Zellmembran an und werden durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen [81]. Auf diese Weise gelangt die zu transfizierende DNA in die Zelle.

Die transfizierten und beschrifteten 10 cm Schalen wurden vorsichtig in den Brutschrank gebracht und dort bei 37 °C und 5% CO₂ für 6-8 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Transfektion durch Wechseln des Nährmediums gestoppt. Die Zellen wurden über Nacht zur Protein-Expression in dem Brutschrank unter bereits erwähnten Bedingungen bebrütet.

2.3 Proteinaufbereitung und Isolierung

2.3.1 Ernte von HEK 293T Zellen

Zur Ernte der HEK 293T Zellen wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit kaltem PBS durch Auf- und Abpipettieren vom Schalenboden abgelöst. Die in 10 ml PBS aufgenommenen Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und anschließend für 5 Minuten bei 4 °C bei 1500 rpm zentrifugiert. Das PBS wurde, bis auf einen kleinen Überstand über dem Zellpellet, nach der Zentrifugierung mit der Vakuumpumpe abgesaugt und der restliche Überstand abpipettiert. Die Zellpellets wurden, der Zellpellet-Größe entsprechend, in 200-500 µl 1%- Triton-Lysispuffer (+ 4,4 µl PMSF-Proteaseinhibitor pro 1 ml Lysispuffer) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Es folgte die Zelllyse für 15 Minuten auf Eis, gefolgt von einer Zentrifugierung für 15 Minuten bei 4 °C bei 14000 rpm. Die Überstände wurden für die Lysate-Herstellung und die Co-Immunopräzipitation in weitere 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt.

2.3.2 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) dient dem Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen. Hierbei wird aus Zelllysaten ein Protein mittels Antikörper oder *Tag* immobilisiert und im *Western Blot* der Nachweis des Bindungspartners geführt.

In der vorgelegten Arbeit wurde ein Fusionsprotein mit einem *slg-Tag* oder mit einem *FLAG-Tag* verwendet (siehe Punkt 2.1.3.). Das *slg-Epitop* enthält eine Immunglobulin-Domäne, die durch Protein-G-Sepharose immobilisiert wird. Der *FLAG-Tag* wird hingegen durch *M2-Beads* immunopräzipitiert. Alle Bindungspartner, die mit dem jeweiligen Fusionsprotein

interagieren, werden ebenfalls immunopräzipitiert und können mittels *Western Blot* dargestellt werden.

Nach der Transfektion und Zellernte wurden 10 % des entstandenen Überstands für die Lysate-Herstellung in ein weiteres 1,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert und 1:1 mit 2x Laemmli + Dithiotreithol (DTT) versetzt. Die Proben wurden im Thermomixer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis gelagert. Für die Co-IP wurden die restlichen 90 % des Überstandes verwendet. In jede Probe wurden 30 µl Protein-G-Sepharose pipettiert und 2 Stunden bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu entfernen, wurden die IP Proben dreimal gewaschen. Hierfür wurden die Proben 3 Minuten bei 4 °C bei 3000 rpm zentrifugiert, der Lysispuffer über dem entstandenen Pellet abpipettiert und verworfen. Die Zentrifugierungs- und Wasch-Schritte wurden drei Mal wiederholt. Beim letzten Zentrifugierungs-Durchlauf wurden die Proben 1 Minute bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und jeder Probe 30 µl 2x Laemmli + DTT zugesetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben 5 Minuten bei 95 °C auf dem Thermomixer erhitzt und 30 Sekunden bei 1000 rpm zentrifugiert. Bis zum Auftragen der Proben auf ein Elektrophorese-Gel wurden die Proben auf Eis gelagert.

2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Um die in den Proben vorhandenen Proteine zu identifizieren, müssen diese ihrer Größe nach und unabhängig von ihrer Ladung aufgetrennt werden. Die SDS-Polyacrylgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht diese Auftrennung. Durch die Erhitzung der Proben und das Zusetzen von 2x Laemmli + DTT werden die Proteine entfaltet und Disulfidbrücken gespalten. Das in 2x Laemmli enthaltene Natriumdodecylphosphat (SDS) bindet an die denaturierten Proteine und sorgt so für eine negative Gesamtladung der Proteine. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung an das Elektrophorese-Gel wandern die nun negativ geladenen Proteine durch das Gel in Richtung der Anode. Auf Grund der Zusammensetzung des Gels durchwandern die kleineren Proteine das Gel schneller als die größeren, so dass die Proteine nach ihrer Größe geordnet aufgetrennt werden.

Zur Durchführung der SDS-PAGE wurden ein zuvor zwischen zwei Glasplatten gegossenes 10%-Polyacrylamid-Gel (Zusammensetzung siehe Material) in das Gelelektrophorese-Gerät eingehängt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Es wurden 10-15 µl der Lysate- und Co-IP-Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurden 10 µl Proteinmarker zur

späteren Bestimmung der Protein Größe geladen. Die SDS-PAGE wurde gestartet und die Proteine wanderten für 30 Minuten bei einer Spannung von 70 Volt im Sammelgel und anschließend 2 Stunden bei 20 mA/Gel im Trenngel Richtung Anode. Unmittelbar im Anschluss wurde die *Western Blot* Methode durchgeführt.

2.3.4 *Western Blot*

Ziel dieser Methode ist es, die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel zu lösen und auf einer Nitrocellulosemembran dauerhaft zu fixieren [82]. Dieses wurde durch das *Semidry-Blotting* oder durch *Tank-Blotting* in den Versuchen durchgeführt [83].

Semidry-Blotting

Diese *Blotting*-Methode findet unter halbfeuchten Bedingungen statt, da die *Blotting*-Kammer des Gerätes nicht mit Puffer gefüllt ist. Nur das Polyacrylamid-Gel, die Nitrocellulosemembran, auf der die Proteine fixiert werden sollen und das polsternde Filterpapier werden in Transferpuffer getränkt.

Vom Polyacrylamid-Gel wurde nach der abgelaufenen SDS-PAGE das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Zwei Filterpapiere und die Nitrocellulosemembran wurden in 1x Transfer-Puffer getränkt und in der *Blotting*-Kammer übereinander geschichtet. Die Proteine wurden bei einer angelegten Spannung von 12 Volt aus dem Gel gelöst und auf der Nitrocellulosemembran fixiert. Um die Membran für die anschließende Immunofärbung vorzubereiten (Blockierung aller Epitope), wurde sie für 1 Stunde bei 37 °C (oder über Nacht bei 4 °C) in 5 % BSA in Waschpuffer inkubiert.

Tank-Blotting

Im Gegensatz zum *Semidry-Blotting*, bei dem in horizontaler Lage (von oben nach unten) die Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel gelöst werden, wird der *Blotting*-Vorgang beim *Tank-Blotting* in einem vertikalen Puffertank durchgeführt und die Proteine von vorne nach hinten aus dem Polyacrylamid-Gel gelöst. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, dass die *Blotting*-Kammer vollständig mit gekühltem Transferpuffer gefüllt (*Wet-Blotting*) und zusätzlich durch

einen Eisblock gekühlt wird. Diese Methode eignet sich vor allem, um besonders große Proteine (100 – 200 kDa) aus dem Polyacrylamid-Gel zu lösen.

Für das *Tank-Blotting* wurde 1 Liter Transferpuffer hergestellt und je zwei Schwämme pro *Blot* in Transferpuffer eingelegt. Das Filterpapier und die Nitrocellulosemembran wurden kurz vor dem *Blotting* in Transferpuffer getränkt. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Polyacrylamid-Gel für den *Blotting*-Vorgang mit der Nitrocellulosemembran, dem Filterpapier und den Schwämmen übereinander geschichtet. Das sogenannte Sandwich wurde in die vorgesehene Haltevorrichtung eingespannt und vertikal in die *Blotting*-Kammer eingehängt. Der Eisblock wurde zur Kühlung neben die *Blotting*-Einheit positioniert und die *Blotting*-Kammer vollständig mit kaltem Transferpuffer gefüllt. Der *Blot* wurde bei einer Transferzeit von 1,5-2 Stunden (je nach Größe des zu detektierenden Proteins) bei 200 mA durchgeführt und danach in 5 % BSA in Waschpuffer inkubiert (siehe *Semidry-Blotting*).

2.3.5 Immunofärbung

Ziel der Immunofärbung ist es, die zu detektierenden Proteine durch Bindung von Primär- und Sekundärantikörpern und anschließender Chemilumineszenz-Reaktion darzustellen und zu identifizieren. Die Nitrocellulosemembran wird zuerst mit einem Primärantikörper und anschließend mit einem Sekundärantikörper inkubiert. Damit der Primärantikörper nicht an unspezifische Bindungsstellen bindet, ist die zuvor beschriebene Inkubation der Membran in 5 % BSA in Waschpuffer durchzuführen. Der für das zu detektierende Protein spezifische Primärantikörper bindet an das entsprechende Epitope des Proteins und der Sekundärantikörper bindet an den Fc-Teil des Primärantikörpers. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dieses Enzym wird in der Chemilumineszenz-Reaktion zur Sichtbarmachung des Antikörper gebundenen Proteins benötigt.

Die Nitrocellulosemembran wurde nach der Inkubation mit 5 % BSA in Waschpuffer gewaschen (pro Waschzyklus 3 x 5 Minuten in Waschpuffer auf dem Rotationsschüttler 80 S/min). Die Membran wurde in dem Primärantikörper (in Waschpuffer verdünnt) auf dem *Shaker* bei 60 S/min für 30-60 Minuten (dem Antikörper entsprechend) inkubiert und anschließend gewaschen. Unter gleichen Bedingungen wie zuvor wurde die Membran für 30-60 Minuten in Sekundärantikörper inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschzyklus.

2.3.6 Blotentwicklung – Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz-Reaktion dient der Sichtbarmachung von Proteinbanden, die zuvor im *Western Blot* auf einer Membran fixiert und durch Antikörperbindung gefärbt wurden. Die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol. Bei dieser Zerfallsreaktion von Luminol wird Licht abgestrahlt und kann auf Röntgenfilm oder durch eine Kamera aufgenommen werden. Die Lichtemission korreliert direkt mit der Position und der Menge des Proteins auf der Membran.

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem letzten Waschzyklus der Immunofärbung aus dem Waschpuffer genommen und 1 Minute mit 1 ml Elektrochemilumineszenz (ECL, Ansatz der Reagenzien siehe Material Seite 22) inkubiert. Vor Aufnahme des Bildes wurde ein zweites Mal 1 ml ECL auf der Membran verteilt und diese unmittelbar unter die Kamera (Appendix3, 28-70 mm, F2.8 Zoom Linse) des *Imagers* (FluorChem FC2 von Alpha Innotech) positioniert. Die Blende der Kamera wurde auf 1,8 eingestellt und auf Ebene der Membran fokussiert. Das Aufnahmeprogramm (*Movie Mode*) wurde so gewählt, dass ein Bild nach 2, 7 und 10 Minuten aufgenommen wurde. Die aufgenommenen Bilder wurden mit der *Imager-Analyse-Software* (FluorChem™ FC2 Stand Alone von Alpha Innotech) analysiert und densitometrisch ausgewertet.

2.4 Plasmide

2.4.1 Transformation und Amplifikation

Durch die Transformation von DNA macht man sich die Kompetenz von bestimmten Bakterienstämmen zu Nutze, DNA aus ihrer Umgebung aufzunehmen und durch Weitergabe an die Tochterzellen zu vervielfältigen (Amplifikation). Dies ermöglicht die schnelle Amplifikation von rekombinanter Plasmid-DNA.

Für die Transformation wurden die chemisch kompetente *E. coli*-Bakterienstämme MC1061 (je nach zu transformierender DNA mit oder ohne P3 Plasmid) verwendet. Es wurden 50 µl der verwendeten Bakteriensuspension mit 1 µg DNA transformiert. Hierzu wurde die Bakteriensuspension mit der DNA in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C auf dem Thermoblock erhitzt. Die transformierte Bakteriensuspension wurde auf einer Agaroseplatte (mit der dem Plasmid entsprechenden Antibiotika-Resistenz) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank gelagert.

2.4.2 Mini-Kulturen

Von den über Nacht auf der Agaroseplatte gewachsenen transformierten Bakterienkolonien wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und 3 ml LB-Nährmedium in einem 15 ml Falcon-Röhrchen damit beimpft. Dem Nährmedium wurde vor der Beimpfung den Plasmid-Resistenzen entsprechende Antibiotika zugesetzt (siehe 2.1.5). Das Falcon-Röhrchen wurde im Anschluss für mindestens 8 Stunden bei 37 °C und 220 rpm auf den Rotor im Wärmeschrank inkubiert bis sich eine Trübung des LB-Nährmediums zeigte.

2.4.3 Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation

Für die Maxi-Kultur wurde 200 ml LB Medium (siehe 2.1.5) inklusive der entsprechenden Antibiotikaresistenz mit 200 µl der Bakteriensuspension aus der Mini-Kultur überimpft und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in einem Erlenmeyerkolben inkubiert.

Die Bakteriensuspension wurde für 15 Minuten bei 4 °C bei 4400 rpm zentrifugiert und der Überstand über dem entstandenen Bakterien-Pellet entsorgt. Die Isolation der DNA aus dem Bakterien-Pellet erfolgte gemäß des Hersteller Protokolls (Maxi QIAfilter™ Plasmid Kits von QIAGEN siehe Anhang Seite 58). Das entstandene DNA-Pellet wurde in 200 µl *aqua dest.* gelöst und die DNA Konzentration photometrisch gemessen. Es wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge gemessen.

2.4.4 DNA-Restriktion und Gelelektrophorese

Ziel der DNA-Restriktion ist es, die in der Maxi-Präparation gewonnenen Plasmide durch Restriktions-Enzyme in lineare DNA-Fragmente zu zerschneiden und durch die Gelelektrophorese die Größe der entstandenen Fragmente zu ermitteln. Die Größe des zu amplifizierenden Plasmids und dessen DNA-Fragmente sind bekannt und werden mit der Größe der Plasmide aus der Maxi-Präparation verglichen.

Es wurde je Probe 1,5 µg DNA mit jeweils zwei Restriktionsenzymen verdaut. Von jedem der beiden Restriktions-Enzyme wurde 1 µl zusammen mit 3 µl 10x Puffer (den Restriktions-Enzymen entsprechend auszuwählen) und 1,5 µg DNA in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit *aqua dest.* auf 30 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe für mindestens 1 Stunde bei 37 °C auf dem Thermoblock inkubiert.

Zum Auftrennen der DNA-Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurde ein 1%-Agarose-Gel (4 Tropfen Etidiumbromid/100 ml Agarose) verwendet. Das 1%-Agarose-Gel wurde in der Gelelektrophoresekammer in TAE-Puffer mit dem DNA-Verdau beladen. Zusätzlich wurde ein DNA-Marker geladen, um die Größen der DNA-Banden bestimmen zu können. Die Gelelektrophorese wurde bei 90 V durchgeführt. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Banden im 1%-Agarose-Gel durch UV-Licht sichtbar gemacht und ein Bild mit der Kamera des *Imagers* (FluorChem FC2 von Alpha Innotech) aufgenommen (Blende 5,6).

2.5 Endozytose Assay mittels Biotinmarkierung

Das in dieser Arbeit verwendete Biotin ist nicht zellmembrandurchlässig und markiert daher alle Oberflächenproteine. Durch Immunopräzipitation eines bestimmten Proteins kann so die Expression des Proteins an der Zelloberfläche bestimmt werden. Diese Methode dient dazu, Endozytose beeinflussende Faktoren aufzudecken und zu vergleichen.

Es wurden pro Datenpunkt vier 10 cm Schalen HEK 293T Zellen verwendet. Die Zellen wurden, wie in 2.2.2 und 2.2.3 bereits beschrieben, ausgesät und mit den entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert. Über Nacht wurden diese bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS (+ 0,1 mM Kalziumchlorid + 1 mM Magnesiumchlorid) - Lösung pro Schale abgelöst und die Zellen von je zwei Schalen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt (zwei Falcon-Röhrchen pro Datenpunkt). Die Falcon-Röhrchen wurden 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gebildete Zellpellet des einen Falcon-Röhrchens wurde in 5 ml der PBS-Lösung gelöst und in das zweite Falcon-Röhrchen überführt (es verblieb ein Falcon-Röhrchen pro Datenpunkt). Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 5 ml Biotin-Lösung (0,5 mg/ml PBS + Ca/Mg) gelöst und 30 Minuten bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugierungsschritt für 3 Minuten bei 1500 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet zum Waschen in 5 ml PBS (+ Ca/Mg + 100 mM Glycin) -Lösung vorsichtig aufgelöst. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 4 °C auf dem *Shaker* in der PBS-Lösung gewaschen. Der Zentrifugierungs- und Waschschrift in 5 ml PBS-Lösung wurden erneut durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen ein weiteres Mal 3 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 500 µl 1% Triton-Lysispuffer pro Datenpunkt 30 Minuten auf Eis lysiert und anschließend 30 Minuten bei 14000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Die IP wurde mit 30 µl *M2-Beads* eine Stunde auf dem *Shaker* bei 4 °C durchgeführt. Die Waschschr

und die Denaturierung der IP- und Lysate-Proben erfolgte wie in 2.3.2 beschrieben. Die SDS-PAGE wurde mit einem 10%-Polyacrylamid-Gel durchgeführt. Anschließend folgte ein *Western Blot*. Zum Nachweis der Biotin-markierten Proteine wurde die Immunofärbung mit Streptavidin-HRP (Verdünnung in Waschpuffer 1:1500) für 1 Stunde durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran 3 x 10 Minuten in Waschpuffer bei 80 S/min auf dem *Shaker* gewaschen und wie in 2.3.6 beschrieben der *Blot* entwickelt.

2.6 Densitometrie und Statistik

Für die quantitative Auswertung der Proteinbanden der Immunoblots wurden densitometrische Messungen mit dem Software-Programm FluorChem AlphaEase FC2 von Alpha Innotech durchgeführt. Der zu messende Bereich auf der Membran wurde für jede auszuwertende Proteinbande manuell festgelegt (als rechteckige Box um die Proteinbande herum, so dass möglichst wenig Hintergrund mit eingeschlossen wurde). In diesem festgelegten Bereich wurde die Anzahl der Grauton-Pixel densitometrisch gemessen. Die gemessene Anzahl der Pixel ist (nach Abzug der Hintergrund-Pixel) direkt proportional zur Proteinmenge in dem gemessenen Bereich. Somit erlaubt die Messung der Grauton-Pixel-Dichte Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinmenge in einem definierten Bereich. Nach Analyse der Proteinbanden werden folgende Werte angegeben.

% gibt den prozentualen Anteil, den jeder definierte Bereich an der gesamten Dichtemessung hat, an.

Da die Proteinbanden dunkel und der Hintergrund weiß dargestellt wurden, musste die *INVERT* Funktion angewählt werden, um korrekte Daten zu erhalten.

Die erhobenen Daten der einzelnen Experimente wurden bei mehrfacher Durchführung gemittelt und in Kapitel 3 grafisch dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde der einseitige Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) durchgeführt. Werte von $p \leq 0,05$ wurden als signifikant gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionspartner von GLEPP1

GLEPP1 ist eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die sich am apikalen Pol des Podozyten-Fußfortsatzes befindet [72]. Es ist bisweilen nicht bekannt, welches Substrat GLEPP1 im Podozyten mit seiner Phosphatase-Domäne dephosphoryliert und welche regulatorischen Prozesse über diesen Signalweg gesteuert werden. Um nähere Erkenntnisse über die Funktion und die Rolle von GLEPP1 im Podozyten zu gewinnen, stellte sich die Frage nach möglichen Interaktionspartnern von GLEPP1.

3.1.1 Nephrin interagiert mit GLEPP1

Nephrin ist ein essenzieller Bestandteil der glomerulären Schlitzmembran [31, 32, 84]. Durch Phosphorylierung am Nephrin C-Terminus werden wichtige Signaltransduktionsprozesse und Adapterprozesse von Nephrin reguliert [37, 51]. Es sollte untersucht werden, ob die Phosphatase GLEPP1 mit Nephrin interagiert. Hierzu wurden *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T Zellen mit FLAG-markiertem Nephrin Wildtyp (Nephrin F. WT) und Fusionsprotein slg mit dem zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt) bzw. im Kontrollansatz mit dem leeren slg-Vektor kotransfiziert. Mit Protein-G-Sepharose wurde slg immobilisiert. Die Proteine wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Durch Färben gegen FLAG mit einem α -M2-Antikörper konnte gezeigt werden, dass Nephrin F. WT und slg.GLEPP1 cyt miteinander interagieren (Abb. 4A). Um sicher zu beweisen, dass die Interaktion durch die Proteindomänen vermittelt sind, wurde der V5-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) zusammen mit dem slg-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von Nephrin (slg.Nephrin cyt) in HEK 293T Zellen exprimiert. Durch Präzipitation von slg und Färbung gegen V5 konnte der Nachweis erbracht werden, dass die zytoplasmatische Domäne von Nephrin mit dem zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 interagiert (Abb. 4B).

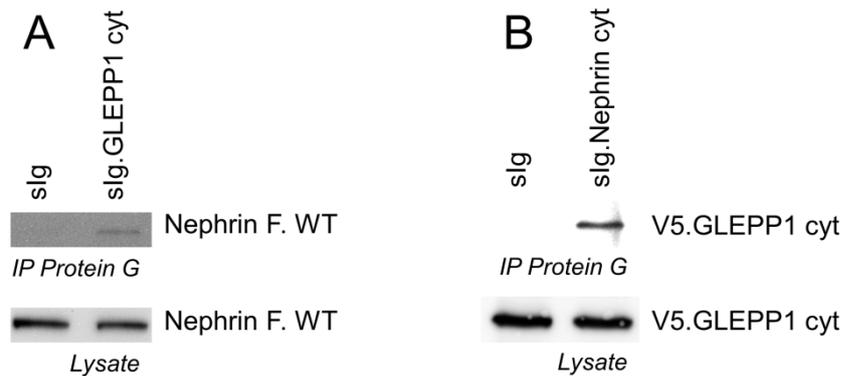


Abb. 4: GLEPP1 interagiert intrazellulär mit Nephrin

(A) Der *Western Blot* zeigt die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) in HEK 293T Zellen. In HEK 293T Zellen wurde der FLAG-markierte Wildtyp von Nephrin (Nephryn F. WT), der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt), oder slg als Negativkontrolle exprimiert. Die Co-IP wurde mit Protein G am slg-Tag und an slg.GLEPP1 cyt durchgeführt. Die Interaktion zwischen slg.GLEPP1 cyt und Nephryn F. WT wurde durch Färben gegen FLAG mit Anti-M2-Antikörpern gezeigt. (B) HEK 293T Zellen wurden mit dem V5-Tag-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt), dem slg-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von Nephrin (slg.Nephryn cyt) und slg als Negativkontrolle transfiziert. Slg und das Fusionsprotein wurden durch Protein G immunopräzipitiert und der *Western Blot* gegen V5 gefärbt. Es zeigte sich eine Interaktion zwischen den zytoplasmatischen Abschnitten von Nephrin und GLEPP1.

3.1.2 Podocin interagiert mit GLEPP1

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Podocin mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephryn interagiert und für die Nephryn-abhängige Signalübermittlung eine wichtige Rolle spielt [54]. Es stellte sich die Frage, ob auch Podocin mit GLEPP1 in Interaktion tritt. Um eine genauere Aussage zur Interaktions-Domäne von GLEPP1 mit Podocin zu erhalten, wurden HEK 293T Zellen mit dem vollständigen slg-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt) transfiziert und mit zwei *Truncations* von slg.GLEPP1 cyt. Von diesen beiden verkürzten Formen des zytoplasmatischen GLEPP1-Abschnittes enthielt die eine *Truncation* noch die Phosphatase Domäne von GLEPP1, die andere *Truncation* bestand nur noch aus den letzten 20 Aminosäuren (AA) des zytoplasmatischen Abschnitts von GLEPP1. Es wurde slg.GLEPP1 cyt, slg.GLEPP1 cyt AA 936-1217 und slg.GLEPP1 cyt AA 1197-1217 zusammen mit FLAG-markiertem Podocin (F.Podocin) in HEK 293T Zellen exprimiert. Der leere slg-Vektor diente als Negativkontrolle. Nach Co-IP mit Protein-G-Sepharose, SDS-PAGE, *Western Blot*-Analyse und Immunofärbung gegen FLAG mit α -M2-Antikörpern konnte gezeigt werden, dass von GLEPP1 sowohl der komplette zytoplasmatische Abschnitt, als auch die beiden *Truncations* mit Podocin interagieren (Abb. 5). Die Interaktion von slg.GLEPP1 cyt AA 936-1217 und F.Podocin war deutlich stärker

ausgeprägt als die Interaktion mit slg.GLEPP1 cyt und slg.GLEPP1 cyt AA 1197-1217. Da aber dennoch die *Truncation* von slg.GLEPP1 cyt AA 1197-1217 mit Podocin interagiert, liegt in diesem 20 Aminosäure langen Abschnitt von GLEPP1 sehr wahrscheinlich auch die Interaktionsdomäne.

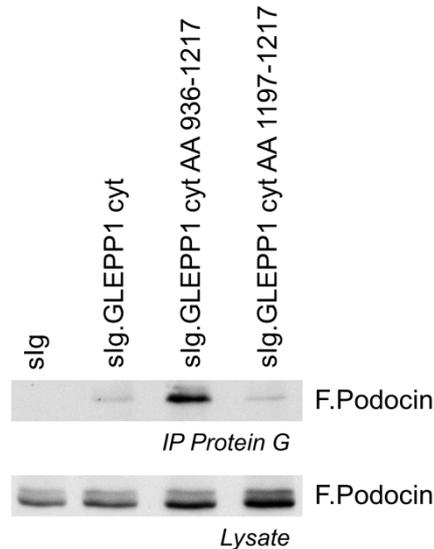


Abb. 5: Der zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 AA 1197-1217 interagiert mit Podocin

Der *Western Blot* zeigt die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) in HEK 293T Zellen, in denen der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt), die *Truncation* von slg.GLEPP1 cyt (slg.GLEPP1 cyt AA 936-1217 und AA 1197-1217), oder slg als Negativkontrolle mit FLAG-markiertem Podocin (F.Podocin) exprimiert wurden. Die Co-IP wurde mit Protein G an slg und den Fusionsproteinen durchgeführt. Die Interaktion zwischen slg.GLEPP1 cyt, slg.GLEPP1 cyt AA 936-1217, slg.GLEPP1 cyt AA 1197-1217 und F.Podocin wurde durch das Färben gegen FLAG mit Anti-M2-Antikörpern gezeigt.

3.1.3 Die Kinasen Src und Fyn interagieren mit GLEPP1 und Nephrin

Die Kinasen der Src-Familie (SFK) Src und Fyn werden im Podozyten exprimiert [51]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Nephrin von Src-Kinasen am C-Terminus an verschiedene Tyrosinresten phosphoryliert wird [51]. Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob auch GLEPP1 mit Src und Fyn interagiert. Aus diesem Grund wurden HEK 293T Zellen mit dem slg-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt) mit Src transfiziert. Der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin (slg.Nephrin cyt) diente als Positivkontrolle, der leere slg-Vektor als Negativkontrolle. Die Co-IP wurde mit Protein-G-Sepharose an slg und den Fusionsproteinen durchgeführt. Nach Auftrennung der Proben in der SDS-PAGE und Protein-Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mittels *Western Blotting* wurde dieser gegen Src gefärbt. Es zeigte sich, dass Src sowohl mit slg.Nephrin cyt als auch mit slg.GLEPP1 cyt interagiert (Abb. 6A). Um die Interaktionsdomäne von GLEPP1 zu identifizieren, die für die Interaktion mit SFKs

verantwortlich ist, wurden erneut die *Truncations* AA 936-1217 und AA 1197-1217 von slg.GLEPP1 cyt zusammen mit Src transfiziert. Die Co-IP wurde mit Protein-G-Sepharose durchgeführt und der *Western Blot* gegen Src gefärbt. Es zeigte sich, dass beide *Truncations* von GLEPP1 cyt mit Src interagieren (Abb. 6B). Die Interaktionsdomäne von GLEPP1 liegt daher zwischen den AA 1197-1217 vom GLEPP1-C-Terminus.

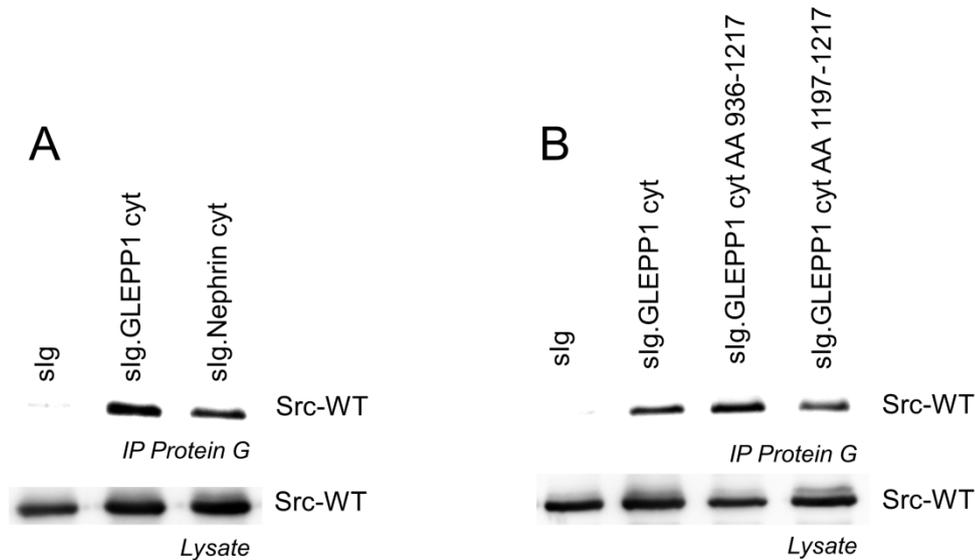


Abb. 6: GLEPP1 interagiert zytoplasmatisch mit der Src-Kinase Src

Die *Western Blots* zeigen Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) in HEK 293T Zellen. Die Co-IPs wurden jeweils mit Protein G durchgeführt und anschließend gegen Src gefärbt. (A) Es wurden der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt), der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin (slg.Nephrin cyt) als Positivkontrolle, oder slg als Negativkontrolle zusammen mit Src (Src-WT) in HEK 293T Zellen exprimiert. Der gegen Src gefärbte *Western Blot* zeigt, dass Src sowohl mit slg.GLEPP1 cyt als auch mit slg.Nephrin cyt interagiert. (B) Es wurden slg.GLEPP1 cyt, slg.GLEPP1 cyt *Truncation* AA 936-1217, slg.GLEPP1 cyt *Truncation* AA 1197-1217, oder slg als Negativkontrolle zusammen mit Src-WT in HEK 293T Zellen exprimiert. Der *Western Blot* zeigt, dass Src-WT mit den *Truncations* AA 936-1217 und 1197-1217 von slg GLEPP1 cyt interagiert.

Die Interaktion, die für Src und GLEPP1 gezeigt werden konnten, sollten nun auch für die Kinase Fyn und GLEPP1 bestätigt werden. Es wurden die oben für Src beschriebenen Versuche in ähnlicher Anordnung für Fyn durchgeführt. Anstatt Src wurde in diesen beiden Versuchen Fyn transfiziert und die *Western Blots* gegen Fyn gefärbt. Es zeigte sich, dass Fyn mit slg.GLEPP1 cyt und slg.Nephrin cyt interagiert (Abb. 7A). Und sowohl *Truncation* AA 936-1217 als auch *Truncation* AA 1197-1217 von slg.GLEPP1 cyt mit Fyn interagieren (Abb. 7B).

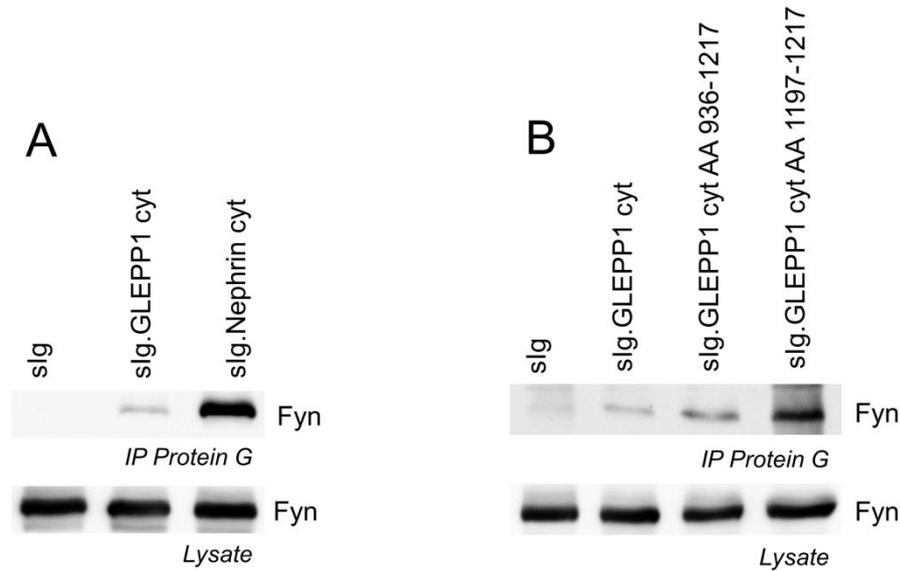


Abb. 7: Die Src-Kinase Fyn interagiert mit dem zytosomatischen Anteil von GLEPP1

Die Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) wurden in HEK 293T Zellen durchgeführt und durch *Western Blot*-Analyse ausgewertet. (A) Der slg-markierte zytosomatische Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt), der slg-markierte zytosomatische Abschnitt von Nephrin (Positivkontrolle), oder slg (Negativkontrolle) wurden zusammen mit Fyn (Fyn-WT) in HEK 293T Zellen exprimiert. Slg, slg.GLEPP1 cyt und slg.Nephrin cyt wurden durch die Co-IP mit Protein G immobilisiert. Der gegen Fyn gefärbte *Western Blot* zeigt, dass Fyn sowohl mit slg.GLEPP1 cyt als auch mit slg.Nephrin cyt interagiert. (B) Es wurden slg.GLEPP1 cyt, die *Truncation* AA 936-1217, AA 1197-1217 von slg.GLEPP1 cyt oder slg als Negativkontrolle zusammen mit Fyn-WT in HEK 293T Zellen exprimiert. Slg und die Fusionsproteine wurden mit Protein G immunopräzipitiert. Der gegen Fyn gefärbte *Western Blot* zeigt, dass Fyn mit den *Truncations* AA 936-1217 und AA 1197-1217 von slg.GLEPP1 cyt interagiert.

3.2 GLEPP1 dephosphoryliert Src und Fyn Tyrosin 527

Die Src-Kinasen Src und Fyn sind wichtige Kinasen, die ihre Substrate an Tyrosinresten phosphorylieren [61]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Src-Kinase Fyn Nephrin bindet und an dessen C-Terminus Tyrosin phosphoryliert [52]. Die Src-Kinasen werden auf verschiedenste Weisen aktiviert und reguliert. Unter anderem werden sie durch Dephosphorylierung am Tyrosin 527 aktiviert [61]. GLEPP1 ist eine Protein-Phosphatase, die ihre Substrate an Tyrosinresten dephosphoryliert [41]. In den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Kinasen Src und Fyn unter der Anwesenheit von GLEPP1 vermehrt am Tyrosin 527 dephosphoryliert vorliegen.

3.2.1 Src Tyrosin 527

Es wurde der V5-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 oder *cdm8* als Leervektor zusammen mit Src in HEK 293T Zellen exprimiert. In der Co-IP wurden die Proben zunächst mit 1,5 μ l α -Src-Antikörper inkubiert und dann mit Protein-G-Sepharose immobilisiert. Die Kontroll-Probe der Co-IP wurde ausschließlich mit Protein-G-Sepharose inkubiert. Die Co-IP-Proben wurden gegen Src und gegen Phospho-Src (Tyrosin 527) gefärbt. Abbildung 8A zeigt, dass sich die Bande für Phospho-Src unter der Anwesenheit von GLEPP1 cyt schwächer darstellt als die Kontrolle. Um dieses Ergebnis zu quantifizieren wurde die Intensität des Banden Signals der *Western Blots* von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten densitometrisch ausgewertet. Der Quotient aus dem Signalwert der Phospho-Src-IP-Bande zum Signalwert der IP-Bande (Phospho-Src-IP/IP) wurde grafisch dargestellt (Abb. 8B). Es konnte gezeigt werden, dass Src Tyrosin 527 unter GLEPP1 um 21% weniger phosphoryliert vorliegt.

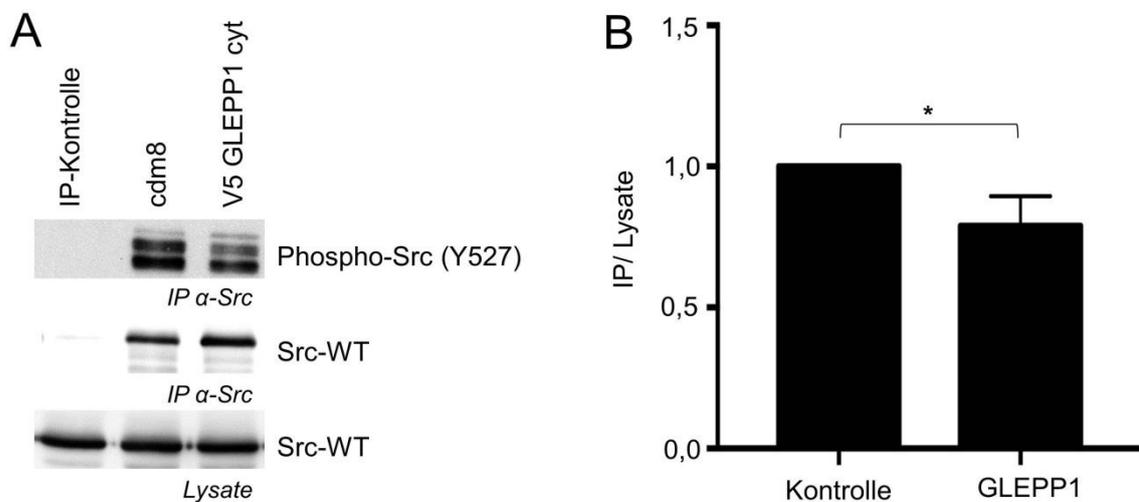
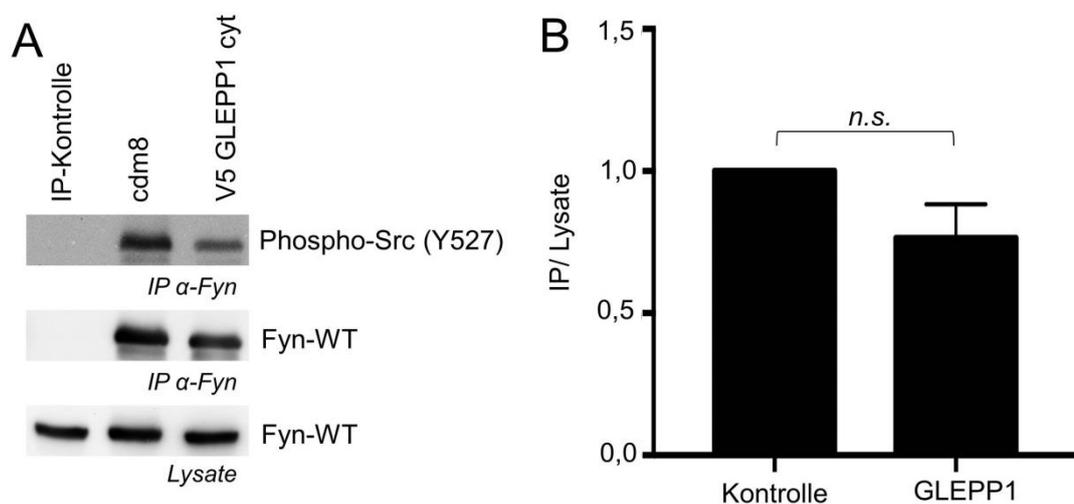


Abb. 8: GLEPP1 führt zur Dephosphorylierung von Src am Tyrosin 527

(A) Co-Immunopräzipitation (Co-IP) in HEK 293T Zellen und *Western Blot-Analyse*. Es wurde der V5-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) oder *cdm8* als Leervektor zusammen mit dem Wildtyp von Src (Src-WT) in HEK 293T Zellen exprimiert. Anschließend wurde Src präzipitiert. Die Co-IP Proben wurden gegen Src und Phospho-Src (Tyrosin 527) gefärbt. Der *Western Blot* zeigt, dass Src am Tyrosin 527 unter der Anwesenheit von V5.GLEPP cyt vermindert phosphoryliert vorliegt. (B) Die Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden als Quotient von Phospho-Src-IP-Werten durch Src-IP-Werte (Phospho-Src-IP/Src-IP) grafisch dargestellt. Es wurden die Mittelwerte dargestellt. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test); $n = 4$; einseitiger MWU-Test $p = 0,014$; Kontrolle = 1, Probe mit GLEPP1 = 0,79; SD = 0,79 \pm 0,21; * = $p \leq 0,05$.

3.2.2 Fyn Tyrosin 527

Um zu zeigen, dass auch die Src-Kinase Fyn am Tyrosin 527 unter GLEPP1 vermehrt dephosphoryliert vorliegt, wurde der in 4.2.1 beschriebene Versuch auch für Fyn durchgeführt. Fyn wurde zusammen mit V5.GLEPP1 cyt oder dem Leervektor cdm8 in HEK 293T Zellen überexprimiert. Für die Co-IP wurden die Proben für 30 Minuten mit 1,5 µl α-Fyn-Antikörper inkubiert und anschließend mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert. Für den *Western Blot* wurde mit anti-Fyn und anti-P-Src Y527 gefärbt. Die mit Phospho-Src gefärbte IP-Bande stellte sich unter der Anwesenheit von GLEPP1 schwächer dar als die Kontroll-Bande ohne GLEPP1 (Abb. 9A). Die Versuche wurde fünf Mal unabhängig voneinander durchgeführt und, wie in 4.2.1 beschrieben, densitometrisch ausgewertet und die Mittelwerte grafisch dargestellt (Abb. 9B). Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Fyn Tyrosin 527 unter GLEPP1 um 24% abnimmt. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht, es lässt sich dennoch eine Tendenz erkennen, dass Fyn Tyrosin 527 unter GLEPP1 vermehrt dephosphoryliert vorliegt.

**Abb. 9: Dephosphorylierung von Fyn am Tyrosin 527 unter dem Einfluss von GLEPP1**

(A) Co-Immunopräzipitation (Co-IP) in HEK 293T Zellen und *Western Blot*-Analyse. Es wurde der V5-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) oder cdm8 als Leervektor zusammen mit dem Wildtyp von Fyn (Fyn-WT) in HEK 293T Zellen exprimiert. Die Co-IP wurde mit einem Fyn Antikörper durchgeführt. Die Co-IP Proben wurden gegen Fyn und Phospho-Src (Tyrosin 527) gefärbt, da dieser Antikörper Kreuzreaktivität gegen Fyn zeigt. Der *Western Blot* zeigt, dass Fyn Tyrosin 527 unter GLEPP1 vermindert phosphoryliert vorliegt. (B) Die Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden als Quotient von Phospho-Fyn-IP-Werten durch Fyn-IP-Werte (Phospho-Fyn-IP/Fyn-IP) grafisch dargestellt. Es wurden die Mittelwerte verwendet. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test); n = 5; einseitiger MWU-Test p = 0,06; Kontrolle = 1, Probe mit GLEPP1 = 0,76; SD = 0,76 +/- 0,27; n.s. = nicht signifikant.

3.3 Einfluss von GLEPP1 auf Nephrin-Podocin bzw. Nephrin- β -arrestin2-Interaktion

Abhängig vom Phosphorylierungszustand an Y1193 wird Nephrin durch Interaktion von Podocin in seiner Integrität in der glomerulären Schlitzmembran gestärkt [50, 53]. Im dephosphorylierten Zustand wird durch Bindung von β -arrestin2 die Endozytose von Nephrin vermittelt [56]. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin bzw. β -arrestin2 durch die Anwesenheit von GLEPP1 beeinflusst wird.

3.3.1 Nephrin-Podocin-Interaktion wird durch GLEPP1 verstärkt

Es wurde der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin (slg.Nephrin cyt) zusammen mit FLAG-markiertem Podocin (F.Podocin) in HEK 293T Zellen exprimiert. In einem der Datenpunkte wurde zusätzlich der V5-markierte zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) kotransfiziert. Als GLEPP1 Kontrolle diente der Leervektor. Die Co-IP wurde mit Protein-G-Sepharose durchgeführt. Es folgte die Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE. Mittels *Western Blot* wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und fixiert. Der *Western Blot* wurde mit α -M2-Antikörper gegen FLAG gefärbt. Die Ergebnisse in Abbildung 10A zeigen, dass sich die Nephrin-Podocin-Interaktion unter GLEPP1 gegenüber der Kontrolle verstärkt. Um dieses Ergebnis zu quantifizieren, wurden die Proteinbanden densitometrisch ausgewertet und der Quotient von Co-IP-Signalintensität durch Lysate-Signalintensität (Co-IP/Lysate) ermittelt. Dies wurde bei fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wiederholt und die Mittelwerte der Experimente grafisch dargestellt (Abb. 10B). Es zeigte sich, dass die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin unter GLEPP1 um 69% verstärkt wird.

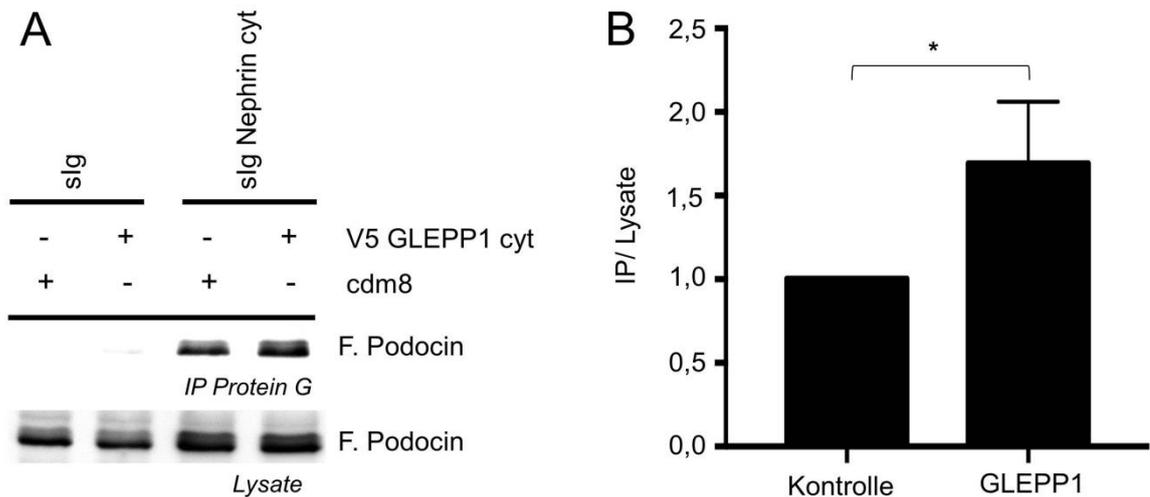


Abb. 10: GLEPP1 verstärkt die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin

(A) Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und *Western Blot*-Analyse in HEK 293T Zellen. Es wurden der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin (slg.Neph rin cyt) zusammen mit FLAG-markiertem Podocin (F.Podocin) und cdm8 als Leervektor bzw. V5-markiertem zytoplasmatischem GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) in HEK 293T Zellen exprimiert. Die Co-IP wurde mit Protein G durchgeführt und der *Western Blot* mit α -M2-Antikörper gegen FLAG gefärbt. Es zeigte sich, dass die Neph rin-Podocin-Interaktion durch GLEPP1 deutlich verstärkt wird. Die Lysate dienten als Lade-Kontrolle. (B) Die Ergebnisse von fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden als Quotient von IP-Werten durch Lysat-Werte (IP/Lysate) grafisch dargestellt. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test); $n = 5$; einseitiger MWU-Test $p = 0,004$; Kontrolle = 1, Probe mit GLEPP1 = 1,69; SD = 1,69 +/- 0,83; * = $p \leq 0,05$.

3.3.2 Neph rin- β -arrestin2-Interaktion wird unter GLEPP1 abgeschwächt

Im folgenden Versuch wurde der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Neph rin (slg.Neph rin cyt) mit FLAG-markiertem β -arrestin2 (F. β -arrestin2) in HEK 293T Zellen exprimiert. Einer der Datenpunkte wurde zusätzlich mit dem V5-markiertem zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt), die Kontrolle stattdessen mit dem Leervektor cdm8 transfiziert. Die Co-IP wurde mit Protein-G-Sepharose am slg-Tag durchgeführt. Nach SDS-PAGE und *Western Blotting* wurde mit α -M2-Antikörper gegen FLAG gefärbt. Der *Western Blot* in Abbildung 11A zeigt, dass die Interaktion zwischen Neph rin und β -arrestin2 unter GLEPP1 gegenüber der Kontrolle stark vermindert ist. Um die Ergebnisse zu quantifizieren, wurde der Versuch drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt und densitometrisch ausgewertet. Es wurde der Quotient aus Co-IP-Signalintensität durch Lysate-Signalintensität gebildet (Co-IP/Lysate) und deren Mittelwerte grafisch dargestellt (Abb. 11B). Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Neph rin und β -arrestin2 unter GLEPP1 um 62% abnimmt.

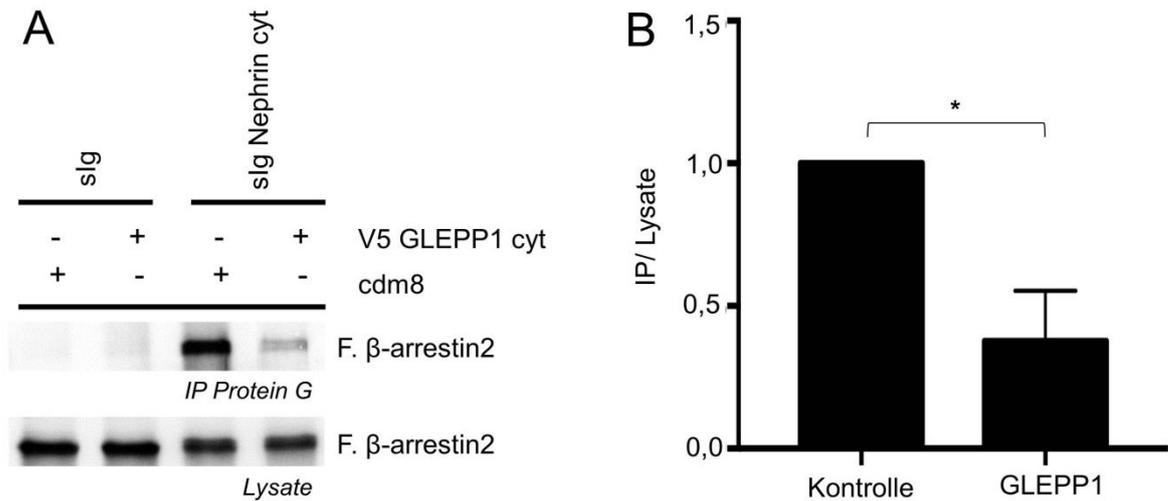


Abb. 11: GLEPP1 schwächt die Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2

(A) Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und *Western Blot*-Analyse in HEK 293T Zellen. Es wurden der slg-markierte zytoplasmatische Abschnitt von Nephrin (slg.Nephrin cyt) zusammen mit FLAG-markiertem β -arrestin2 (F. β -arrestin2) und cdm8 als Leervektor bzw. dem V5-markiertem zytoplasmatischem GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) in HEK 293T Zellen exprimiert. Die Co-IP wurde mit Protein G (Immobilisation von slg) durchgeführt und der *Western Blot* mit α -M2-Antikörper gegen FLAG gefärbt. Es zeigte sich, dass die Nephrin- β -arrestin2-Interaktion unter GLEPP1 deutlich abgeschwächt wird. Die Lysate dienen als Lade-Kontrolle. (B) Die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden als Quotient von IP-Werten durch Lysat-Werte (IP/Lysate) grafisch dargestellt. Es wurden die Mittelwerte verwendet. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test); n = 3; einseitiger MWU-Test p = 0,032; Kontrolle = 1, Probe mit GLEPP1 = 0,38; SD = 0,38 +/- 0,31; * = p \leq 0,05.

3.4 GLEPP1 reduziert die Endozytose von Nephrin

Nephrin ist in der glomerulären Schlitzmembran lokalisiert und befindet sich als spezifische Struktur zwischen zwei benachbarten Podozyten-Fußfortsätzen [84]. Nephrinmoleküle von benachbarten Podozyten-Fußfortsätzen binden in homodimerisierender Art und Weise aneinander. Wird die Schlitzmembran geschädigt und Nephrin verliert seinen extrazellulären Kontakt, nimmt die Tyrosin-Phosphorylierung am C-Terminus von Nephrin ab [51]. β -arrestin2 kann den dephosphorylierten C-Terminus von Nephrin binden und induziert dessen Endozytose [56]. Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin durch GLEPP1 gestärkt wird und die Nephrin- β -arrestin2 Interaktion geschwächt wird, stellte sich nun die Frage, ob sich diese vermehrte Interaktion auch auf die Expression von Nephrin an der Zelloberfläche auswirkt. Es wird angenommen, dass die Bindung von Podocin an den phosphorylierten C-Terminus von Nephrin dessen Endozytose verhindert und Nephrin in der glomerulären Schlitzmembran stabilisiert wird. In dem folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob unter der Anwesenheit von GLEPP1 Nephrin vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert ist. Hierzu wurde ein Biotinylierungs-Assay durchgeführt. Es wurde in HEK 293T Zellen FLAG-markiertes Nephrin Wildtyp (Nephrin.F.WT WT) zusammen mit dem Leervektor cdm8 oder mit dem V5-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) überexprimiert. Das an der Zelloberfläche exprimierte Nephrin wurde durch Biotinylierung markiert. Dafür wurden die Zellen vor der Lyse für 30 Minuten bei 4 °C mit Biotin inkubiert. Die Co-IP wurde mit *M2-Beads* am FLAG-Tag durchgeführt. Nach SDS-PAGE, Transfer und Fixierung der Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran mittels *Western Blot* wurde mit α -M2-Antikörper gegen FLAG und mit Streptavidin gefärbt. Es zeigte sich (Abb. 12A), dass unter der Anwesenheit von GLEPP1 Nephrin vermehrt an der Oberfläche exprimiert ist bzw. die Endozytose von Nephrin unter GLEPP1 vermindert ist. Die Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Es wurde der Quotient aus Biotin-Nephrin-IP-Signalstärke durch Nephrin-IP-/Lysate-Signalintensität (Biotin-Nephrin-IP/Nephrin-IP/Lysate) ermittelt und die Mittelwerte grafisch dargestellt (Abb. 12B). Die Ergebnisse zeigen, dass Nephrin unter der Anwesenheit von GLEPP1 um 39% weniger endozytiert wird.

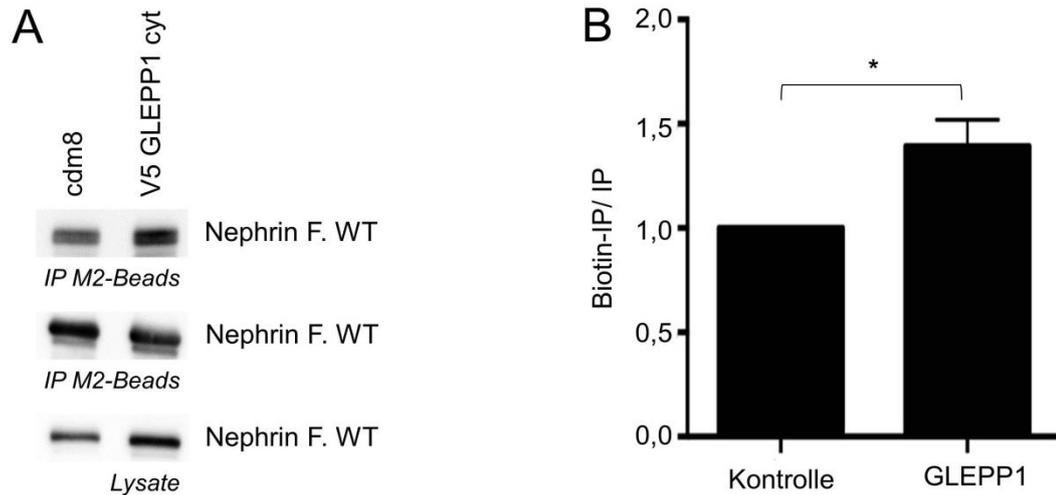


Abb. 12: GLEPP1 reduziert die Endozytose von Nephrin

(A) Endozytose-Assay, Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und *Western Blot*-Analyse. Es wurde FLAG-markiertes Nephrin (Nephrin F. WT) zusammen mit dem Leervektor cdm8 oder mit dem V5-markierten zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (V5.GLEPP1 cyt) in HEK 293T Zellen exprimiert. Um das an der Zelloberfläche exprimierte Nephrin zu markieren, wurden die HEK 293T Zellen vor der Lyse 30 Minuten bei 4 °C mit Biotin inkubiert. Die Co-IP wurde mit *M2-Beads* durchgeführt. Die Lysate- und IP-Proben wurden gegen FLAG und die Biotin-markierten Proben mit Streptavidin gefärbt. Es zeigte sich, dass die Endozytose von Nephrin unter GLEPP1 vermindert wurde. (B) Die Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch quantifiziert. Die Werte wurden als Quotient von biotinyliertem Nephrin-Werten durch Nephrin-IP-/Lysate-Werte (Biotin-IP/IP) grafisch dargestellt. Es wurden die Mittelwerte verwendet. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test); n = 5; einseitiger MWU-Test p = 0,004; Kontrolle = 1, Probe mit GLEPP1 = 1,39; SD = 1,39 +/- 0,29; * = p ≤ 0,05.

4 Diskussion

4.1 Die Ergebnisse im Kontext der aktuellen Studienlage und Schlussfolgerungen

4.1.1 GLEPP1 Interaktionspartner

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenste Proteine des podozytären Fußfortsatzes als Interaktionspartner von GLEPP1 identifiziert. Für die vier identifizierten Proteine, Nephrin, Podocin, Src und Fyn wurden bereits in vorangehenden Studien gezeigt, dass sie wichtige Proteine der glomerulären Filterbarriere sind [32, 37, 51-55]. Sie sind an der Regulation, der Erhaltung und der Integrität der glomerulären Schlitzmembran beteiligt. Nephrin bildet durch Homodimerisierung mit weiteren Nephrin-Molekülen von benachbarten Podozyten-Fußfortsätzen das strukturelle Rückgrat des glomerulären Filters [37]. Es spielt eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion und dient als Sensor für die Intaktheit der glomerulären Schlitzmembran [32, 37]. Podocin ist ein „*Lipid-Raft*-assoziiertes“ Membranprotein der Schlitzmembran [53]. In den *Lipid-Rafts* reichern sich Signaltransduktionskomponenten in der Plasmamembran an und bilden somit eine Plattform für wichtige zelluläre Prozesse [85-87]. Podocin dient als struktureller Organisator der Schlitzmembran. Im phosphorylierten Zustand wird Nephrin von Podocin gebunden. Durch das Binden von Podocin werden die Integrität von Nephrin in der Schlitzmembran und die zelluläre Signaltransduktion verbessert. Die Funktionalität des glomerulären Filters bleibt gewahrt [50, 53, 54]. Für die Src-Familien-Kinasen (SFK) Fyn und Src konnte bereits gezeigt werden, dass sie wichtige Funktionen in der Signaltransduktion und der Regulation von Signalwegen erfüllen [59]. Src und Fyn binden an Nephrin und phosphorylieren Nephrin an bestimmten Tyrosinresiduen am C-Terminus [51, 52]. Im phosphorylierten Zustand kann u.a. Podocin vermehrt an Nephrin binden und die Integrität von Nephrin wird gestärkt [50, 53, 56]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass GLEPP1 mit Nephrin, Podocin, Src und Fyn interagiert. Es ist erstaunlich, dass GLEPP1 direkt mit Nephrin interagiert, da bisher angenommen wurde, dass beide Proteine im Podozyten räumlich voneinander getrennt exprimiert werden. GLEPP1 befindet sich in der Membran am apikalen Pol des Podozyten-Fußfortsatzes [41], während Nephrin sich in der Schlitzmembran nah der basolateralen Seite des Podozyten befindet [32]. Die Annahme, dass GLEPP1 nur am apikalen Pol des Podozyten-Fußfortsatzes exprimiert wird, beruht jedoch auf den Daten einer einzigen Studie. Wir konnten mittlerweile durch Immunogold-Färbung des Podozyten zeigen, dass GLEPP1 tatsächlich überwiegend am apikalen Pol exprimiert wird, jedoch auch an der Schlitzmembran. Damit wäre die direkte Interaktion zwischen GLEPP1 und Nephrin auch *in*

vivo und nicht nur im *in vitro*-Versuch durchaus möglich. Diese Interaktionen lassen vermuten, dass GLEPP1 eine zentrale Rolle in podozytären Zellprozessen spielt.

4.1.2 GLEPP1 aktiviert Src-Familien-Kinasen

Es ist bekannt, dass Src-Familien-Kinasen (SFKs) unter anderem durch Tyrosin-Dephosphorylierung am Tyrosin 527 aktiviert werden (Abb. 13). Die aktivierten SFKs wiederum phosphorylieren ihr Substrat mit ihrer Kinase Domäne [61, 88]. GLEPP1 gehört zu der Gruppe der Rezeptor-Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTP) des Subtyp R3 und wird vor allem in den Podozyten der Niere und im Gehirn exprimiert [66]. Für andere RPTPs des Subtyps R3 konnte bereits gezeigt werden, dass sie die SFKs durch Dephosphorylierung aktivieren [74-76]. GLEPP1 [41], *Density-Enhanced Phosphatase 1* (DEP-1) [89, 90] und die vaskuläre endotheliale Protein-Tyrosine-Phosphatase (VE-PTP) [91, 92] gehören zu diesen RPTPs des Subtyp R3. Alle RPTPs der R3 Familie zeigen den gleichen strukturellen Aufbau. Sie setzen sich zusammen aus einer einzelnen katalytischen Domäne in der zytoplasmatischen Region, einem hydrophoben transmembranären Abschnitt und einer Fibronectin-Type-III-artigen extrazellulären Domäne [93]. DEP-1 wird in endothelialen und hepatopoetischen Zellen exprimiert. Für DEP-1 konnte bereits gezeigt werden, dass sie wichtig für die Dephosphorylierung des negativ regulatorischen Tyrosins 527 von Src ist. Durch diese Dephosphorylierung wird Src in Endothelzellen aktiviert [74]. Auch die RPTP VE-PTP wird in endothelialen Zellen exprimiert. VE-PTP bindet Kinasen der Src-Familie mit seiner C-terminalen Region und induziert eine direkte Aktivierung dieser Kinasen [75, 76]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der zytoplasmatische Abschnitt von GLEPP1 mit den SFKs Src und Fyn interagiert. *Truncation*-Experimente identifizierten die AA 1193-1217 als die potenzielle Bindungsdomäne von GLEPP1 an SFKs, da sowohl die *Truncation* von GLEPP1 AA 936-1217, als auch die *Truncation* GLEPP1 1193-1217 mit Src bzw. Fyn interagierten. Des Weiteren zeigte sich, dass das Tyrosin 527 von Src unter der Anwesenheit von GLEPP1 vermehrt dephosphoryliert vorliegt. Tyrosin 527 von Fyn wies unter GLEPP1 zwar auch eine vermehrte Dephosphorylierung auf, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Es lässt sich jedoch eine Tendenz erkennen, die nicht unbeachtet bleiben sollte. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Src ein Substrat von GLEPP1 ist. Des Weiteren lassen unsere Versuche vermuten, dass GLEPP1 Src bindet und mit seiner Phosphatase-Domäne am Tyrosin 527 dephosphoryliert. Die somit aktivierte SFK Src könnten daraufhin u.a. Nephren am C-Terminus phosphorylieren. GLEPP1 würde somit über die Dephosphorylierung von Src eine wichtige Rolle in der Regulation von Nephren in der

glomerulären Schlitzmembran spielen. Für die SFK Fyn bleibt es weiterhin fraglich, ob auch sie ein Substrat von GLEPP1 ist und über den gleichen Mechanismus wie Src von GLEPP1 dephosphoryliert wird.

Ein ähnlicher Regulationsmechanismus konnte bereits für die beiden RPTPs Protein-Tyrosin-Phosphatase α (PTP α) und Protein-Tyrosin-Phosphatase ϵ (PTP ϵ) gezeigt werden [60, 94]. Diese RPTPs gehören zum Subtyp R4. PTP α und PTP ϵ werden am C-Terminus Tyrosin-phosphoryliert. Hierdurch verändern sie ihre Konfiguration. Es bietet sich eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne von Src an. Diese Bindung führt zum Aufbrechen der geschlossenen Konfiguration von Src und das phosphorylierte Tyrosin 527 von Src wird exponiert. Anschließend wird Tyrosin 527 von PTP α bzw. PTP ϵ dephosphoryliert. Diese Dephosphorylierung führt zur Aktivierung von Src. Es deutet vieles darauf hin, dass GLEPP1 auf ähnliche Weise wie die beiden RPTPs PTP α und PTP ϵ die SFKs der glomerulären Schlitzmembran aktivieren.

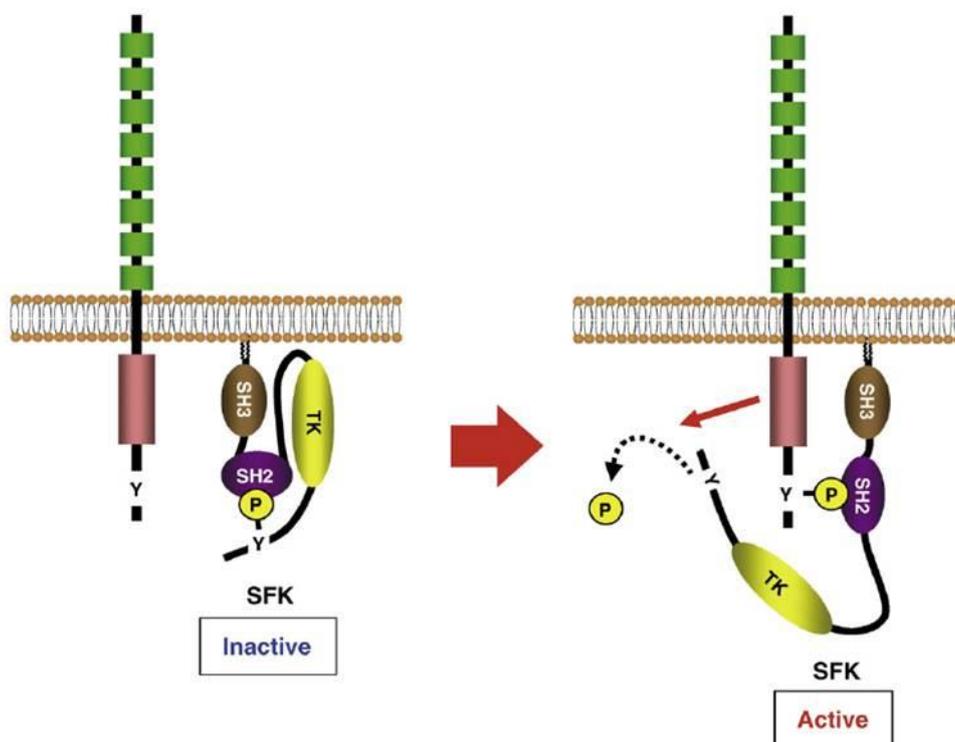


Abb. 13: Schematische Darstellung der Aktivierung einer Src-Familien-Kinase (SFK) durch eine Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP)

(Links) Die transmembranär gelegene PTP befindet sich im dephosphorylierten, inaktiven Zustand. Die Src-Familien-Kinase befindet sich in geschlossener, inaktiver Konfiguration. (Rechts) Die PTP wird am C-Terminus Tyrosin-phosphoryliert. Dadurch ändert sich ihre Konfiguration. Es bietet sich eine Bindungsstelle für die SH2-Domäne der SFK an. Diese Bindung führt zum Aufbrechen der geschlossenen Konfiguration der SFK und das phosphorylierte Tyrosin 527 der SFK wird exponiert. Anschließend wird Tyrosin 527 von der PTP dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung führt zur Aktivierung der SFK. Abbildung von: *Cellular Signalling* 2010; 22: 1812 [93]

In der Studie von Murata *et. al* wird ein weiterer Regulationsmechanismus für GLEPP1 und die SFK Fyn angenommen [75]. Sie konnten vor kurzem zeigen, dass die Tyrosin-Phosphorylierung am C-Terminus von GLEPP1 dessen Komplexbildung mit Fyn fördert. Sie zeigten, dass eine verstärkte Expression von Fyn, oder Src merklich die Tyrosin-Phosphorylierung von GLEPP1 induziert. In Folge dessen binden vermehrt SFKs an GLEPP1. Sie vermuteten, dass die SFKs wichtig für die Aktivierung von GLEPP1 sind und dessen Aktivität regulieren. Dieser Mechanismus könnte ein positiver *Feedback Loop* zur Aktivierung von SFKs darstellen.

Wir gehen davon aus, dass Src und evtl. auch Fyn Substrate von GLEPP1 sind. Murata *et. al* betrachten zudem GLEPP1 als Substrat der beiden SFKs. Dies stellt jedoch keinen direkten Widerspruch dar. Es ist denkbar, dass GLEPP1 sowohl von den SFKs aktiviert, als auch diese aktivieren kann. Die vermehrte Bindung der SFKs an das phosphorylierte GLEPP1 könnte auch dessen verstärkte Aktivierung nach sich ziehen. Dies konnte für VE-PTP bereits gezeigt werden. Es zeigte sich, dass die verstärkte Expression von VE-PTP zu einer erhöhten Aktivität von Src führt [76].

4.1.3 GLEPP1 stärkt die Interaktion von Nephrin mit Podocin, schwächt die Interaktion von Nephrin mit β -arrestin2 und reduziert die Nephrin Endozytose

Die von GLEPP1 induzierte erhöhte Aktivität von Src und Fyn konnte in dieser Arbeit indirekt durch die vermehrte Bindung von Podocin an Nephrin bzw. die verminderte Interaktion zwischen β -arrestin2 und Nephrin unter der Anwesenheit von GLEPP1 gezeigt werden. β -arrestin2 bindet Nephrin im dephosphorylierten Zustand und vermittelt so die Endozytose von Nephrin [56]. Da wir annehmen, dass GLEPP1 indirekt für eine vermehrte Nephrin-Phosphorylierung verantwortlich ist, erklärt sich hieraus die verminderte Interaktion zwischen Nephrin und β -arrestin2 unter GLEPP1. Im Umkehrschluss zeigte sich in den Experimenten dieser Arbeit, dass die Interaktion zwischen Nephrin und Podocin unter der Anwesenheit von GLEPP1 verstärkt wird. Wir nehmen an, dass GLEPP1 die SFKs durch Dephosphorylierung am Y527 aktiviert. Nephrin wird daraufhin von den SFKs vermehrt phosphoryliert. Podocin kann somit häufiger an den Tyrosin-phosphorylierten C-Terminus von Nephrin binden. Die Bindung von Nephrin an Podocin verhindert dessen Endozytose. Als Folge bleibt Nephrin in der glomerulären Schlitzmembran fest verankert [50, 53].

Im abschließend durchgeführten Zellmodell zeigten wir, dass die Endozytose von Nephtrin unter GLEPP1 vermindert ist. Das heißt im Gegenzug, dass Nephtrin durch den Einfluss von GLEPP1 vermehrt an der Zelloberfläche exprimiert ist. Die Tatsache, dass sich unter GLEPP1 eine verminderte Endozytose von Nephtrin zeigte, spricht für eine vermehrte Aktivierung der SFK durch GLEPP1. Verma *et al.* konnten bereits zeigen, dass die aktivierte Kinase-Domäne von Fyn Nephtrin phosphoryliert [52]. Dadurch kann Nephtrin vermehrt von Podocin gebunden und in der Schlitzmembran stabilisiert werden.

4.1.4 GLEPP1 und Proteinurie

Bisher ging man davon aus, dass GLEPP1 vor allem einen Einfluss auf die Podozytenmorphologie und die Regulation des Zytoskeletts hat. Einerseits ruft der nicht spezifische PTP-Inhibitor, Natrium Vanadat dramatische morphologische Veränderungen in kultivierten Maus Podozyten hervor [95]. Andererseits wurde gezeigt, dass GLEPP1-*Knock-Out*-Mäuse eine verminderte Anzahl und verkürzte Fußfortsätze ausbilden. Die GLEPP1-*Knock-Out* Podozyten zeigen ein phänotypisch verändertes Erscheinungsbild, mit amöboiden, abgestumpften und verbreiterten Fußfortsätzen. Außerdem entwickelten die GLEPP1-*Knock-Out*-Mäuse nach Uninephrektomie einen Hypertonus. Des Weiteren zeigt sich eine Abnahme der GFR bei GLEPP1-*Knock-Out*-Mäusen [72, 96]. Bei diesen GLEPP1-*Knock-Out*-Mäusen zeigte sich jedoch keine Proteinurie. Dies spricht gegen die Annahme, dass GLEPP1 essenziell für die Regulation und Integrität von Nephtrin in der glomerulären Schlitzmembran ist. Man würde unter dem fehlenden Einfluss von GLEPP1 die Entwicklung einer Proteinurie erwarten. Es handelte sich bei den GLEPP1-*Knock-Out*-Mäusen jedoch um Mäuse mit C57Bl6 Hintergrund, die überwiegend resistent gegen eine Proteinurie sind. Außerdem waren die Tiere sehr jung, ältere Tiere wurden nicht untersucht. Erst kürzlich konnte von uns gezeigt werden, dass GLEPP1-*Knock-Out*-Mäuse auf einem anderen Hintergrund eine Proteinurie ab sechs Monaten entwickeln. Auch weitere Studien lassen vermuten, dass GLEPP1 eine bedeutende Rolle in der Regulation des glomerulären Filters zukommt. Die Studie von Charba *et al.* verdeutlicht die Relevanz der Phosphatase-Aktivität von GLEPP1 für die Integrität des glomerulären Filters [74]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von GLEPP1 die glomeruläre Albumin-Permeabilität erhöhen. Die verwendeten Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von GLEPP1 verminderten zusätzlich dessen Phosphatase-Aktivität. Nach Inkubation von isolierten Ratten- und Kaninchen-Glomeruli mit diesen Antikörpern zeigte sich eine deutliche Zunahme der Albumin-Permeabilität der Glomeruli. Die Beziehung zwischen

verminderter Phosphatase-Aktivität von GLEPP1 und die Erhöhung der Albumin-Permeabilität lassen vermuten, dass eine tonische GLEPP1 Aktivität benötigt wird, um die normale Charakteristik der glomerulären Filterbarriere aufrecht zu erhalten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass GLEPP1 nicht nur von großer Bedeutung für die Podozytenmorphologie ist, sondern durch seine Phosphatase Aktivität auch essenziell an den physiologischen Funktionen und Regulationen des glomerulären Filters beteiligt ist.

4.2 Stärken und Schwächen der Arbeit

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Experimente passen alle in die aufgestellte Hypothese, dass Src ein Substrat von GLEPP1 ist. GLEPP1 spielt über diesen Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Regulation des glomerulären Filters. So gut die Ergebnisse unsere Hypothese bestärken, sollen an dieser Stelle auch einige Schwächen und Begrenzungen dieser Arbeit genannt werden. Es handelt sich bei den Experimenten um Überexpressions-Versuche, die in HEK 293T Zellen durchgeführt wurden. Das heißt die Interaktionen wurden in einem Zellmodell untersucht, in denen die zu untersuchenden Proteine auf ein vielfaches der physiologisch exprimierten Menge gesteigert wurden. Des Weiteren wurden die Experimente mit dem zytoplasmatischen Abschnitt von GLEPP1 (slg.GLEPP1 cyt oder V5.GLEPP1 cyt) durchgeführt und nicht mit dem vollständigen GLEPP1 Molekül (GLEPP1 *Full Length*). Da sich jedoch die Phosphatase-Domäne von GLEPP1 im zytoplasmatischen Abschnitt befindet, war es legitim die Versuche mit GLEPP1 cyt durchzuführen. Auch muss berücksichtigt werden, dass es sich um *in vitro* Versuche handelt und die Ergebnisse durch *in vivo* Versuche zukünftig bestätigt werden sollten. Da es sich aber um die Aufdeckung des Mechanismus eines Fließgleichgewichtes, eines molekularbiologischen Prozesses handelt, ist die Vereinfachung durch die Überexpression und der Durchführung der Versuche im Zellmodell für die Aufdeckung des Mechanismus gerechtfertigt. Das Verständnis dieser molekularbiologischen Prozesse und die Untersuchung eines regulatorischen Proteins des glomerulären Filters sind von großer klinischer Relevanz. Sie dienen dem besseren Verständnis einer Vielzahl von Nierenerkrankungen, die mit einer Proteinurie einhergehen.

5 Literaturverzeichnis

1. Sharif, K., et al., *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, 1998. 6(3): p. 234-44.
2. Tian, J., et al., *Reduced glomerular epithelial protein 1 expression and podocyte injury in immunoglobulin A nephropathy.* J Int Med Res, 2007. 35(3): p. 338-45.
3. Wang, R., et al., *Molecular cloning, expression, and distribution of glomerular epithelial protein 1 in developing mouse kidney.* Kidney Int, 2000. 57(5): p. 1847-59.
4. Coresh, J., et al., *Prevalence of chronic kidney disease in the United States.* JAMA, 2007. 298(17): p. 2038-47.
5. Hallan, S.I., et al., *International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk.* J Am Soc Nephrol, 2006. 17(8): p. 2275-84.
6. Wen, C.P., et al., *All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan.* Lancet, 2008. 371(9631): p. 2173-82.
7. Chadban, S.J., et al., *Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study.* J Am Soc Nephrol, 2003. 14(7 Suppl 2): p. S131-8.
8. Lysaght, M.J., *Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications.* J Am Soc Nephrol, 2002. 13 Suppl 1: p. S37-40.
9. Perneger, T.V., et al., *End-stage renal disease attributable to diabetes mellitus.* Ann Intern Med, 1994. 121(12): p. 912-8.
10. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization.* N Engl J Med, 2004. 351(13): p. 1296-305.
11. Mann, J.F., et al., *Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial.* Ann Intern Med, 2001. 134(8): p. 629-36.
12. Abbate, M., et al., *Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic.* Nephrol Dial Transplant, 1999. 14(2): p. 304-12.
13. Wang, Y., et al., *Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein.* J Am Soc Nephrol, 1997. 8(10): p. 1537-45.
14. Tang, S., et al., *Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo.* J Clin Invest, 2003. 111(4): p. 515-27.
15. Schreiner, G.F., *Renal toxicity of albumin and other lipoproteins.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 1995. 4(4): p. 369-73.

-
16. Peruzzi, L., et al., *Tubulointerstitial responses in the progression of glomerular diseases: albuminuria modulates alpha v beta 5 integrin*. *Kidney Int*, 1996. 50(4): p. 1310-20.
 17. Kees-Folts, D., J.L. Sadow, and G.F. Schreiner, *Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid*. *Kidney Int*, 1994. 45(6): p. 1697-709.
 18. Donadelli, R., et al., *Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kappaB- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. 14(10): p. 2436-46.
 19. Bakoush, O., et al., *High proteinuria selectivity index based upon IgM is a strong predictor of poor renal survival in glomerular diseases*. *Nephrol Dial Transplant*, 2001. 16(7): p. 1357-63.
 20. Sandsmark, D.K., et al., *Proteinuria, but Not eGFR, Predicts Stroke Risk in Chronic Kidney Disease: Chronic Renal Insufficiency Cohort Study*. *Stroke*, 2015. 46(8): p. 2075-80.
 21. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria*. *N Engl J Med*, 2006. 354(13): p. 1387-401.
 22. Ballermann, B.J., *Glomerular endothelial cell differentiation*. *Kidney Int*, 2005. 67(5): p. 1668-71.
 23. Avasthi, P.S. and V. Koshy, *Glomerular endothelial glycocalyx*. *Contrib Nephrol*, 1988. 68: p. 104-13.
 24. Henry, C.B. and B.R. Duling, *Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan*. *Am J Physiol*, 1999. 277(2 Pt 2): p. H508-14.
 25. Hudson, B.G., S.T. Reeders, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. *J Biol Chem*, 1993. 268(35): p. 26033-6.
 26. Hudson, B.G., et al., *Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. *N Engl J Med*, 2003. 348(25): p. 2543-56.
 27. Zenker, M., et al., *Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities*. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(21): p. 2625-32.
 28. Noakes, P.G., et al., *The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1*. *Nat Genet*, 1995. 10(4): p. 400-6.
 29. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. *Physiol Rev*, 2003. 83(1): p. 253-307.

-
30. Rodewald, R. and M.J. Karnovsky, *Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse*. J Cell Biol, 1974. 60(2): p. 423-33.
 31. Kestila, M., et al., *Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome*. Mol Cell, 1998. 1(4): p. 575-82.
 32. Tryggvason, K., *Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm*. J Am Soc Nephrol, 1999. 10(11): p. 2440-5.
 33. Schnabel, E., J.M. Anderson, and M.G. Farquhar, *The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium*. J Cell Biol, 1990. 111(3): p. 1255-63.
 34. Cho, E.A., et al., *Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development*. Development, 1998. 125(5): p. 803-12.
 35. Inoue, T., et al., *FAT is a component of glomerular slit diaphragms*. Kidney Int, 2001. 59(3): p. 1003-12.
 36. Donoviel, D.B., et al., *Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN*. Mol Cell Biol, 2001. 21(14): p. 4829-36.
 37. Gerke, P., et al., *Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1*. J Am Soc Nephrol, 2003. 14(4): p. 918-26.
 38. Sellin, L., et al., *NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins*. FASEB J, 2003. 17(1): p. 115-7.
 39. Boute, N., et al., *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. 24(4): p. 349-54.
 40. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. 115(Pt 3): p. 455-65.
 41. Thomas, P.E., et al., *GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit*. J Biol Chem, 1994. 269(31): p. 19953-62.
 42. Wartiovaara, J., et al., *Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography*. J Clin Invest, 2004. 114(10): p. 1475-83.
 43. Lehtonen, S., et al., *Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin-Darby canine kidney cells expressing nephrin*. Am J Pathol, 2004. 165(3): p. 923-36.
 44. Reiser, J., et al., *The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction*. J Am Soc Nephrol, 2000. 11(1): p. 1-8.

-
45. Huber, T.B., et al., *The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1*. J Biol Chem, 2003. 278(15): p. 13417-21.
46. Welsch, T., et al., *CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. 281(4): p. F769-77.
47. Liu, G., et al., *Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability*. J Clin Invest, 2003. 112(2): p. 209-21.
48. Topham, P.S., et al., *Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin*. J Clin Invest, 1999. 104(11): p. 1559-66.49. Benzing, T., *Signaling at the slit diaphragm*. J Am Soc Nephrol, 2004. 15(6): p. 1382-91.
50. Li, H., et al., *SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin*. J Am Soc Nephrol, 2004. 15(12): p. 3006-15.
51. Lahdenpera, J., et al., *Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases*. Kidney Int, 2003. 64(2): p. 404-13.
52. Verma, R., et al., *Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin*. J Biol Chem, 2003. 278(23): p. 20716-23.
53. Schwarz, K., et al., *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. J Clin Invest, 2001. 108(11): p. 1621-9.
54. Huber, T.B., et al., *Interaction with podocin facilitates nephrin signaling*. J Biol Chem, 2001. 276(45): p. 41543-6.
55. Huber, T.B., et al., *Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains*. Hum Mol Genet, 2003. 12(24): p. 3397-405.
56. Quack, I., et al., *beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(38): p. 14110-5.
57. Goodman, O.B., Jr., et al., *Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor*. Nature, 1996. 383(6599): p. 447-50.
58. Claing, A., et al., *beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis*. J Biol Chem, 2001. 276(45): p. 42509-13.
59. Dykstra, M., et al., *Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling*. Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 457-81.
60. Thomas, S.M. and J.S. Brugge, *Cellular functions regulated by Src family kinases*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. 13: p. 513-609.

-
61. Brown, M.T. and J.A. Cooper, *Regulation, substrates and functions of src*. Biochim Biophys Acta, 1996. 1287(2-3): p. 121-49.
62. Juliano, R.L., *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 283-323.
63. Crossin, K.L. and L.A. Krushel, *Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily*. Dev Dyn, 2000. 218(2): p. 260-79.
64. Yu, C.C., et al., *Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn*. Curr Biol, 2001. 11(1): p. 34-8.
65. Wiggins, R.C., et al., *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, 1995. 27(1): p. 174-81.
66. Andersen, J.N., et al., *Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains*. Mol Cell Biol, 2001. 21(21): p. 7117-36.
67. Beltran, P.J., J.L. Bixby, and B.A. Masters, *Expression of PTPRO during mouse development suggests involvement in axonogenesis and differentiation of NT-3 and NGF-dependent neurons*. J Comp Neurol, 2003. 456(4): p. 384-95.
68. Aguiar, R.C., et al., *PTPROt: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest*. Blood, 1999. 94(7): p. 2403-13.
69. Pixley, F.J., et al., *A heteromorphous protein-tyrosine phosphatase, PTP phi, is regulated by CSF-1 in macrophages*. J Biol Chem, 1995. 270(45): p. 27339-47.
70. Wu, L.W., D.J. Baylink, and K.H. Lau, *Molecular cloning and expression of a unique rabbit osteoclastic phosphotyrosyl phosphatase*. Biochem J, 1996. 316 (Pt 2): p. 515-23.
71. Tagawa, M., et al., *Identification of a receptor-type protein tyrosine phosphatase expressed in postmitotic maturing neurons: its structure and expression in the central nervous system*. Biochem J, 1997. 321 (Pt 3): p. 865-71.
72. Wharram, B.L., et al., *Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptpro)-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate*. J Clin Invest, 2000. 106(10): p. 1281-90.
73. Alonso, A., et al., *Protein tyrosine phosphatases in the human genome*. Cell, 2004. 117(6): p. 699-711.
74. Chabot, C., et al., *New role for the protein tyrosine phosphatase DEP-1 in Akt activation and endothelial cell survival*. Mol Cell Biol, 2009. 29(1): p. 241-53.

-
75. Murata, Y., et al., *Tyrosine phosphorylation of R3 subtype receptor-type protein tyrosine phosphatases and their complex formations with Grb2 or Fyn*. Genes Cells, 2010. 15(5): p. 513-24.
76. Mori, M., et al., *Promotion of cell spreading and migration by vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase (VE-PTP) in cooperation with integrins*. J Cell Physiol, 2010. 224(1): p. 195-204.
77. Charba, D.S., et al., *Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb))*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 297(1): p. F138-44.
78. Ozaltin, F., et al., *Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome*. Am J Hum Genet, 2011. 89(1): p. 139-47.
79. Delville, M., et al., *A circulating antibody panel for pretransplant prediction of FSGS recurrence after kidney transplantation*. Sci Transl Med, 2014. 6(256): p. 256ra136.
80. Chen, C. and H. Okayama, *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Mol Cell Biol, 1987. 7(8): p. 2745-52.
81. Loyter, A., et al., *Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy*. Exp Cell Res, 1982. 139(1): p. 223-34.
82. Gultekin, H. and K.H. Heermann, *The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix*. Anal Biochem, 1988. 172(2): p. 320-9.
83. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(9): p. 4350-4.
84. Ruotsalainen, V., et al., *Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(14): p. 7962-7.
85. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. 1(1): p. 31-9.
86. Kurzchalia, T.V. and R.G. Parton, *Membrane microdomains and caveolae*. Curr Opin Cell Biol, 1999. 11(4): p. 424-31.
87. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. 387(6633): p. 569-72.
88. Collett, M.S. and R.L. Erikson, *Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. 75(4): p. 2021-4.
89. Ostman, A., Q. Yang, and N.K. Tonks, *Expression of DEP-1, a receptor-like protein-tyrosine-phosphatase, is enhanced with increasing cell density*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(21): p. 9680-4.

-
90. Kuramochi, S., et al., *Molecular cloning and characterization of Byp, a murine receptor-type tyrosine phosphatase similar to human DEP-1*. FEBS Lett, 1996. 378(1): p. 7-14.
91. Krueger, N.X., M. Streuli, and H. Saito, *Structural diversity and evolution of human receptor-like protein tyrosine phosphatases*. EMBO J, 1990. 9(10): p. 3241-52.
92. Fachinger, G., U. Deutsch, and W. Risau, *Functional interaction of vascular endothelial-protein-tyrosine phosphatase with the angiopoietin receptor Tie-2*. Oncogene, 1999. 18(43): p. 5948-53.
93. Matozaki, T., et al., *Expression, localization, and biological function of the R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases in mammals*. Cell Signal, 2010. 22(12): p. 1811-7.
94. Roskoski, R., Jr., *Src protein-tyrosine kinase structure and regulation*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. 324(4): p. 1155-64.
95. Reiser, J., et al., *Regulation of mouse podocyte process dynamics by protein tyrosine phosphatases rapid communication*. Kidney Int, 2000. 57(5): p. 2035-42.
96. Takemoto, M., et al., *Large-scale identification of genes implicated in kidney glomerulus development and function*. EMBO J, 2006. 25(5): p. 1160-74.
97. *QIAfilter Plasmid Purification Handbook* von QIAgen, 2012 04: p. 15-19

6 Anhang

Protokoll von Kapitel 2.4.3 Maxi-Präparation (Seite 30) vom Maxi QIAfilter™ Plasmid Kit von QIAGEN [97]:

Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kits

This protocol is designed for preparation of up to 100 µg of high- or low-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAfilter Plasmid Midi Kit, or up to 500 µg using the QIAfilter Plasmid Maxi Kit. In this protocol, QIAfilter Cartridges are used instead of conventional centrifugation to clear bacterial lysates. For purification of double-stranded M13 replicative-form DNA, see the recommendations at www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.

Low-copy plasmids which have been amplified in the presence of chloramphenicol should be treated as high-copy plasmids when choosing the appropriate culture volume.

Plasmid Midi
and Maxi Kits

Table 3. Maximum recommended culture volumes*

	QIAfilter Midi	QIAfilter Maxi
High-copy plasmids	25 ml	100 ml
Low-copy plasmids	50–100 ml	250 ml†

* For high-copy plasmids, expected yields are 75–100 µg for the QIAfilter Plasmid Midi Kit and 300–500 µg for the QIAfilter Plasmid Maxi Kit. For low-copy plasmids, expected yields are 20–100 µg for the QIAfilter Plasmid Midi Kit and 50–250 µg for the QIAfilter Plasmid Maxi Kit using these culture volumes.

† The maximum recommended culture volume applies to the capacity of the QIAfilter Maxi Cartridge. If higher yields of low-copy plasmids are desired, the lysates from two QIAfilter Maxi Cartridges can be loaded onto one QIAGEN-tip 500.

Important points before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.
- If working with low-copy vectors, it may be beneficial to increase the lysis buffer volumes to increase the efficiency of alkaline lysis, and thereby the DNA yield. In case additional Buffers P1, P2, and P3 are needed, their compositions are provided in Appendix B: Composition of Buffers, on page 36. Alternatively, the buffers and additional QIAfilter Cartridges may be purchased separately.
- **Optional:** Remove samples at the indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 33).
- In contrast to the standard protocol, the lysate is not incubated on ice after addition of Buffer P3.
- Blue (marked with a ▲) denotes values for the QIAfilter Plasmid Midi Kit; red (marked with a ●) denotes values for the QIAfilter Plasmid Maxi Kit.

Things to do before starting

- Add the provided RNase A solution to Buffer P1 before use. Use 1 vial RNase A (centrifuge briefly before use) per bottle Buffer P1 for a final concentration of 100 µg/ml.
- Check Buffer P2 for SDS precipitation due to low storage temperatures. If necessary, dissolve the SDS by warming to 37°C.
- Prechill Buffer P3 at 4°C.
- **Optional:** Add the provided LyseBlue reagent to Buffer P1 and mix before use. Use 1 vial LyseBlue reagent per bottle Buffer P1 for a final dilution of 1:1000 (e.g., 10 µl LyseBlue into 10 ml Buffer P1). LyseBlue provides visual identification of optimum buffer mixing, thereby preventing the common handling errors that lead to inefficient cell lysis and incomplete precipitation of SDS, genomic DNA, and cell debris. For more details see "Using LyseBlue reagent" on page 14.

Procedure

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approx. 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.

2. **Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into selective LB medium. For high-copy plasmids, inoculate ▲ 25 ml or ● 100 ml medium with ▲ 25–50 µl or ● 100–200 µl of starter culture. For low-copy plasmids, inoculate ▲ 50–100 ml or ● 250 ml medium with ▲ 100–200 µl or ● 250–500 µl of starter culture. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**

Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately $3\text{--}4 \times 10^9$ cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium (see page 11).

3. **Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x g for 15 min at 4°C.**
 - ⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at –20°C.
4. **Resuspend the bacterial pellet in ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P1.**

For efficient lysis it is important to use a vessel that is large enough to allow complete mixing of the lysis buffers. Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

5. Add ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO₂ in the air.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

During the incubation prepare the QIAfilter Cartridge:

Screw the cap onto the outlet nozzle of the QIAfilter Midi or QIAfilter Maxi Cartridge.

Place the QIAfilter Cartridge in a convenient tube.

6. Add ▲ 4 ml or ● 10 ml chilled Buffer P3 to the lysate, and mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times. Proceed directly to step 7. Do not incubate the lysate on ice.

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulfate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution. It is important to transfer the lysate into the QIAfilter Cartridge immediately to prevent later disruption of the precipitate layer.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

7. **Pour the lysate into the barrel of the QIAfilter Cartridge. Incubate at room temperature for 10 min. Do not insert the plunger!**

Important: This 10 min incubation at room temperature is essential for optimal performance of the QIAfilter Midi or QIAfilter Maxi Cartridge. Do not agitate the QIAfilter Cartridge during this time. A precipitate containing proteins, genomic DNA, and detergent will float and form a layer on top of the solution. This ensures convenient filtration without clogging. If, after the 10 min incubation, the precipitate has not floated to the top of the solution, carefully run a sterile pipet tip around the walls of the cartridge to dislodge it.

8. **Equilibrate a ▲ QIAGEN-tip 100 or ● QIAGEN-tip 500 by applying ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**

Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

9. **Remove the cap from the QIAfilter Cartridge outlet nozzle. Gently insert the plunger into the ▲ QIAfilter Midi or ● QIAfilter Maxi Cartridge and filter the cell lysate into the previously equilibrated QIAGEN-tip.**

Filter until all of the lysate has passed through the QIAfilter Cartridge, but do not apply extreme force. Approximately ▲ 10 ml and ● 25 ml of the lysate are generally recovered after filtration.

Optional: Remove a ▲ 240 µl or ● 120 µl sample of the filtered lysate and save for an analytical gel (sample 1) to determine whether growth and lysis conditions were optimal.

10. **Allow the cleared lysate to enter the resin by gravity flow.**

Optional: Remove a ▲ 240 µl or ● 120 µl sample from the flow-through and save for an analytical gel (sample 2) to determine the efficiency of DNA binding to the QIAGEN resin.

11. **Wash the QIAGEN-tip with ▲ 2 x 10 ml or ● 2 x 30 ml Buffer QC.**

Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow. The first wash is sufficient to remove all contaminants in the majority of plasmid DNA preparations. The second wash is especially necessary when large culture volumes or bacterial strains producing large amounts of carbohydrates are used.

Optional: Remove a ▲ 400 µl or ● 240 µl sample from the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

12. **Elute DNA with ▲ 5 ml or ● 15 ml Buffer QF.**

Collect the eluate in a 15 ml or 50 ml tube (not supplied). Use of polycarbonate centrifuge tubes is not recommended as polycarbonate is not resistant to the alcohol used in subsequent steps.

Note: For constructs larger than 45–50 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield.

Optional: Remove a ▲ 100 µl or ● 60 µl sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

- ⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, store the eluate at 4°C. Storage periods longer than overnight are not recommended.

- 13. Precipitate DNA by adding ▲ 3.5 ml or ● 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at $\geq 15,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.**

All solutions should be at room temperature to minimize salt precipitation, although centrifugation is carried out at 4°C to prevent overheating of the sample. Alternatively, disposable conical bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at $5000 \times g$ for 60 min at 4°C. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be more easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

- 14. Wash DNA pellet with ▲ 2 ml or ● 5 ml of room-temperature 70% ethanol, and centrifuge at $\geq 15,000 \times g$ for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.**

Alternatively, disposable conical-bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at $5000 \times g$ for 60 min at 4°C. The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

- 15. Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10 mM Tris-Cl, pH 8.5).**

Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover the DNA, especially if glass tubes have been used. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

Determination of yield

To determine the yield, DNA concentration should be determined by both UV spectrophotometry at 260 nm and quantitative analysis on an agarose gel. For reliable spectrophotometric DNA quantification, A_{260} readings should lie between 0.1 and 1.0.

Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine the stage of the purification procedure where the problem occurred (see page 33).

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit mit Rat und Tat unterstützt, gefördert und motiviert haben und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt:

Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump, in dessen gut strukturiertem, hoch professionellem Labor ich arbeiten, forschen und lernen durfte.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lorenz Sellin, der mich für die spannende Arbeit im Labor begeistert und hervorragend betreut hat. Und der mir die Forschung an diesem interessanten Thema überlassen und damit diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat.

Größter Dank gebührt meiner engagierten, zuverlässigen, immer hilfsbereiten und überaus qualifizierten Betreuerin Dr. med. Eva Königshausen. Ich bin dankbar für ihre Unterstützung und für alles, was ich von ihr lernen durfte.

Des Weiteren gilt mein Dank den technischen Assistenten des Labors. Besonders Blanka Duvnjak, die mit viel Herzblut und bemerkenswertem Engagement dieses Labor zu einem gut strukturierten und organisierten Ort macht.

Ich möchte mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranten bedanken, darunter Dr. med. Sebastian Potthoff und Dr. med. Martin Rütze.

Zu guter Letzt möchte ich den Menschen aus meinem privaten Umfeld danken. Meinem lieben Mann Eugen, der mir mit den Kindern den Rücken freigehalten und ausdauernd immer wieder diese Arbeit korrigiert hat. Annette Grün, die durch ihr hartnäckiges Nachfragen dafür gesorgt hat, dass ich diese Arbeit tatsächlich zu Ende bringe. Janina Schmid die so manches Komma gesetzt hat. Judith Böddeker, die mich auf den letzten Metern immer wieder neu motiviert hat weiterzuschreiben. Und natürlich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und so vieles im Leben ermöglicht haben.