

Aus der Klinik für Nephrologie

Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Rump

Die EphB-Rezeptoren und ihre Funktion für den Podozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nils Haep

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. L. Sellin

Zweitgutachter: PD Dr. med. F. Simon

I. Publikationen

Vorträge

EphB2 receptor mediates podocyte repulsion in vitro. 27th Meeting of the European Renal Cell Study Group, Dublin, Irland 2015.

Koenigshausen E, Hoffacker J, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

Nephrin hemmt die EphB-Rezeptor vermittelte Repulsion von Podozyten, 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 2016.

Koenigshausen E, Heimann LLP, Hoffacker J, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

Poster

Mechanismus für Adhäsion und Repulsion an der Schlitzmembran. 4. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 2012.

Koenigshausen E, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

EphB receptors modulate nephrin tyrosinephosphorylation: potential mechanism for adhesion and repulsion at the slit. 9th International Podocyte Conference, Miami, USA, 2012

Koenigshausen E, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

EphB Receptors Modulate the Nephrintyrosine Phosphorylation: A Potential Mechanism for Adhesion and Repulsion at the Slit Membrane. J Am Soc Nephrol 23: 2012, Kidney Week, San Diego, USA, 2012.

Koenigshausen E, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

EphB-Receptors Mediate Nephrin Tyrosine Phosphorylation – Mechanism for Adhesion and Repulsion. J Am Soc Nephrol 24: 2013, ASN Kidney Week, Atlanta, USA, 2013.

Koenigshausen E, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

Adhesion and Repulsion of Podocytes: Role of EphB-Receptors. J Am Soc Nephrol 26: 2015, ASN Kidney Week, San Diego, USA 2015.

Koenigshausen E, Hoffacker J, Heimann LLP, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

Adhesion and Repulsion of Podocytes: Role of EphB-Receptors. 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 2015.

Koenigshausen E, Hoffacker J, Heimann LLP, **Haep N**, Woznowski M, Quack I, Rump LC, Sellin L

II. Zusammenfassung

Die Höhe der Proteinurie ist bei Nephropathien von großer prognostischer Bedeutung. Eine häufige Ursache der Proteinurie ist eine Schädigung des glomerulären Filters. Die Podozyten sind Bestandteil des glomerulären Filters und bilden zwischen ihren Fußfortsätzen die Schlitzmembran aus. Zwischen den Oberflächenproteinen gegenüberliegender Podozyten werden Mikroporen ausgebildet durch die der Primärharn aus dem Plasma filtrierte wird. Diese durch Proteine gebildete Filtrationsbarriere befindet sich in einem dynamisch regulierten physiologischen Gleichgewicht zwischen Aufbau, Abbau, Adhäsion und Repulsion. Von großer Bedeutung für dieses Gleichgewicht ist die Nephrintyrosinphosphorylierung. In dieser Arbeit wurde der Effekt der EphB-Rezeptoren auf die Nephrintyrosinphosphorylierung und die damit verbundene Bedeutung für den Podozyten und die Schlitzmembran untersucht.

Die Expression des EphB-Rezeptors und seines ephrinb-Liganden wurde in humanen und murinen Zellen mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Um Proteininteraktionen zu untersuchen, wurden Immunopräzipitationen durchgeführt und für Phosphorylierungsexperimente Src-Kinasen mit dem PP2-Kinaseinhibitor gehemmt. Um die Bedeutung von einzelnen Tyrosinen und Tyrosinkinasedomänen zu untersuchen, wurden modifizierte Proteine verwendet. Die SDS-Gelelektrophorese und der Western-Blot dienten zur Proteinanalyse. Die Nitrocellulosemembran wurde mit spezifischen Antikörpern inkubiert und mithilfe der Chemolumineszenz für die Densitometrie sichtbar gemacht.

Wir konnten zeigen, dass die Liganden ephrinb1-3 und ihre Rezeptoren EphB1-3 in humanen und murinen Podozyten exprimiert werden. Unsere Ergebnisse zeigen eine Phosphorylierung des Oberflächenproteins Nephrin an Tyrosin 1176, 1193 und 1217 durch den EphB-Rezeptor und eine Beteiligung von Src-Kinasen. Die EphB-Rezeptor-vermittelte Nephrintyrosinphosphorylierung wird durch die Tyrosinkinasedomäne des EphB-Rezeptors vermittelt. Sie beeinflusst außerdem die Nephrin- β -Arrestin2 und die Nephrin-Nck2-Bindung. Unsere Ergebnisse indizieren eine Dephosphorylierung von Nephrintyrosin durch Stimulation der EphB-Rezeptoren mit dem ephrinb-Liganden. Es konnte eine Interaktion des EphB-Rezeptors mit Regulatorproteinen des Zytoskeletts gezeigt werden.

Wir stellen folgende Hypothese auf: EphB-Rezeptoren haben eine regulatorische und stabilisierende Funktion auf die Schlitzmembran. Durch Tyrosinphosphorylierungen am Oberflächenprotein Nephrin wird die homodimere Bindung von Nephrinmolekülen mit gegenüberliegenden Podozyten bewirkt und die Schlitzmembran stabilisiert. Die Bindung des EphB-Rezeptors an seinen Liganden ephrinb führt zu einer Reduktion der Nephrintyrosinphosphorylierung und zur Durchlässigkeit des glomerulären Filters. Hierdurch ergibt sich ein dynamisches Regulationsmodell für ephrin und Eph an der Schlitzmembran. Nach der Bestätigung dieser Ergebnisse im Tiermodell stellt die ephrin-Eph-Familie ein potentiell Ziel für eine medikamentöse Therapie von glomerulären Erkrankungen dar.

III. Summary

Proteinuria is highly relevant in nephropathies. A common cause for proteinuria is the damage of the glomerular filter. Podocytes are part of the glomerular filter and the slit membrane is formed between the podocyte's foot processes. The surface proteins between adjacent foot processes form micropores through which the primary urine is filtrated. This filtration barrier is formed by proteins dynamically regulated in a physiological balance between build-up, breakdown, adhesion and repulsion. The nephrin tyrosine phosphorylation is important for this equilibrium. We investigated the effect of the EphB receptors on the nephrin tyrosine phosphorylation and the significance for the podocyte and the glomerular filter.

The expression of the EphB receptor and the ephrinb ligand was tested in human and murine cells via PCR (polymerase chain reaction). To test protein interactions immunoprecipitations have been performed. For phosphorylation experiments src kinases have been incubated with the PP2 kinase inhibitor. In order to test the significance of tyrosine kinase domains, modified cDNA was used. SDS electrophoresis and western blot were used for protein analysis. The membranes were incubated with specific antibodies and visualized for densitometric analysis.

We were able to show that the ligands ephrinb1-3 and their receptors EphB1-3 are expressed in human and murine podocytes. Our results show a phosphorylation of the nephrin protein at its tyrosine's 1176, 1193 and 1217 through the EphB receptor and src kinases. The nephrin tyrosine phosphorylation by the EphB receptor is mediated by its tyrosine kinase domain. The tyrosine kinase domain also mediates the nephrin- β arrestin2 binding and the nephrin-nck2 binding. Our results indicate a dephosphorylation of the nephrin tyrosine through stimulation of the EphB receptors with their ligand ephrinb. Interaction of the EphB receptor with regulatory proteins of the cytoskeleton could be shown.

We hypothesize that the EphB receptor has a regulatory and stabilizing function on the slit membrane. Through phosphorylation of the nephrin tyrosine a homodimer binding between adjacent podocytes stabilizes the slit membrane. The binding of the EphB receptor and its ligand ephrinb reduces nephrin tyrosine phosphorylation and increases permeability of the glomerular filter. This describes a dynamically regulated model for ephrin and Eph at the slit membrane. After confirmation of this model in vivo the ephrin-Eph family can be potential target for medical treatment of glomerular nephropathies.

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethlyendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorecence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetal Bovines Serum
HEK	<i>Human Embryonal Kidney Cells</i>
HEPES	2-Ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
ICM	Intrazelluläre Matrix
Ig	Immunglobulin
KD	Kinase Down
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sIg	<i>Surface Immunoglobulin</i>
Tabl.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
VLE	<i>Very Low Endoxidation</i>
WT	Wildtyp

V. Inhaltsverzeichnis

I. Publikationen.....	3
II. Zusammenfassung.....	5
III. Summary.....	6
IV. Abkürzungsverzeichnis.....	7
V. Inhaltsverzeichnis.....	7
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Glomerulum.....	1
1.2 Das fenestrierte Endothel.....	2
1.3 Die Glomeruläre Basalmembran.....	2
1.4 Die Podozyten und ihre Schlitzmembran.....	3
1.5 Nephrin.....	3
1.6 Podocin.....	5
1.7 β -Arrestin2.....	5
1.8 Nck2.....	6
1.9 Die ephrin-Eph-Familie.....	7
1.10 Src-Kinasen.....	8
1.11 Das podozytäre Zytoskelett.....	9
1.12 Ziele der Arbeit.....	10
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Material.....	12
2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	12
2.1.2 Chemikalien.....	12
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	14
2.1.4 Antikörper.....	16
2.1.5 Oligonukleotide.....	17
2.1.6 Kommerzielle Kits.....	18
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1 RNA-Isolierung.....	18
2.2.2 Reverse Transkription.....	19
2.2.3 PCR.....	19
2.3 Biochemische Methoden.....	20
2.3.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	20
2.4 Zellbiologische Methoden.....	20
2.4.1 Zellkultivierung.....	20
2.5 Statistische Methoden.....	21

2.6	Tierversuchsgenehmigung	21
3	Ergebnisse.....	22
3.1	Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 werden in humanen und murinen Zellen exprimiert	22
3.2	EphB1 und EphB2 interagieren mit FAK und IQGAP1.....	23
3.3	Die Liganden ephrinb1 und ephrinb1 interagieren mit dem Nephrin-Protein	25
3.4	Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit Nephrin-Protein.....	25
3.5	Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrintyrosinphosphorylierung 26	
3.5.1	Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermittelt die Nephrintyrosinphosphorylierung	27
3.5.2	Src-Kinasen vermitteln die Nephrintyrosinphosphorylierung.....	28
3.5.3	Der Ligand ephrinb1 verringert die Nephrintyrosinphosphorylierung	30
3.6	Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrin-Nck2-Bindung.....	32
3.6.1	Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermittelt die Nephrin-Nck2-Bindung.....	32
3.6.2	Src-Kinasen vermitteln die Nephrin-Nck2-Bindung	33
3.7	Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 reduzieren die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung .	35
3.7.1	Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermindert die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung	35
3.7.2	Src-Kinasen sind nicht an der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrin- β -Arrestin2-Bindung beteiligt	36
3.8	Der EphB2-Rezeptor hat keinen Einfluss auf die Nephrinendozytose	38
4	Diskussion.....	40
4.1	Nephrintyrosinphosphorylierung – Funktionelle Bedeutung für den Podozyten und die Beeinflussung durch EphB-Rezeptoren.....	41
4.2	Funktionelle Bedeutung der Nephrinendozytose für die Entstehung einer Proteinurie 44	
4.3	Podozytäres Zytoskelett – Bedeutung von Adhäsion und Repulsion.....	44
4.4	Schlussfolgerungen.....	46
4.5	Selbstkritik	46
5	Literaturverzeichnis.....	47
6	Anhang.....	53
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	53
6.2	Tabellenverzeichnis.....	53
6.3	Danksagung	54

1 Einleitung

Als Nierensinsuffizienz bezeichnet man das Unvermögen harnpflichtige Substanzen auszuscheiden. Eine fortgeschrittene Niereninsuffizienz macht eine Nierenersatztherapie wie beispielsweise die Hämodialyse, Hämofiltration oder Peritonealdialyse notwendig. Diese gehen mit einer Einschränkung der Lebensqualität, Lebenserwartung und hohen Kosten einher. Die Nierentransplantation ist aufgrund des geringen Angebotes an Spenderorganen nur bedingt durchführbar. In Deutschland warteten 2017 etwa 8000 terminal niereninsuffiziente Patienten auf eine Nierentransplantation. Dem standen 1941 Nierentransplantationen gegenüber. Die durchschnittliche Wartezeit beträgt zurzeit etwa 6-7 Jahre (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2018).

Liegt die Eiweißausscheidung im menschlichen Urin über 300 mg pro Tag spricht man von einer Proteinurie. Einen besonders hohen prognostischen Wert für den Verlauf einer Nephropathie hat die Höhe der Proteinurie und insbesondere die Ausscheidung von Albumin. Proteinurische Nierenerkrankungen enden häufig in der Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit oder einer Transplantation. Durch ein besseres Verständnis der Pathogenese und die Entwicklung kausaler Therapien könnten terminale Nierenerkrankungen hinausgezögert oder sogar verhindert werden.

Man kann proteinurische Nierenerkrankungen in angeborene und nicht-angeborene proteinurische Nierenerkrankungen unterteilen. Nicht-angeborene proteinurische Nierenerkrankungen sind häufig Folgen einer diabetischen, hypertensiven oder autoimmunen Nephropathie. Angeborene proteinurische Nierenerkrankungen bilden eine heterogene Gruppe bei der häufig ein glomerulärer oder tubulärer Schaden vorliegt.

Die Therapie der angeborenen proteinurischen Nierenerkrankungen ist in der Regel symptomatisch. Hierfür werden ACE-Hemmer oder AT1-Rezeptorantagonisten verwendet und ggf. eine Immunsuppression durchgeführt. Ein besseres Verständnis über die Regulation der Schlitzmembran und die beteiligten Proteine ist für die Entwicklung einer kausalen Therapie essentiell.

1.1 Das Glomerulum

Das Herz transportiert in Ruhe etwa 5 Liter Blut pro Minute durch unseren Körper und etwa 20% hiervon durch die Nierenarterien. Von dort gelangt das Blut durch die Nierengefäße in

die Glomeruli. Das Wort Glomerulus leitet sich vom lateinischen Wort „*Glomus*“ für Knäuel ab. Die Glomeruli bestehen aus einem Gefäßknäuel, das von der sogenannten Bowman-Kapsel umgeben ist. An der Filtrationsbarriere des Glomerulums wird täglich etwa 180 Liter Primärharn abgepresst, welcher durch das Tubulussystem fließt, in dem ein großer Teil des Primärharns zurückresorbiert wird. Es entsteht eine Urinmenge von 1 bis 2 Litern täglich, die über die Blase ausgeschieden wird.

Die Filtrationsbarriere des Glomerulums besteht von innen nach außen aus dem fenestrierten Endothel, der glomerulären Basalmembran und der podozytären Schlitzmembran. Die podozytäre Schlitzmembran bildet sich zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten aus. An ihrer Oberfläche exprimieren Podozyten Proteine, die zwischen den benachbarten Zellen einen Filter bilden, durch die der Primärharn filtriert wird.

1.2 Das fenestrierte Endothel

Das fenestrierte Endothel bildet die dem Blut zugewandte Seite der Filtrationsbarriere. Die Endothelzellen sind auf die Gefäßinnenseite spezialisierte Zellen. Sie bilden Poren mit einem Durchmesser von 70 bis 100 nm. Auf der Oberfläche des Endothels befinden sich negativ geladene Sialoproteine und Proteoglykane (Avasthi and Koshy, 1988; Henry and Duling, 1999).

1.3 Die Glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran befindet sich zwischen dem fenestrierten Endothel und der podozytären Schlitzmembran. Sie besteht unter anderem aus Kollagen Typ IV, Proteoglykanen, Laminin und Nidogen (Hudson et al., 1993). Das Kollagen Typ IV bildet mit seinen Querverknüpfungen eine stabile Basis für die Filtrationsbarriere. Mutationen im Kollagen Typ IV führen zum Alport-Syndrom. Das Alport-Syndrom ist eine häufige vererbte chronisch progrediente Nierenerkrankung mit Nierenversagen. Es kommt zunächst zur Hämaturie und Proteinurie (Barker et al., 1990). Eine frühe Diagnose durch Gendiagnostik und die Therapie mit ACE-Hemmern können den Verlauf der Erkrankung verlangsamen.

1.4 Die Podozyten und ihre Schlitzmembran

Podozyten sind spezialisierte viszerale Epithelzellen, die sich an der dem Urin zugewandten Seite der Filtrationsbarriere befinden. Sie bilden Fußfortsätze aus, die sich in primäre und sekundäre Fußfortsätze aufgliedern. Die primären Fußfortsätze liegen auf der Basalmembran und umschließen die glomerulären Kapillaren. Von den primären Fußfortsätzen ausgehend erstrecken sich die sekundären Fußfortsätze. Zwischen den sekundären Fußfortsätzen benachbarter Podozyten bildet sich die Schlitzmembran aus (Kriz et al., 1998; Pavenstädt et al., 2003; Rodewald and Karnovsky, 1974).

Podozyten und ihre Fußfortsätze besitzen Aktin-Filamente, die über α -actinin4 miteinander verbunden sind. Mutationen im α -actinin4 führen zur FSGS1 (*focal segmental glomerular sclerosis*) (Kaplan et al., 2000). Bei der FSGS kommt es zur Abstoßung gegenüberliegender Podozyten. Ihre sekundären Fußfortsätze verplumpen und ziehen sich zurück. Durch die Destruktion der Schlitzmembran kommt es zur Proteinurie (Kos et al., 2003).

1.5 Nephrin

Nephrin ist das erste Protein, das an der Schlitzmembran lokalisiert wurde. Eine Mutation im NPHS1-Gen für Nephrin führt zum angeborenen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (Kestilä et al., 1998). Eine intravenöse Injektion von Anti-Nephrin-Antikörpern führt zu einer Proteinurie (Topham et al., 1999).

Nephrin ist ein Typ-1 Transmembranrezeptor. Sein extrazellulärer N-Terminus besteht aus acht Ig-ähnlichen Domänen und einer Fibronectin-ähnlichen Domäne (Gerke et al., 2003). Die Nephrine benachbarter Podozytenfortsätze interagieren miteinander und bilden Homodimere aus. Durch die Bildung von Homodimeren wird die Schlitzmembran stabilisiert. Nephrin wird auch als Rückgrat der Schlitzmembran bezeichnet (Khoshnoodi et al., 2003). Tryggvason et al. stellten die Theorie auf, dass sich zwischen den Nephrinmolekülen und den anderen Schlitzmembranproteinen Mikroporen ausbilden, durch die der Primärharn aus dem Plasma filtriert wird (Wartiovaara et al., 2004).

Das Protein Nephrin ist an der Regulation der glomerulären Filtration beteiligt. Die Phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils des Nephrin-Proteins wird durch die Src-Kinasen Fyn und Yes vermittelt (Verma et al., 2003). Der intrazelluläre C-Terminus besitzt mehrere Tyrosine. Es konnte gezeigt werden, dass Tyrosin 1176, Tyrosin 1193 und Tyrosin

1217 wichtig für die Nephrintyrosinphosphorylierung durch Src-Kinasen sind (Li et al., 2004). Das phosphorylierte Nephrin-Protein interagiert mit den Src-Kinasen Fyn und Nck (Jones et al., 2006; Verma et al., 2006, 2003). Die Anwesenheit der Nck-Kinase führt zur Aktin-Polymerisation und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Buday et al., 2002; Jones et al., 2006). Durch die Nephrintyrosinphosphorylierung wird eine Kaskade aktiviert, welche stabilisierend auf die Schlitzmembran wirkt (Schiffer et al., 2004).

Es gibt zwei etablierte Theorien zur Bedeutung der Nephrintyrosinphosphorylierung und der damit verbundenen Bindung der Nck-Kinase. Holzman et al. stellten die Theorie auf, dass die Nephrintyrosinphosphorylierung vor allem in der embryonalen Phase und bei Schädigung des Filters auftritt. Die Nephrintyrosinphosphorylierung führt anschließend über eine Bindung des Proteins Nephrin an die Nck-Kinase zu einer Reorganisation des Zytoskeletts. Ziel dieser Reorganisation ist die Ausbildung bzw. Rückbildung hin zu einer intakten Schlitzmembran (Verma, 2006).

Eine zweite Theorie nach New et al. besagt, dass die Nephrintyrosinphosphorylierung auch im physiologischen Gleichgewicht der Schlitzmembran vorkommt. Die Aktivierung des Zytoskeletts über die Nck-Kinase verstärkt die Nephrintyrosinphosphorylierung. Dies führt zu Stabilisierung des Zytoskeletts und damit der Schlitzmembran (New et al., 2013).

Quack et al. stellten die Theorie auf, dass die Nephrintyrosinphosphorylierung ein dynamisches Gleichgewicht der Stabilität an der Schlitzmembran reguliert. Die Dephosphorylierung von Nephrintyrosin führt zur Bindung mit dem intrazellulären Protein β -Arrestin2. Hierdurch kommt es zur Nephrinendozytose. Durch die verminderte Nephrinexpression an der Podozytenoberfläche ist die Integrität der Schlitzmembran herabgesetzt (Quack et al., 2006).

Die Nephrintyrosinphosphorylierung an Tyrosin 1193 führt zu einer Bindung des Oberflächenproteins Nephrin mit dem Protein Podocin (Quack et al., 2006). Das Podocin-Protein ist wichtig für die Integration und Stabilisation des Oberflächenproteins Nephrin in die *lipid rafts* der Schlitzmembran (Huber et al., 2003).

Als *lipid rafts* bezeichnet man wenig fluide Membranabschnitte. Die einzelnen Lipidmoleküle der Zellmembran können sich in der Doppellipidschicht wie in eine zweidimensionale Flüssigkeit bewegen. Man spricht in diesem Zusammenhang von Fluidität. Ein hoher Anteil von gesättigten Alkylresten und Cholesterinen kann die Fluidität eines

Abschnittes herabsetzen. Da sich dieser Teil wie ein Floß durch die Membran bewegen kann hat sich hier der Begriff "*lipid raft*" etabliert.

1.6 Podocin

Das Protein Podocin wird an der Schlitzmembran von Podozyten exprimiert und besitzt eine intrazelluläre NH₂- und eine intrazelluläre COOH-Domäne. Der mittlere Teil des Proteins ist in der Zellmembran verankert (Roselli et al., 2002). Eine Mutation im NPHS2-Gen, welches für das Podocin-Protein kodiert, führt zum steroidresistenten nephrotischen Syndrom (Boute et al., 2000).

Das Podocin-Protein ist in *lipid rafts* organisiert (Schwarz et al., 2001). Es spielt eine wichtige Rolle in der Integration des Nephrin-Proteins in die *lipid rafts* und erhöht so bei Bindung mit dem Nephrin-Protein die Stabilität der Schlitzmembran (Huber et al., 2003).

1.7 β -Arrestin2

Arrestine sind Proteine des Zellplasmas, die an der Internalisierung von Rezeptoren beteiligt sind. Es gibt vier Mitglieder aus der Familie der Arrestin-Proteine. Die Proteine Arrestin 1 und 4 sind bisher ausschließlich an den Zapfen und Stäbchen der Retina gefunden worden. Die Proteine Arrestin 2 und 3 werden in nahezu allen Geweben exprimiert. Das Protein Arrestin 2 wird auch als β -Arrestin1 bezeichnet, weil es zuerst am β -adrenergen Rezeptor gefunden wurde. Für das Protein Arrestin 3 wird die Bezeichnung β -Arrestin2 synonym verwandt.

Die Proteine β -Arrestin1 und β -Arrestin2 werden in Podozyten exprimiert (Quack et al., 2006). Dephosphoryliertes Tyrosin 1193 am C-Terminus des Nephrin-Proteins hat eine vermehrte Nephrin- β -Arrestin2-Bindung zur Folge und es kommt zur Nephrinendozytose (Quack et al., 2006). Die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung setzt somit die Integrität der Schlitzmembran herab. Damit ist das β -Arrestin2-Protein ein Teil des dynamischen Gleichgewichts der Stabilität an der Schlitzmembran (Quack et al., 2006).

1.8 Nck2

Das Protein Nck2 gehört zur Familie der Adapterproteine. Es besteht aus einer SH2 und mehreren SH3-Domänen. Eine Bindung von phosphoryliertem Nephrintyrosin an die SH2-Domäne des Nck-Proteins führt über die SH3-Domäne des Nck-Proteins zur Aktivierung des Proteins Fyn. Fyn, ein Mitglied der Src-Kinasen, phosphoryliert wiederum das Oberflächenprotein Nephrin. Durch diesen Mechanismus kommt es zur autologen Verstärkung der Nephrintyrosinphosphorylierung (New et al., 2013).

Das Nck-Protein ist ein Adapterprotein, das das Nephrin-Protein mit dem Zytoskelett verbindet. Die Nephrintyrosinphosphorylierung am C-Terminus führt zur Interaktion der Proteine Nephrin und Nck (Jones et al., 2006; Li et al., 2006). Das Nck-Protein aktiviert mithilfe seiner SH3-Domäne Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts. Die SH3-Domäne interagiert mit dem N-WASp-Protein, welches den Arp2/3-Proteinkomplex und die Proteinkinase Pak aktiviert (Lu et al., 1997; Rohatgi et al., 2001). Dies führt zu Polymerisation des Aktin-Proteins und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Buday et al., 2002; Jones et al., 2006).

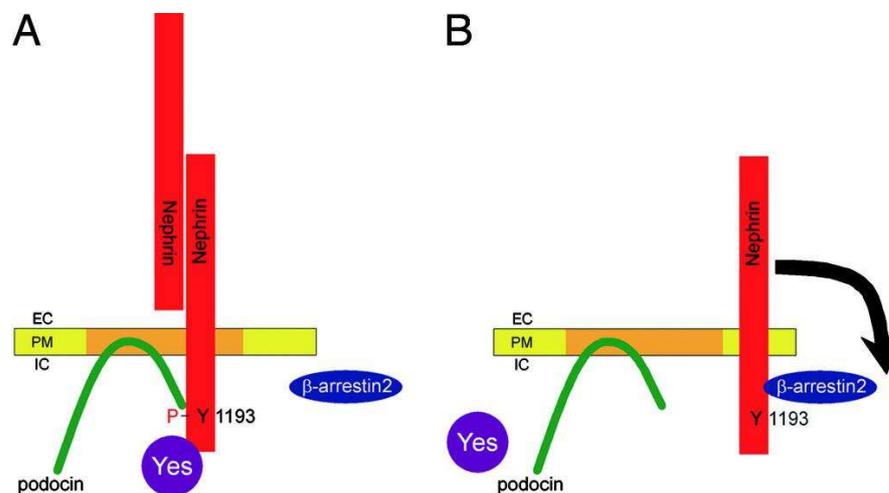


Abbildung 1: Modell der dynamischen Regulation an der Schlitzmembran nach Quack et al.
(A) Stabilisierung - Extrazelluläre Bindung des Oberflächenproteins Nephrin führt zur Nephrintyrosinphosphorylierung an Y1193 durch Src-Kinasen (z.B. Yes). Das Protein Podocin bindet an das phosphorylierte Nephrin-Protein und stabilisiert die Schlitzmembran in lipid rafts (Orange). **(B) Destabilisierung** - Dephosphorylierung an Nephrintyrosin Y1193 führt zu vermehrter Nephrin- β -Arrestin2-Bindung und zur Nephrinendozytose (Quack et al., 2006). EC: Extrazellulärraum, PM: Plasmamembran, IC: Intrazellulärraum. *Copyright (2006) National Academy of Sciences*

1.9 Die ephrin-Eph-Familie

Die ephrin-Liganden und die Eph-Rezeptoren sind membrangebundene Proteine und bilden Ligand-Rezeptor-Paare aus (Kullander and Klein, 2002; Pasquale, 2005). Sie wurden in der *erythropoietin producing human hepatocellular carcinoma cell line* erstmalig gefunden. Aus dieser Zelllinie und dem griechischen Wort *ephoso*, welches mit Aufseher übersetzt werden kann, leitet sich ihr Name ab (Eph Nomenclature Committee, 1997). Sie stellen die größte Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen dar und haben in der embryonalen Entwicklung und in der adulten Organhomöostase zahlreiche Funktionen (Kullander and Klein, 2002).

Eph-Rezeptoren werden in zwei Gruppen eingeteilt. Die EphA-Rezeptoren binden bevorzugt an ephrin-a-Liganden und die EphB-Rezeptoren binden bevorzugt an ephrin-b-Liganden. Die Nummerierung erfolgte in der Reihenfolge ihrer Entdeckung. Bisher sind 13 Familienmitglieder bekannt (Eph Nomenclature Committee, 1997).

Funktionell sind ephrin-Eph-Moleküle an der Bildung von Gewebsgrenzen, wie z.B. an der Ausbildung von Axonen, Zellmigration und Gefäßentwicklung beteiligt (Martínez and Soriano, 2005; Palmer and Klein, 2003; Pasquale, 2005; Poliakov et al., 2004; Yamaguchi and Pasquale, 2004). Der ephrinb1-Ligand reguliert außerdem die parazelluläre Permeabilität von renalen Tubuluszellen (Ogawa et al., 2006). Der EphB2-Rezeptor wurde unter anderem in kolorektalen Tumoren gefunden und ist dort Teil des *gene silencing* (Alazzouzi et al., 2005).

Eine Besonderheit der ephrin-Eph-Familie liegt darin, dass der ephrin-Ligand auch als Rezeptor dienen kann. In diesem Fall spricht man von *reverse signaling*. *Forward* und *reverse signaling* sind gut geeignet um Zell-Zell-Kontakte auszubilden, da sich beide Zellen sich gegenseitig regulieren können und ein *feedback* bekommen. Dieser Mechanismus ist wichtiger Bestandteil von Adhäsion und Repulsion aneinandergrenzender Zellen und Gewebe (Mellitzer et al., 1999). Die Bindung des Liganden ephrin an seinen Rezeptor Eph führt in Prostatakarzinomzellen zu einer Zellrepulsion mithilfe der Kinase FAK (*focal adhesion kinase*), einem Regulator des Zytoskeletts (Miao et al., 2000). Eph-Rezeptoren sind über *Rho-family-GTPasen* an der Regulation des Zytoskeletts von renalen Tubuluszellen beteiligt (Ogawa et al., 2006).

Die Liganden ephrinb1 und ephrinb2 werden in Rattenpodozyten exprimiert. In der Transmissionselektronenmikroskopie wurde der ephrinb1-Ligand an der Schlitzmembran

nachgewiesen. Hier zeigte sich eine Co-Lokalisation mit dem Oberflächenprotein Nephrin und es konnte eine Interaktion des ephrinb1-Liganden mit dem Nephrin-Protein gezeigt werden. Auch die Rezeptoren EphB1 und EphB2 werden in Rattenglomeruli exprimiert (Hashimoto et al., 2007).

Die Bindung von Eph-Rezeptoren und ihren ephrin-Liganden führt zur Aktivierung des Rezeptors (Davis et al., 1994). Die Rezeptoraktivierung führt zu Autophosphorylierung und Tyrosinphosphorylierung durch andere Kinasen (Kalo and Pasquale, 1999). Der EphB-Rezeptor ist an der Src-Kinasen-vermittelten Phosphorylierung von Rezeptoren beteiligt (Takasu et al., 2002).

1.10 Src-Kinasen

Die Src-Kinasen gehören zu den nicht-rezeptorgebundenen Tyrosinkinase. Für die Entdeckung der Src-Kinasen erhielten J. Michael Bishop und Harold E. Varmus 1989 den Nobelpreis für Physiologie. Tyrosinkinase sind Enzyme aus der Familie der Proteinkinase. Durch Phosphorylierung von Hydroxygruppen der Aminosäure Tyrosin können sie Signale in Rezeptorensystemen übertragen. Die Kinasen Fyn, Src und Yes aus der Familie der Src-Kinasen werden in Podozyten exprimiert (Verma et al., 2003). Mäuse ohne Fyn-Kinase leiden unter einer Proteinurie mit Verplumpung der podozytären Fußfortsätze (Schiffer et al., 2004).

Die Inhibition von Src-Kinasen durch den PP2-Kinaseinhibitor *in vivo* führt zu einer vorübergehenden Proteinurie (Vinke, 2011). Ursächlich hierfür könnte die Funktion der Src-Kinasen für den Nephrin-C-Terminus sein, da der Nephrin-C-Terminus durch Src-Kinasen phosphoryliert wird (Lahdenperä et al., 2003). Dephosphorylierung führt über Bindung mit dem β -Arrestin2-Protein zur Nephrinendozytose (Quack et al., 2006) Auch eine Interaktion von Src-Kinasen mit dem β -Arrestin2-Protein ist beschrieben (Lefkowitz and Shenoy, 2005).

Aus anderen Geweben ist bekannt, dass der EphB-Rezeptor an der Src-Kinasen-vermittelten Phosphorylierung von Rezeptoren beteiligt ist (Takasu et al., 2002).

1.11 Das podozytäre Zytoskelett

Für die Funktion des Podozyten und die Ausbildung von Fußfortsätzen ist sein Zytoskelett von großer Bedeutung. Verschiedene Proteine wie z.B. Nck, FAK und IQGAP1 sind an der Regulation beteiligt (Briggs and Sacks, 2003; Buday et al., 2002; Ma et al., 2010). Podozyten und ihre Fußfortsätze besitzen Aktin-Filamente, die über α -actinin4 miteinander verbunden sind. Mutationen im α -actinin4-Protein führen zur FSGS1 (*focal segmental glomerular sclerosis*) mit Rückbildung der sekundären Fußfortsätze. Hierdurch ist die Filtrationsbarriere gestört und es kommt zur Proteinurie (Kaplan et al., 2000). Die Aktinfilamente sind über Verbindungsproteine mit der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran verbunden (Drenckhahn and Franke, 1988). Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in Podozyten führt zu Repulsion an der Schlitzmembran und Rückbildung der sekundären Fußfortsätze (Schmieder et al., 2004; Takeda et al., 2001).

Die Bindung der Proteine Nephrin und Nck ist wichtig für die Organisation und Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett. Das Nck-Adapterprotein bindet das N-WASp-Protein, welches über den Arp2/3-Komplex die Proteinkinase Pak aktiviert (Lu et al., 1997; Rohatgi et al., 2001). Dies führt zu Polymerisation der Aktin-Proteine und Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Buday et al., 2002; Jones et al., 2006).

FAK (*focal adhesion kinase*) ist eine Kinase, die an den fokalen Adhäsionen vieler Zell-Zell-Kontrakte exprimiert wird. Die FAK-Kinase ist an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt und es interagiert mit dem Schlitzmembranprotein Paxillin (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996; Hildebrand et al., 1995). In Podozyten schützt die Inhibition von FAK-Kinasen vor Proteinurie und Repulsion der podozytären Fußfortsätze (Ma et al., 2010). In Prostatakarzinomzellen sind FAK-Kinasen an der Repulsion beteiligt, die durch eine ephrin-Eph-Bindung ausgelöst wird (Miao et al., 2000).

Das Protein Paxillin wird an fokalen Adhäsionen exprimiert und interagiert mit FAK-Kinasen und dem Protein Vinculin. Das Vinculin-Protein ist an der Aktinbindung und dessen Regulation beteiligt (Turner et al., 1990). Das Protein Paxillin ist ein wichtiger Regulator bei der Aktivierung von FAK-Kinasen (Ishibe et al., 2004).

Das Gerüstprotein IQGAP1 (*Ras GTPase-activating-like protein*) gehört zum Nephrin-Multiproteinkomplex in podozytären Fußfortsätzen (Rigothier et al., 2012). Es ist ein

Adapterprotein des Aktin-Zytoskeletts, welches an Zell-Zell-Kontakten zu finden ist und Aktinquerverknüpfungen reguliert (Bashour et al., 1997; Noritake et al., 2005). Das Protein IQGAP1 ist an Aktin-vermittelter Zellform und Migration durch Inhibition der GTPase-Aktivität von der Kontrollproteine Cdc42 und Rac1 beteiligt (Brill et al., 1996). Hierdurch kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts (Briggs and Sacks, 2003).

Das Protein 4.1O (*Ovary type protein 4.1*) ist ein Mitglied der Familie der 4.1 Proteine und wird hauptsächlich in Ovarien exprimiert. Es spielt eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung von Zellmembranen und dem Zytoskelett (Ni et al., 2003). Aus diesem Grund wurde es als Positivkontrolle bei der Untersuchung von Proteininteraktionen mit FAK-Kinasen und dem Gerüstprotein IQGAP1 verwendet.

1.12 Ziele der Arbeit

Hashimoto et al. erbrachten den Nachweis, dass der ephrinb1-Ligand an der Schlitzmembran von Ratten exprimiert wird. Außerdem zeigten sie die Expression von EphB1- und EphB2-Rezeptoren in den Glomeruli und Podozyten von Ratte und Maus (Hashimoto et al., 2007). In dieser Arbeit gehe ich der Frage nach, ob die Expression von der Rezeptoren EphB1 und EphB2 sowie deren Liganden ephrinb1 und ephrinb2 auch in humanen Podozyten stattfindet und ob dies auch für den ephrinb3-Liganden und den EphB3-Rezeptor gilt.

Bei den Eph-Rezeptoren handelt es sich wie oben beschrieben um die größte Gruppe der Tyrosinkinase. Die Eph-Rezeptoren phosphorylieren Tyrosine des NMDA-Rezeptors mithilfe von Src-Kinasen (Takasu et al., 2002). Daher sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob EphB-Rezeptoren auch bestimmte Tyrosine im Nephrin-C-Terminus phosphorylieren. Falls ja, ob Src-Kinasen hieran beteiligt sind und welche Bedeutung die Tyrosinkinasedomäne des Eph-Rezeptors in diesem Zusammenhang hat.

Quack et al. stellten das Modell der dynamischen Regulation an der Schlitzmembran auf. Hierin spielt die Nephrintyrosinphosphorylierung eine entscheidende Rolle (Quack et al., 2006). In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welchen Effekt der EphB-Rezeptor auf dieses Modell hat. Dies beinhaltet die Fragestellung, ob der EphB-Rezeptor die Bindung der Proteine Nephrin mit Nck2 und β -Arrestin2 moduliert und die Endozytose des β -Arrestin2-Proteins reguliert.

Die Bindung des Eph-Rezeptors an seinen Liganden ephrin führt in anderen Zellreihen zur Repulsion der Zellen. Die FAK-Kinase, ein Regulator des Zytoskeletts, ist hieran beteiligt (Miao et al., 2000). In dieser Arbeit sollte deshalb näher untersucht werden, ob EphB-Rezeptoren auch in Podozyten mit wichtigen Regulatoren des Zytoskeletts interagieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Auflistung der Geräte und ihrer Hersteller

Gerät	Hersteller
37°-Schüttler Multitron	Infors HT, Bottmingen
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank HeraCell 150	ThermoScientific, Dreieich
Imager FC2	Alpha InnoTech, Kasendorf
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 4KR	ThermoScientific, Dreieich
Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien und ihrer Hersteller

Chemikalien	Hersteller
2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid 30	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol, Hamburg
Ampicillin Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin (BSA)	VWR, Langenfeld
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Coumarin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Fetales Bovines Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	J.T.Baker, Deventer Niederlande
LB Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LB Broth Base	Invitrogen, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	J.T. Baker, Deventer Niederlande
NHS-LC-Biotin	ICN, Warschau Polen
PBS ohne Ca & Mg	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polysorbat 20	Merck, Darmstadt
PP2	Merck, Darmstadt
Prestrained Protein Marker (7-175kDa)	New England Biolabs, Frankfurt
Protein A Sepharose	GE Healthcare, München
Protein G Sepharose	GE Healthcare, München
Proteinaseinhibitor Complete Mini	Roche, Mannheim
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Biomol, Hamburg
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
Tetrazyklinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCL	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VLE-DMEM Nährmedium	Biochrom AG, Berlin
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Carl-Roth, Karlsruhe

2.1.3 Puffer und Lösungen

1%-Triton-X100-Lysispuffer:	20 mM Tris HCL pH 7 5,1 mM EDTA pH 8,0 150 mM KCL 1% Triton-X-100, 1 mM Na ₃ VO ₄ 44 µM PMSF Complete Mini (1 Tabl./50 ml)
2xHeBS (<i>HEPES-buffered saline</i>):	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,05
2xLämmli:	1 M Tris HCL 120 mM SDS 2,74 M Glycerin 0,4% Brompehnolblau
ECL:	100 mM Tris pH 8,5 1,25 mM Luminol 200 µM Coumarin 0,75% H ₂ O ₂
Laufpuffer:	191,8 mM Glycin 24 mM Tris Base 3,5 mM SDS

PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>):	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS mit Calcium und Magnesium:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ pH 8,0
PBS mit Calcium, Magnesium und Biotin:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ pH 8,0 0,9 mM Biotin
PBS mit Calcium, Magnesium und Glycin:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂ pH 8,0 100 mM Glycin
Proteinwaschpuffer:	130 mM NaCl 13 mM TrisHCl pH 7,3 210 µM Polysorbat 5% BSA (<i>Bovine serum albumin</i>)

Sammelgel mit 5% Acrylamid und SDS:	5% Acrylamid 242 mM Tris HCl 8 mM Tris Base 7 mM SDS pH 6,8 APS 10 µl/ml TEMED 1,5 µl/ml
Transferpuffer:	31 mM Tris Base 240 mM Glycin, 20% Methanol
Trenngel mit 10% Acrylamid und SDS:	10% Acrylamid 180 mM Tris HCl 570 mM Tris Base 7 mM SDS pH 8,8 APS 10 µl/ml TEMED 1,5 µl/ml
VLE-DMEM Nährmedium:	Glutamin 3,5 g/l NaHCO ₃ 4,5 g/l D-Glucose 10% FBS

2.1.4 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper mit Hersteller und verwendeter Verdünnung

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-4G10, <i>Mouse</i>	Merck, Darmstadt	1:1500
Anti-EphB1, <i>Mouse</i>	CellSignaling, Leiden Niederlande	1:400
Anti-EphB2, <i>Rabbit</i>	Santa Cruz, Heidelberg	1:500

Anti- <i>Guineapig</i> HRP, <i>Donkey</i>	Merck, Darmstadt	1:40000
Anti-hIgG HRP, <i>Sheep</i>	GE Healthcare, München	1:500
Anti-M2, <i>Mouse</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:400
Anti- <i>Mouse</i> HRP, <i>Goat</i>	Dako, Hamburg	1:15000
Anti-Nephrin, <i>Guinea pig</i>	Progen, Heidelberg	1:250
Anti- <i>Rabbit</i> HRP, <i>Donkey</i>	GE Healthcare, München	1:7500
Anti-V5, <i>Mouse</i>	Invitrogen, Darmstadt	1:5000
Streptavidin HRP, rekombinant	ThermoScientific, Dreieich	1:500

2.1.5 Oligonukleotide

Tabelle 4: Primer mit Sequenz und Basenpaaren

Gen	Sequenz (5`-3`)	Basenpaare
Ephrin-b1 <i>human forward</i>	ATCATGAAGGTTGGGCAAGATC	88
Ephrin-b1 <i>human reverse</i>	TGACAGTGTGTCTGCCTCCT	
Ephrin-b2 <i>human forward</i>	CTCAACTGTGCCAAACCAGAC	147
Ephrin-b2 <i>human reverse</i>	GTTATCCAGGCCCTCCAAAG	
Ephrin-b3 <i>human forward</i>	CGAAAACCTGTGTCTGAAATG	108
Ephrin-b3 <i>human reverse</i>	GGAGGTTGCATTGCTGGTG	
Eph-B1 <i>human forward</i>	AAACGGGCTTATAGCAAAGAGG	109
Eph-B1 <i>human reverse</i>	CCTCGTAAGTGAAGGGGTCAA	
Eph-B2 <i>human forward</i>	GAACGGTGTGACTGACCAGAG	137
Eph-B2 <i>human reverse</i>	ACCACGACAGGGTGATGCT	
Eph-B3 <i>human forward</i>	GACCCTCATGGACACAAAATGG	155
Eph-B3 <i>human reverse</i>	GCCAGTTGTTCTGGCTTGACT	
Ephrin-b1 <i>mouse forward</i>	ATCATGAAGGTTGGGCAAGATC	88
Ephrin-b1 <i>mouse reverse</i>	TGACAGTGTGTCTGCCTCCT	
Ephrin-b2 <i>mouse forward</i>	CTCAACTGTGCCAGACCAGAC	147

Ephrin-b2 <i>mouse reverse</i>	GTTATCCAGGCCCTCCAAAG	
Ephrin-b3 <i>mouse forward</i>	GCCCTGCTGCTGTTAGGTTT	123
Ephrin-b3 <i>mouse reverse</i>	CCCGATCTGAGGATAAAGCAC	
Eph-B1 <i>mouse forward</i>	AAACGGGCTTATAGCAAAGAGG	114
Eph-B1 <i>mouse reverse</i>	GGGGTCCTCATAAGTGAATGG	
Eph-B2 <i>mouse forward</i>	GAACGGTGTGACTGACCAGAG	137
Eph-B2 <i>mouse reverse</i>	ACCACGACAGGGTGATGCT	
Eph-B3 <i>mouse forward</i>	TAACGCTGTGGAGGTCTCTGT	162
Eph-B3 <i>mouse reverse</i>	CCTTGCTTTGCTTTGTA ACTCC	

2.1.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Kits und ihre Hersteller

Kit	Hersteller
Maxiprep Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy-Mini-Plus Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Kit	Qiagen, Hilden

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus murinem Gewebe fand mit dem RNeasy-Mini Kit der Firma Qiagen statt. Zunächst wurden die Zellen oder Gewebeproben in Stücken zu maximal 30 mg in RNALater-Lösung eingefroren. Die Proben wurden nach Herstellerangaben mit 600 µl RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol in 5 ml für 30 bis 40 Sekunden mit dem TissueRuptor bei 21000 x g homogenisiert und anschließend 3 Minuten bei 21000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine gDNA-Säule und anschließend auf eine RNA-Säule überführt und

nach Herstellerangaben zentrifugiert und gewaschen. Die entstandene RNA wurde bei Bedarf bei -20°C gelagert. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die RNA-Isolierung aus Zellen fand mit dem RNeasy-Mini-Plus Kit der Firma Qiagen statt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 300g pelletiert und in 350 bis 600 µl RLT-Puffer resuspendiert. Das Lysat wurde auf einen QIAshredder gegeben und 2 Minuten bei 21000 x g zentrifugiert. Zur aufgefangenen Flüssigkeit wurden 300 bis 550 µl 70%-tiges Ethanol je nach RLT-Volumen hinzugegeben. Das Gemisch wurde auf eine RNA-Säule und diese nach Herstellerangaben gewaschen. Die entstandene RNA wurde bei -20°C gelagert. Alle vorherigen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die PCR mit RNA aus humanem Nierengewebe wurde bereits isolierte RNA „*FirstChoice Human Kidney Total RNA*“ der Firma *Abio by life technologies* verwendet.

2.2.2 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription fand mit dem QuantiTect-Kit der Firma Qiagen statt. Jede Probe aus 750 µg RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit 2 µl gDNA Wipeout Buffer (7x) und mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde 3 Minuten bei 42°C inkubiert. Im Anschluss fanden alle Schritte auf Eis statt. Um den Abbau der genomischen DNA zu kontrollieren wurden 0,5 µl für eine Kontroll-PCR entnommen. Der RT-Mix wurde mit 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer (5x), 1 µl RT Primer Mix und 0,5 µl RNase-freiem Wasser angesetzt. Es wurden je 6,5 µl RT-Mix zu 14 µl Verdauansatz hinzugegeben. Die Proben wurden 25 Minuten bei 42°C inkubiert und die RT im Anschluss 3 Minuten bei 95°C inaktiviert. Die DNS wurde im Anschluss für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.2.3 PCR

Für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde ein Eppendorf Mastercycler verwendet. Jeder Ansatz bestand aus der zu vervielfältigen DNA, RNase freiem Wasser, 10x Puffer, dNTP, dem Primer und der Taq-Polymerase. Zunächst wurden die DNA-Doppelstränge für 15 Minuten bei 95°C voneinander gelöst. Im Anschluss daran wurden 35 Zyklen aus jeweils drei Schritten wiederholt. Die Denaturation wurde für 30 Sekunden bei 95°C durchgeführt. Die Primerhybridisierung fand für 30 Sekunden bei 58 °C statt. Die Elongation erfolgte für

30 Sekunden bei 72°C. Im Anschluss an die 35 Zyklen wurde die Temperatur von 72°C für 5 Minuten beibehalten und anschließend auf 4°C gesenkt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Für die Proteinelektrophorese wurden 10%-tige SDS-Gele verwendet. Es wurden 15 µl der Proteinproben in eine Tasche geladen und ein Western-Blot angefertigt. Die Nitrocellulosemembran wurde mit 5% BSA in Proteinwaschpuffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper wurden eine Stunde lang inkubiert und unspezifische Bindungen 15 Minuten mit Proteinwaschpuffer abgewaschen. Ebenso wurde auch mit dem sekundären Antikörper verfahren. Die HRP (*horseradish peroxidase*) des Sekundärantikörpers wurde mithilfe von ECL (*enhanced chemiluminescence*) für die Analyse sichtbar gemacht.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultivierung

Die HEK293T-Zellen wurden auf 10cm-Schalen mit VLE-DMEM und 5% FBS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle 2 Tage im Verhältnis 1/8 subkultiviert. Hierfür wurden sie zunächst mit PBS gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin versetzt und bei 37°C und 5% CO₂ für 5 min inkubiert. Die Trypsinreaktion wurde mit VLE-DMEM mit FBS gestoppt. Die Subkultivierung auf neue Kulturschalen fand im Anschluss statt.

Die transiente Transfektion wurde mithilfe der Calciumphosphatmethode durchgeführt. Hierfür wurden mehrere cDNS-Konstrukte von 3-5 µg pro Eppendorfgefäß mit 500 µl 0,25 M CaCl₂ versetzt und 10 bis 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden unter vortexen 500 µl 2xHeBS hinzugegeben. Die am Vortag subkultivierten HEK293T-Zellen wurden gleichmäßig mit der Lösung bedeckt. Für jeden Messpunkt wurden zwei 10 cm Schalen mit HEK293T-Zellen verwendet. Nach 6-8 stündiger Kultivierung bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Kristalle durch einen Wechsel des Nährmediums entfernt.

Versuche mit Inhibition der Src-Kinasen wurden mit einem Gemisch aus VLE-DMEM Nährmedium und 10 µM PP2 für 60 Minuten stimuliert. Als Trägersubstanz und Kontrolle

diente hier DMSO. Bei Phosphorylierungsversuchen war dem VLE-DMEM nach Transfektion kein FBS beigelegt. Bei Endozytoseversuchen wurden vier 10cm Schalen mit subkultivierten HEK293T-Zellen für jeden Messpunkt verwendet.

Bei der Zellernte wurden die Zellen mit PBS bei 4°C mechanisch gelöst und anschließend mit 600 × g für 5 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 200 bis 500 µl 1%-Tritonlysispuffer, je nach Anzahl der Zellen, 15 Minuten auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellreste mit 15-minütiger Zentrifugation bei 21000 × g und 4°C abzentrifugiert. Eine Immunopräzipitation wurde im Anschluss durchgeführt.

Zellen für Endozytoseversuche wurden mit Calcium und Magnesium enthaltendem PBS mechanisch gelöst. Vier 10 cm Schalen wurden zu einem Messpunkt gepoolt. Das PBS wurde durch Zentrifugation mit 600 × g für 5 Minuten entfernt. Im Anschluss wurden 5 ml PBS mit Calcium, Magnesium und Biotin hinzugegeben. Danach wurden die Zellen auf dem Überkopfschüttler für 30 Minuten invertiert. Anschließend wurde das PBS mit Biotin durch Zentrifugation mit 600 × g für 3 Minuten entfernt. Zum Abwaschen unspezifischer Bindungen wurden 5 ml PBS mit Calcium, Magnesium und Glycin auf die Zellen gegeben und 20 Minuten invertiert. Dieser Waschschritt wurde nochmals wiederholt. Die Zellyse fand mit 500 µl 1%-Tritonlysispuffer für 30 Minuten statt. Anschließend wurden Zellreste durch Zentrifugation mit 21000 × g für 30 Minuten entfernt.ca Im Anschluss wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Alle Schritte fanden bei 4°C statt.

2.5 Statistische Methoden

Die densitometrischen Signale wurden mithilfe der Software Alpha View ausgewertet. Die statistische Auswertung fand mit der Software Graphpad Prism 6 statt. Sofern nicht näher angegeben fand ein Kruskal-Wallis-Test statt. Um Stichproben untereinander zu vergleichen wurde der Dunns-Test verwendet. Für eine bessere graphische Darstellung werden die densitometrischen Signale in Relation zueinander präsentiert.

2.6 Tierversuchsgenehmigung

Gewebe für die PCR wurde im Rahmen des Organentnahmeprojektes O68/08 gewonnen.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 werden in humanen und murinen Zellen exprimiert

Zur Verifizierung dieser Expression der Rezeptoren EphB1-3 und ihrer Liganden ephrinb1-3 wurde eine RT-PCR in murinen und humanen Zellen durchgeführt (Abbildung 2). Als Ausgangsmaterial dienten murine Podozyten, humane Podozyten, murine Nierenlysate und humane Nierenlysate-RNA. Die mRNA der Zielgene für die Rezeptoren EphB1-3 und die Liganden ephrinb1-3 wurde isoliert, mithilfe einer reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und in der PCR amplifiziert. Anschließend wurde die DNA in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Es konnte eine Expression der Rezeptoren EphB1-3 und der Liganden ephrinb1-3 in nahezu allen Zellen und Geweben gezeigt werden. Die einzigen beiden Ausnahmen waren hier die EphB1-Expression und die ephrinb3-Expression in murinen Podozyten.

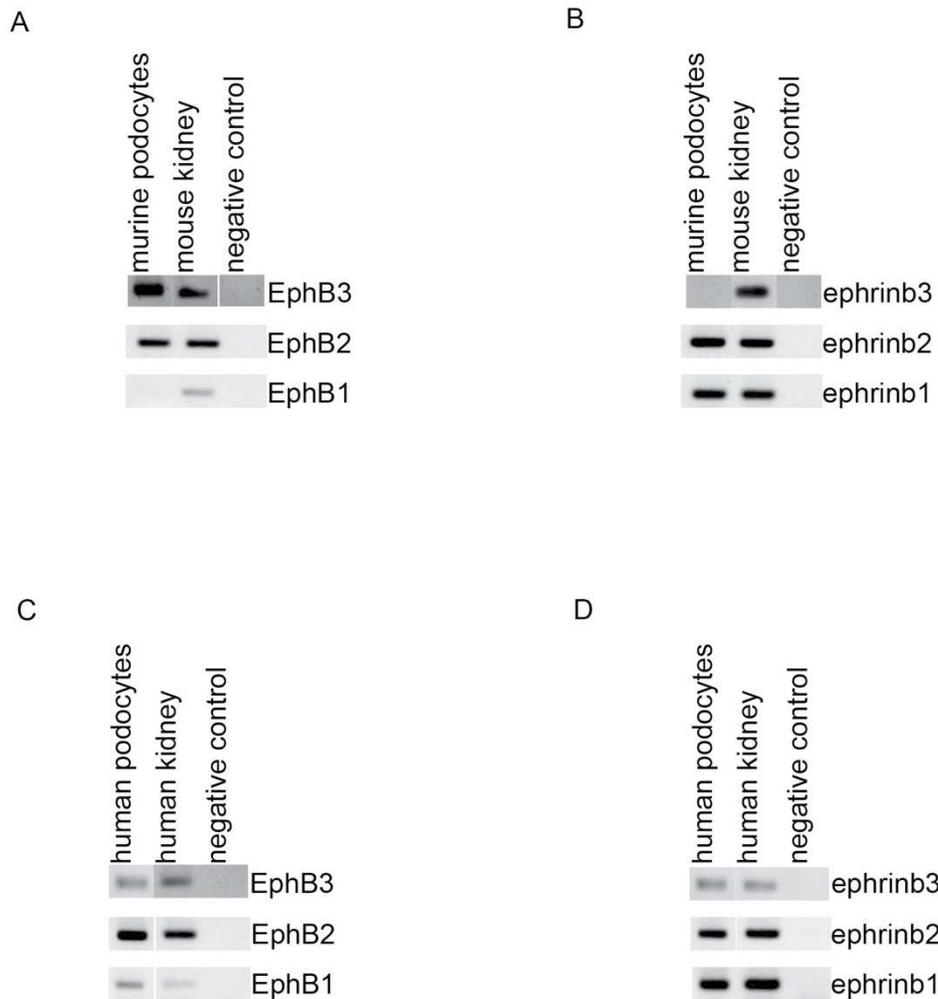


Abbildung 2: Die Rezeptoren EphB1-3 und die Liganden ephrinb1-3 werden in humanen und murinen Zellen exprimiert. Aus den Zellen und Geweben wurden Lysate angefertigt, mRNA isoliert und eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese für die Zielgene EphB1-3 und ephrinb1-3 durchgeführt. **(A, B)** Die Lysate wurden aus murinen Podozyten und murinem Nierengewebe hergestellt. **(C, D)** Die Lysate wurden aus humanen Podozyten hergestellt. RNA aus humanen Nieren wurde verwendet. **(A-D)** EphB1-3 und ephrinb1-3 werden mit Ausnahme von EphB1 und ephrinb3 in murinen Podozyten in allen getesteten Zellen und Geweben exprimiert.

3.2 EphB1 und EphB2 interagieren mit FAK und IQGAP1

Um zu untersuchen ob die Rezeptoren EphB1 und EphB2 mit der Kinase FAK (*focal adhesion kinase*) und dem Gerüstprotein IQGAP1 (*Ras GTPase-activating-like protein*) interagieren wurde eine Co-Immunopräzipitation der Proteine EphB1, EphB2, FAK und IQGAP1 durchgeführt (Abbildung 3).

Hierfür wurden die Plasmide der Proteine in HEK293T-Zellen Co-transfiziert. Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 wurden mithilfe des V5-Tags präzipitiert und im Western-

Blot gegen die FAK-Kinase, das Gerüstprotein IQGAP1 und das Protein Paxillin gefärbt. Als Positivkontrollen dienten das Protein 4.1O und die FAK-Kinase. Als Negativkontrollen wurden die Proteine Nephrin und β -Arrestin2 verwendet.

Es zeigen sich positive Signale für die Interaktion der Rezeptoren EphB1 und EphB2 mit der FAK-Kinase und dem Gerüstprotein IQGAP1.

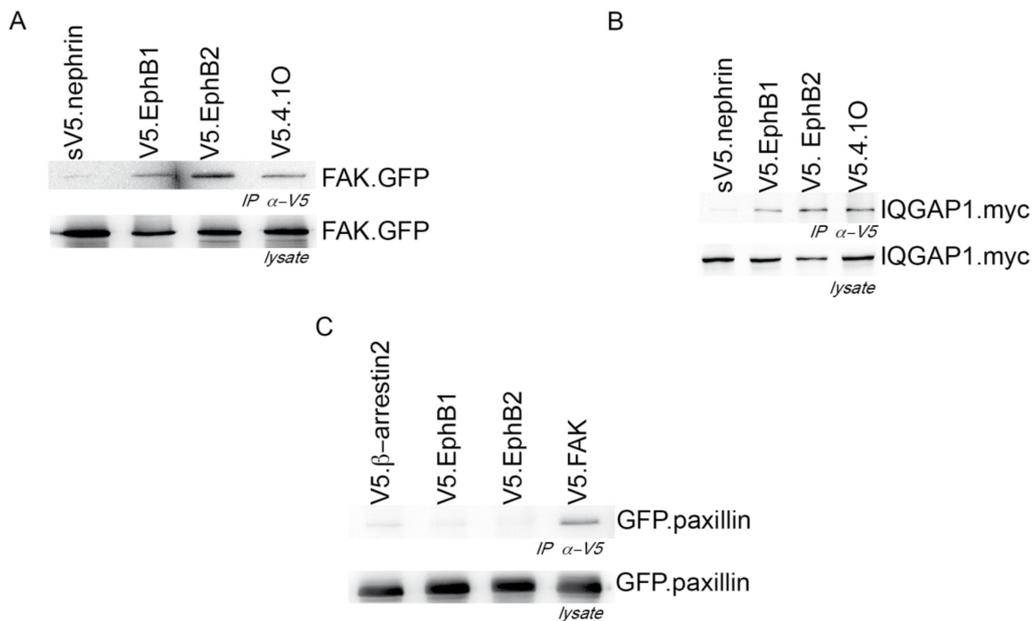


Abbildung 3: Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit der FAK-Kinase und dem Gerüstprotein IQGAP1 nicht jedoch mit dem Protein Paxillin. (A-C) In HEK293T-Zellen wurden die Proteine Nephrin, EphB1, EphB2, 4.1O und FAK transfiziert. Es wurden Co-Immunopräzipitationen mit einem V5-Antikörper und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Präzipitate und Lysate wurden mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. **(A) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit der FAK-Kinase.** Die Nitrocellulosemembran wurde mittels eines Antikörpers gegen die FAK-Kinase inkubiert und für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Das Protein Nephrin fungierte hier als Negativ- und das Protein 4.1O als Positivkontrolle. **(B) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit dem Gerüstprotein IQGAP1.** Die Nitrocellulosemembran wurde mithilfe eines Antikörpers gegen das IQGAP1-Protein inkubiert und für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Das Oberflächenprotein Nephrin fungierte hier als Negativ- und das Protein 4.1O als Positivkontrolle. **(C) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 zeigen keine Interaktion mit dem Protein Paxillin.** Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem Antikörper gegen das Protein Paxillin inkubiert und für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Das Protein β -Arrestin2 fungierte hier als Negativ- und die FAK-Kinase als Positivkontrolle.

3.3 Die Liganden ephrinb1 und ephrinb2 interagieren mit dem Nephrin-Protein

Um eine Interaktion der Liganden ephrinb1 und ephrinb2 mit dem Oberflächenprotein Nephrin zu untersuchen, wurde eine Co-Immunopräzipitation in HEK293T-Zellen durchgeführt (Abbildung 4A).

Hierfür wurden drei Kontrollansätze mit den Plasmiden der sIg-Domäne und der Proteine ephrinb1, ephrinb2 und β -Arrestin2 verwendet. In drei weiteren Ansätzen wurde der zytoplasmatische Anteil des Nephrin-Proteins mit seiner sIg-Domäne zusammen mit den Proteinen ephrinb1, ephrinb2 und β -Arrestin2 co-exprimiert. Die sIg-Domäne der Proteine wurde mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. Die Präzipitate und Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transfiziert. Mithilfe eines Antikörpers gegen den *Flag-Tag* und einen Sekundärantikörper mit *horseradish peroxidase* wurden die Proteine für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Hier zeigten sich positive Signale bei der Co-Immunopräzipitation der Liganden ephrinb1 und ephrinb2 mit dem Oberflächenprotein Nephrin.

3.4 Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit Nephrin-Protein

Um eine mögliche Interaktion der Rezeptoren EphB1 und EphB2 mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin zu detektieren, wurde ihre DNS in HEK293T-Zellen transfiziert (Abbildung 4B).

Zwei Kontrollansätze wurden mit dem Leervektor CDM8 und der DNS der Rezeptoren EphB1 oder EphB2 transfiziert. In zwei weiteren Ansätzen wurde das Nephrin-Protein mit den Rezeptoren EphB1 oder EphB2 co-transfiziert. Im Anschluss daran fand eine Co-Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose statt. Die Präzipitate und Lysate wurden danach durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem V5-Antikörper und dieser mittels sekundärem Antikörper und Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Es zeigten sich positive Signale in der Co-Immunopräzipitation der Rezeptoren EphB1 und EphB2 mit dem Oberflächenprotein Nephrin.

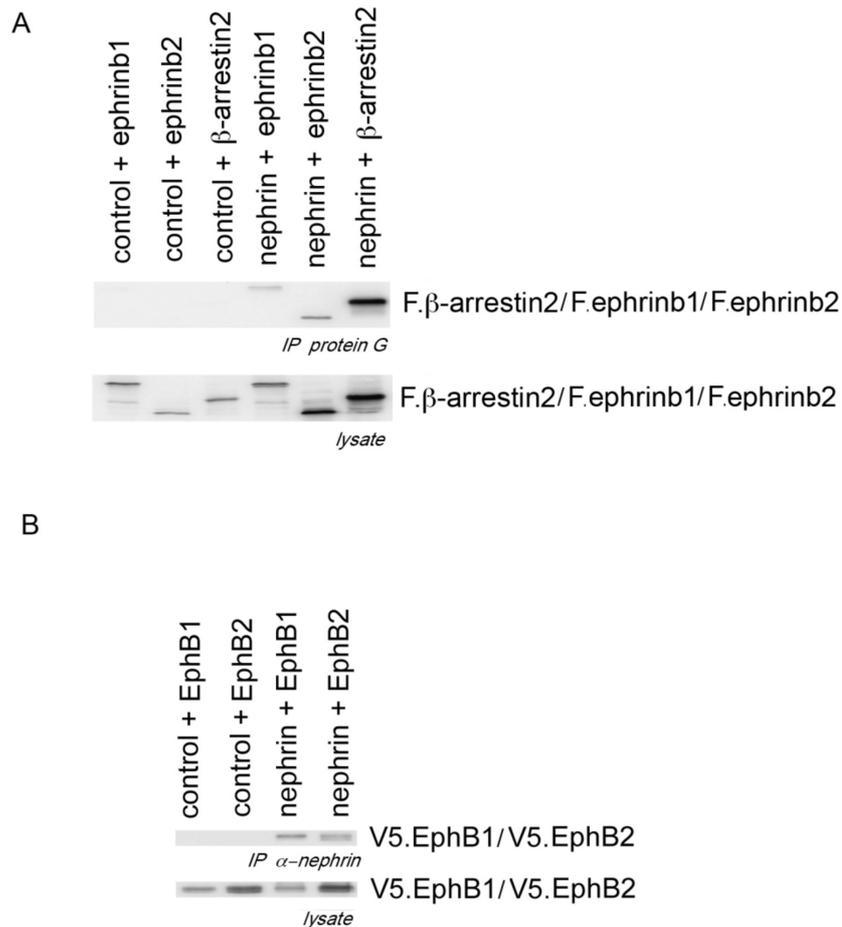


Abbildung 4: (A) Die Liganden ephrinb1 und ephrinb2 interagieren mit dem Nephrin-Protein. Co-Immunopräzipitation der Proteine ephrinb1, ephrinb2 und β -Arrestin2 mit Nephrin nach Transfektion in HEK239T-Zellen. Das Nephrin-Protein wurde mit Protein-G-Sepharose präzipitiert. Die Proteine ephrinb1, ephrinb2 und β -Arrestin2 wurden mittels Western-Blot und Chemolumineszenz im Präzipitat detektiert. **(B) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit dem Protein Nephrin.** Co-Immunopräzipitation der Proteine Nephrin und EphB1/EphB2 nach Transfektion in HEK293T-Zellen. Nephrin wurde mit Protein-A-Sepharose präzipitiert. EphB1 und EphB2 konnten mittels Western-Blot und Chemolumineszenz im Präzipitat detektiert werden.

3.5 Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrintyrosinphosphorylierung

Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 sind Rezeptortyrosinkinasen. Es sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Interaktion des Oberflächenproteins Nephrin mit dem EphB1- und EphB2-Rezeptor zu einer Verstärkung der Nephrintyrosinphosphorylierung führt.

Um zu untersuchen, ob die Rezeptoren EphB1 und EphB2 eine Wirkung auf die Nephrintyrosinphosphorylierung haben, wurde ihre DNA in HEK293T-Zellen zusammen mit dem Protein Nephrin co-transfiziert (Abbildung 5A). Im Kontrollansatz wurde anstatt

der Rezeptoren EphB1 oder EphB2 nur der Kontrollvektor mit dem *V5-tag* transfiziert. Es wurde eine Co-Immunopräzipitation mit einem V5-Antikörper und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Präzipitate und Lysate wurden mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Es wurden zwei spezifische Antikörper gegen phosphoryliertes Nephrin an Tyrosin 1176 und Tyrosin 1193 sowie Tyrosin 1217 verwendet. So konnte das phosphorylierte Nephrin für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden.

Bei Co-Expression der Rezeptoren EphB1 bzw. EphB2 mit dem Oberflächenprotein Nephrin kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer verstärkten Nephrintyrosinphosphorylierung an Tyrosin 1176, Tyrosin 1193 und Tyrosin 1217.

3.5.1 Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermittelt die Nephrintyrosinphosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors an der Nephrintyrosinphosphorylierung beteiligt ist, wurde die DNS mit dominant inaktiver Tyrosinkinasedomäne verwendet (DN). Als Kontrolle diente hier die DNS mit normal aktiver Tyrosinkinasedomäne (Abbildung 5B).

In einem Ansatz wurde die DNS des Nephrin-Proteins und des EphB2-Rezeptors und im anderen Ansatz die des Nephrin-Proteins und des EphB2-Rezeptors mit inaktiver Tyrosinkinasedomäne in HEK293T-Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurde das Nephrin-Protein isoliert transfiziert. Es fand eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose statt. Die Präzipitate und Lysate wurden mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem 4G10-Antikörper gegen Phosphotyrosin inkubiert und dieses mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Das densitometrische Signal der Nephrintyrosinphosphorylierung war in Anwesenheit des EphB2-Rezeptors positiv. Bei dominant negativer Tyrosinkinasedomäne war das Signal abgeschwächt.

Densitometrisch (pY-Nephrin/Nephrin) zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Nephrintyrosinphosphorylierung zwischen dem Rezeptor EphB2 und EphB2 DN (n=5, p<

0,01, MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Graphisch wird die Phosphorylierung bei inaktiver Tyrosinkinasedomäne relativ zur Phosphorylierung bei aktiver Tyrosinkinasedomäne dargestellt.

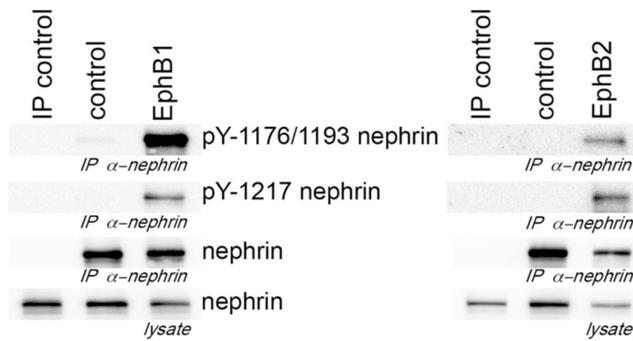
3.5.2 Src-Kinasen vermitteln die Nephrintyrosinphosphorylierung

Um zu untersuchen ob Src-Kinasen an der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrintyrosinphosphorylierung beteiligt sind wurden die Src-Kinasen mit dem PP2-Kinaseinhibitor gehemmt.

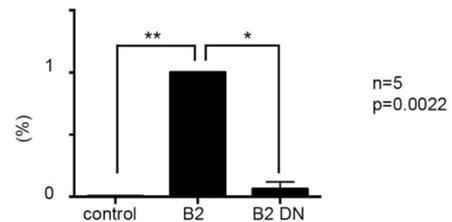
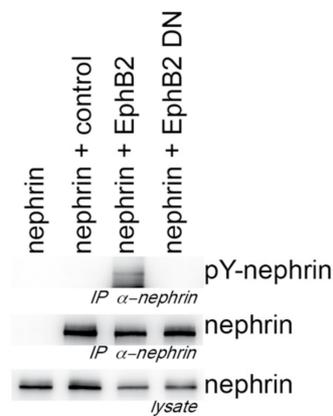
In drei Ansätzen wurden Plasmide mit dem zytoplasmatischen Anteil des Oberflächenproteins Nephrin, mit dem Leervektor CDM8, den Rezeptoren EphB1 und EphB2 in HEK293T-Zellen transfiziert (Abbildung 5C). Die Zellen wurden mit PP2-Kinaseinhibitor 60 Minuten inkubiert. DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde als Trägersubstanz für den PP2-Kinaseinhibitor und als Kontrolle verwendet. Eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose fand im Anschluss statt. Die Präzipitate und die Lysate wurden mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem 4G10-Antikörper gegen Phosphotyrosin inkubiert. Dieser wurde mithilfe der Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Unter Inhibition der Src-Kinasen kam es visuell zu einer Abschwächung des Signals der Nephrintyrosinphosphorylierung. In der densitometrischen Auswertung (pY-Nephrin/Nephrin) zeigt eine signifikante Reduktion der Nephrintyrosinphosphorylierung unter Inhibition der Src-Kinasen (n=5, $p < 0,01$, MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Graphisch wird die Phosphorylierung unter Inhibition der Src-Kinasen relativ zur Phosphorylierung bei ohne Inhibition der Src-Kinasen dargestellt.

A



B



C

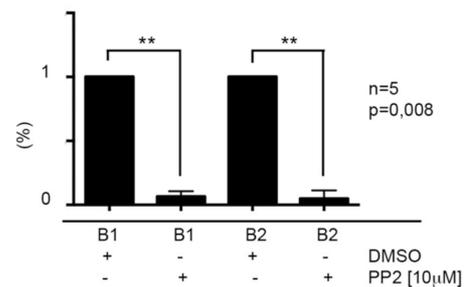
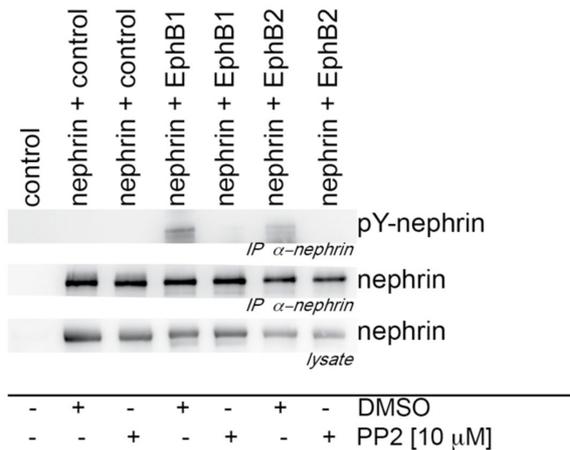


Abbildung 5: Der EphB-Rezeptor phosphoryliert das Oberflächenprotein Nephrin mithilfe seiner Tyrosinkinasedomäne und Src-Kinasen. (A-C) Die DNA der Proteine wurde in HEK293T-Zellen transfiziert. Es fand eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose statt. Die Lysate wurden mithilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. **(A) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 führen zu einer vermehrter Nephrintyrosinphosphorylierung an Tyrosin 1176, 1193 und 1217.** Die

Nitrocellulosemembran wurde mit einem Antikörper gegen Tyrosin 1176, 1193 und 1217 inkubiert und die Phosphorylierung für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. **(B) Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermittelt die Nephrintyrosinphosphorylierung.** Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem Antikörper gegen Nephrintyrosin (4G10) inkubiert und dieses für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung (pY-Nephrin/Nephrin) zeigt einen signifikanten Unterschied der Nephrintyrosinphosphorylierung zwischen dem Rezeptor EphB2 und EphB2 DN (n=5, p< 0,01, MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). **(C) Unter Inhibition der Src-Kinasen ist die EphB-Rezeptor-vermittelte Nephrintyrosinphosphorylierung reduziert.** Mithilfe von 10µM PP2-Kinaseinhibitor in DMSO (Dimethylsulfoxid) wurden die Src-Kinasen inhibiert. Als Kontrolle wurde DMSO ohne PP2-Kinaseinhibitor verwendet. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Phosphotyrosin (4G10) wurde das phosphorylierte Nephrin-Protein für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. In der densitometrischen Auswertung (pY-Nephrin/Nephrin) zeigt eine signifikante Reduktion der Nephrintyrosinphosphorylierung unter Inhibition der Src-Kinasen (n=5, p<0,01, MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test).

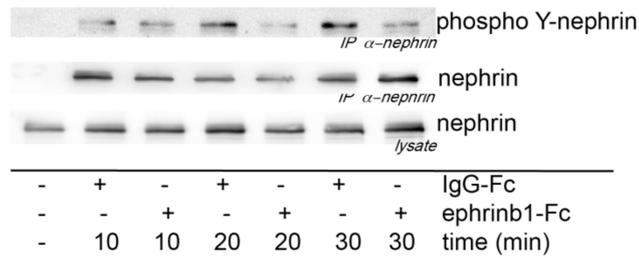
3.5.3 Der Ligand ephrinb1 verringert die Nephrintyrosinphosphorylierung

Um zu untersuchen, ob die Stimulation von Zellen mit dem Liganden ephrinb1 einen Effekt auf die Nephrintyrosinphosphorylierung hat wurden HEK293T-Zellen in-vitro mit dem Protein ephrinb1-Fc stimuliert (Abbildung 6).

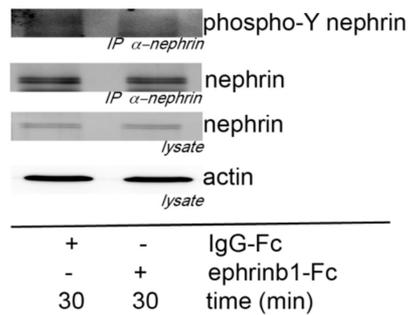
Die DNS des Oberflächenproteins Nephrin wurde in HEK293T-Zellen transfiziert und in FCS-freiem DMEM kultiviert um Phosphorylierungsartefakte zu vermeiden. Vor der Zellernte fand eine Stimulation mit dem Liganden ephrinb1-Fc für 10, 20, 30 und 45 Minuten statt. Als Kontrolle diente hier IgG-Fc. Im Anschluss wurde eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Präzipitate und Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mit einem Antikörper gegen Nephrintyrosin (4G10) inkubiert und mithilfe eines HRP-haltigen sekundären Antikörpers wurde Nephrintyrosin für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Die Stimulation der Zellen mit dem Liganden ephrinb1 zeigte ein abgeschwächtes Signal für die Nephrintyrosinphosphorylierung.

A



B



C

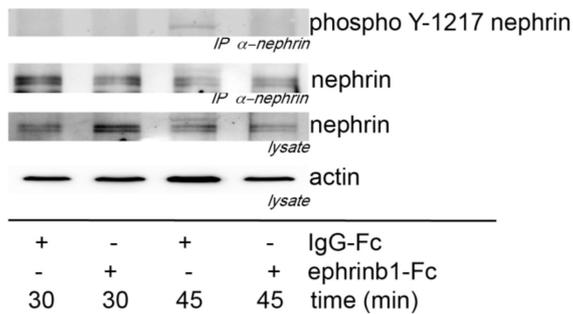


Abbildung 6: Stimulation mit dem Liganden ephrinb1 reduziert die Nephrintyrosinphosphorylierung. (A-C) Das Oberflächenprotein Nephrin wurde in HEK293T-Zellen exprimiert und die Zellen mit dem Liganden ephrinb1-Fc stimuliert. Anschließend fand eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper statt. Die Präzipitate wurde mithilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit einem Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Im Anschluss fand eine Inkubation mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Nephrin-Protein (4G10) statt. (A) Die Stimulation mit dem Liganden ephrinb-Fc fand 10, 20 und 30 min statt. (B) Die Stimulation mit Liganden ephrinb-Fc dauerte 30 min. (C) Die Stimulation mit dem Liganden ephrinb-Fc fand 30 und 45 min statt. Es wurde ein Antikörper gegen das phosphorylierte Tyrosin 1217 des Nephrin-Proteins verwendet.

3.6 Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrin-Nck2-Bindung

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Rezeptoren EphB1 und EphB2 zu einer Nephrintyrosinphosphorylierung führen (3.5). Um zu untersuchen, ob die Liganden EphB1 und EphB2 die Nephrin-Nck2-Bindung verstärken, wurde eine Co-Immunopräzipitation der DNS des Nephrin-Proteins mit dem Nck2-Protein in Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 durchgeführt (Abbildung 7A).

Die DNS der Proteine Nck2 und Nephrin wurden mit dem Leervektor CDM8 und den Rezeptoren EphB1 und EphB2 in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Anschließend wurde eine Co-Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Die Präzipitate und die Lysate wurden mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Nitrocellulosemembran wurde mit einem Antikörper gegen den *V5-Tag* inkubiert und das Nck2-Protein mithilfe der Chemolumineszenz für die Densitometrie sichtbar gemacht.

Densitometrisch zeigt sich hier eine signifikant erhöhte Nephrin-Nck2-Bindung unter Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 ($n=8$, $p<0,001$ MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Graphisch wird die Nephrin-Nck2-Bindung in Relation zur Bindung ohne Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 dargestellt.

3.6.1 Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermittelt die Nephrin-Nck2-Bindung

Die EphB2-Tyrosinkinasedomäne ist an der Nephrintyrosinphosphorylierung beteiligt (3.5.1). Um den Effekt der EphB2-Tyrosinkinasedomäne auf die Nephrin-Nck2-Bindung zu untersuchen wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 7B).

Die DNS der Proteine Nephrin, Nck2 und EphB2 mit aktiver und inaktiver Tyrosinkinasedomäne (DN) wurden in HEK293T-Zellen Co-transfiziert. Es fand eine Co-Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose statt. Die Präzipitate und Lysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Nck2-Protein wurde mithilfe eines primären Antikörpers gegen den *V5-tag* und eines sekundären Antikörpers mit *horseradish peroxidase* für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

In der Densitometrie zeigt sich eine signifikante Reduktion der Nephrin-Nck2-Bindung bei dominant negativer EphB2-Tyrosinkinasedomäne (DN) im Vergleich zum EphB2-Rezeptor (n=3, p<0,01 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors verstärkt somit die Nephrin-Nck2-Bindung. Graphisch wird die Reduktion der Nephrin-Nck2-Bindung unter inaktiver Tyrosinkinasedomäne relativ zur Bindung bei aktiver Tyrosinkinasedomäne dargestellt.

3.6.2 Src-Kinasen vermitteln die Nephrin-Nck2-Bindung

Es konnte gezeigt werden, dass die Src-Kinasen an der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrintyrosinphosphorylierung beteiligt sind (3.5.2). Außerdem führt die Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 zu einer verstärkten Interaktion der Proteine Nephrin und Nck2 (3.6). Um zu untersuchen, ob bei der Bindung der Proteine Nephrin und Nck2 Src-Kinasen eine Rolle spielen, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 7C).

In mehreren Ansätzen wurde die DNS der Proteine Nephrin und Nck2 mit dem Leervektor CDM8 und den Rezeptoren EphB1 und EphB2 co-transfiziert. Die Src-Kinasen wurden mit dem PP2-Kinaseinhibitor gehemmt. Als Kontrolle und Trägersubstanz fungierte DMSO. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit Protein-G-Sepharose durchgeführt. Dies bindet an der sIg-Domäne des Nephrin-Proteins. Die Präzipitate und die Lysate wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mit einem Antikörper gegen den *Flag-Tag* des Nck2-Proteins wurde die Nitrocellulosemembran inkubiert. Der Antikörper wurde mittels Chemolumineszenz für die Densitometrie sichtbar gemacht.

Densitometrisch zeigt sich eine signifikant reduzierte Nephrin-Nck2-Bindung unter Inhibition der Src-Kinasen (n=6, p<0,01 EphB1, p<0,0001 EphB MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Graphisch wird die Nephrin-Nck2-Bindung bei inaktiver Src-Kinase relativ zur Bindung bei aktiver Src-Kinase dargestellt.

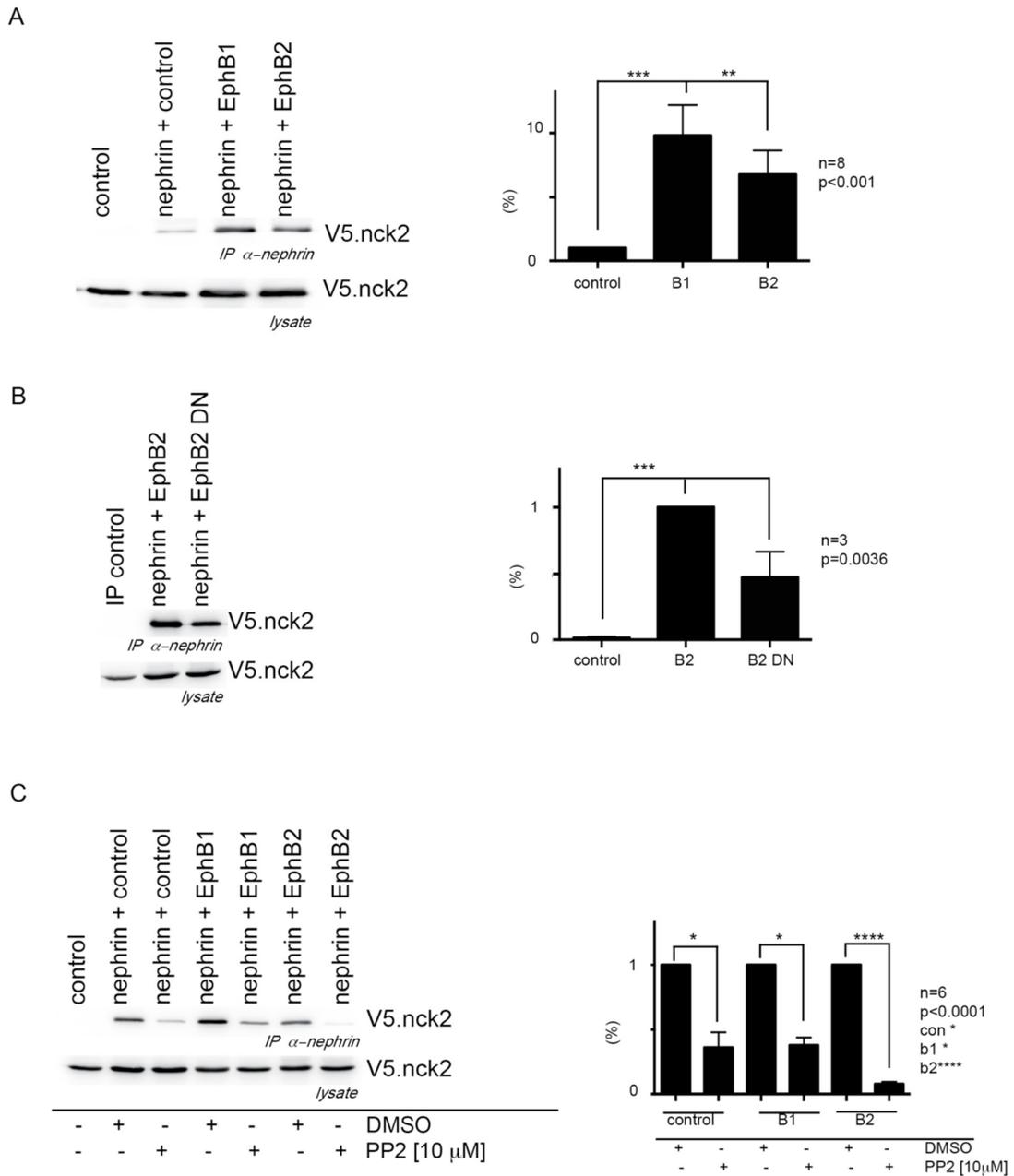


Abbildung 7: (A-C) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrin-Nck2-Bindung. Die DNS der Proteine Nephrin, Nck2, EphB2 und EphB1 bzw. EphB2 KD wurden in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Eine Co-Immunopräzipitation wurde mit einem Nephrin-Antikörper durchgeführt. Die Präzipitate wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. **(A) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrin-Nck2-Bindung.** Mithilfe eines Antikörpers gegen den V5-tag des Nck2-Proteins wurde dieses für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Densitometrisch zeigt sich hier eine signifikant erhöhte Nephrin-Nck2-Bindung unter Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 (n=8, p<0,001 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). **(B) Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors verstärkt die Nephrin-Nck2-Bindung.** Mit einem Antikörper gegen den V5-tag des Nck2-Proteins wurde dieses für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. In der Densitometrie zeigt sich eine signifikante Reduktion der Nephrin-Nck2-Bindung bei ausgeschalteter Tyrosinkinasedomäne des EphB2-

Rezeptors (DN) (n=3, p<0,01 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). **(C) Die Inhibition der Src-Kinasen reduziert die Nephrin-Nck2-Bindung.** Die Src-Kinasen wurden in den Zellen durch Stimulation mit dem PP2-Kinaseinhibitor gehemmt. Das Protein Nck2 wurde mittels eines Antikörpers gegen den V5-tag für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Densitometrisch zeigt sich eine signifikant reduzierte Nephrin-Nck2-Bindung unter Inhibition der Src-Kinasen (n=6, p<0,01 EphB1, p<0,0001 EphB2 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test).

3.7 Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 reduzieren die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung

Um zu untersuchen, ob die Rezeptoren EphB1 und EphB2 einen Effekt auf die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung haben, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 8A).

Hierfür wurden in mehreren Ansätzen die DNS der Proteine Nephrin und β -Arrestin2 mit dem Leervektor CDM8 und den Rezeptoren EphB1 und EphB2 in HEK293T-Zellen co-exprimiert. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit Protein-G-Sepharose, welches an die sIg-Domäne bindet, durchgeführt. Die Präzipitate und Lysate wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Mit einem spezifischen Antikörper gegen den *Flag-Tag* des β -Arrestin2-Proteins und der Chemolumineszenz wurde ein Lichtsignal für die Densitometrie sichtbar gemacht.

Densitometrisch zeigt sich eine signifikante Reduktion der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung unter Anwesenheit des Rezeptors EphB1 (n=6, p<0,001 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Graphisch wird die Reduktion der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung unter Anwesenheit der Rezeptoren EphB1 und EphB2 relativ zur Bindung ohne die Rezeptoren EphB1 und EphB2 dargestellt.

3.7.1 Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors vermindert die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung

Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors ist an der Nephrintyrosinphosphorylierung beteiligt (3.5.1). Um zu untersuchen, ob die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors an der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung beteiligt ist, wurde eine Co-Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 8B).

Hierfür wurde die DNS der Proteine Nephrin, β -Arrestin2 und EphB2 bzw. EphB2 mit inaktiver Tyrosinkinasedomäne (DN) in HEK293T-Zellen transfiziert. Die Co-Immunopräzipitation wurde mit einem Antikörper gegen das Nephrin-Protein und Protein-A-Sepharose durchgeführt. Präzipitate und Lysate wurden mithilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das β -Arrestin2-Protein wurde mittels eines Antikörpers gegen den *flag-tag* und eines HRP-haltigen sekundären Antikörpers für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Densitometrisch zeigte sich eine signifikant niedrigere Nephrin- β -Arrestin2-Bindung bei aktiver Kinasedomäne des EphB2-Rezeptors ($n=5$, $p<0,01$ MW +/- SEM Mann-Whitney-U-Test, $p<0,05$ MW +/- SEM Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Graphisch wurde die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung bei inaktiver Tyrosinkinasedomäne relativ zur Bindung bei aktiver Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors dargestellt.

3.7.2 Src-Kinasen sind nicht an der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrin- β -Arrestin2-Bindung beteiligt

Wie bereits gezeigt werden konnte sind an der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrintyrosinphosphorylierung Src-Kinasen beteiligt (3.5.2). Um zu untersuchen ob sich die Beteiligung von Src-Kinasen auch auf die EphB-Rezeptor-vermittelte Nephrin- β -Arrestin2-Bindung nachweisen lässt, wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 8C).

Hierfür wurde die DNS der Proteine Nephrin, β -Arrestin2 und EphB1 oder EphB2 in HEK293T-Zellen transfiziert. Eine Stunde vor Zellernte wurden die Src-Kinasen mit PP2-Kinaseinhibitor gehemmt. Als Trägersubstanz für den PP2-Kinaseinhibitor und als Kontrolle diente DMSO. Die Immunopräzipitation fand mit einem Antikörper gegen das Nephrin-Protein und Protein-A-Sepharose statt. Die Präzipitate und Lysate wurden mithilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mit einem Antikörper gegen den *flag-tag* des β -Arrestin2-Proteins inkubiert und mithilfe eines HRP-haltigen sekundären Antikörpers für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Es zeigte sich densitometrisch kein signifikanter Unterschied in der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung unter Inhibition der Src-Kinasen ($n=4$). Graphisch wurde die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung bei aktiver und inaktiver Src-Kinase relativ zueinander dargestellt.

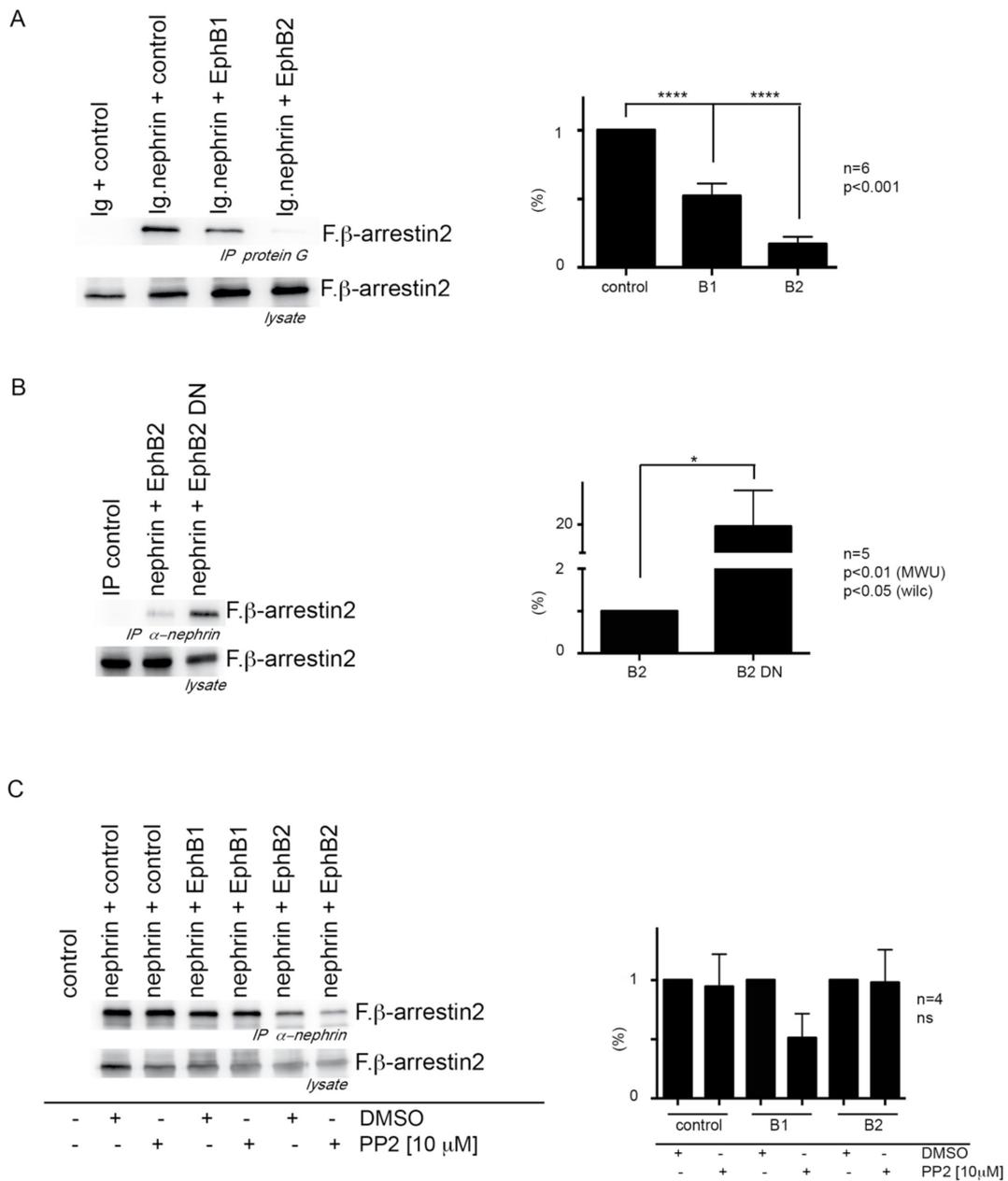


Abbildung 8: (A-C) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 reduzieren Nephrin-β-Arrestin2-Bindung. Es fand eine Co-Expression der Proteine Nephrin, β-Arrestin2 und EphB in HEK293T-Zellen statt. Die Präzipitate wurde mittels der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transfeiert. **(A) Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 reduzieren Nephrin-β-Arrestin2-Bindung.** Es fand eine Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose, welches am Ig-Teil des Nephrin-Proteins bindet, statt. Mithilfe eines Antikörpers gegen den *Flag-tag* des β-Arrestin2-Proteins wurde dieses für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Densitometrisch zeigt sich eine signifikante Reduktion der Nephrin-β-Arrestin2-Bindung unter Anwesenheit des EphB1-Rezeptors (n=6, p<0,001 MW +/- SEM Kruskal-Wallis-Test). Die Nephrin-β-Arrestin2-Bindung ist unter Anwesenheit des EphB2-Rezeptors nochmals signifikant niedriger als unter Anwesenheit des EphB1-Rezeptors (n=6, p<0,001 MW +/-SEM). **(B) Die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors hat einen hemmenden Einfluss auf die Nephrin-β-Arrestin2-Bindung.** Es wurde eine Co-Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper durchgeführt. Mit einem Antikörper gegen den

Flag-Tag des β -Arrestin2-Proteins wurde dieses für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Densitometrisch zeigte sich eine signifikant niedrigere Nephrin- β -Arrestin2-Bindung bei aktiver Kinasedomäne des EphB2-Rezeptors (n=5, p<0,01 MW +/- SEM Mann-Whitney-U-Test, p<0,05 MW +/- SEM Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). **(C) Die Hemmung der Src-Kinasen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung.** Die HEK-Zellen wurden mit PP2-Kinaseinhibitor inkubiert. Die Immunopräzipitation fand mit einem Nephrin-Antikörper statt. Die Nitrocellulosemembran wurde mithilfe eines Antikörpers gegen den Flag-tag des β -Arrestin2-Proteins für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Es zeigte sich densitometrisch kein signifikanter Unterschied in der Nephrin- β -Arrestin2-Bindung unter Inhibition der Src-Kinasen (n=4).

3.8 Der EphB2-Rezeptor hat keinen Einfluss auf die Nephrinendozytose

Der EphB2-Rezeptor führt zu einer reduzierten Interaktion der Proteine Nephrin und β -Arrestin2 (3.7). Um zu untersuchen, ob der EphB2-Rezeptor auch einen Einfluss auf die Nephrinendozytose hat und seine Tyrosinkinasedomäne hieran beteiligt ist, wurde ein Biotinylierungsassay und eine Immunopräzipitation durchgeführt (Abbildung 9A).

Hierfür wurde die DNS der Proteine Nephrin und EphB2 oder EphB2 mit inaktiver Tyrosinkinasedomäne (DN) in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach der Zelllyse wurde das Protein Nephrin an der Zelloberfläche mithilfe von Biotin markiert. Im Anschluss fand eine Immunopräzipitation mit einem Nephrin-Antikörper und Protein-A-Sepharose statt. Die Präzipitate und Lysate wurden mithilfe der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies wurde mittels Streptavidin (bindet Biotin) inkubiert und für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Da Biotin nur das Oberflächenprotein Nephrin markiert, welches nicht endozytiert wurde, lässt sich hierdurch indirekt auf die Nephrinendozytose schließen.

Densitometrisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Nephrinexpression an der Zelloberfläche zwischen den Rezeptoren EphB2 und EphB2 DN (n=6). Graphisch wurde das biotinylierte Oberflächenprotein Nephrin bei aktiver und inaktiver Tyrosinkinasedomäne relativ zur Biotinylierung ohne Anwesenheit des EphB2-Rezeptors dargestellt.

A

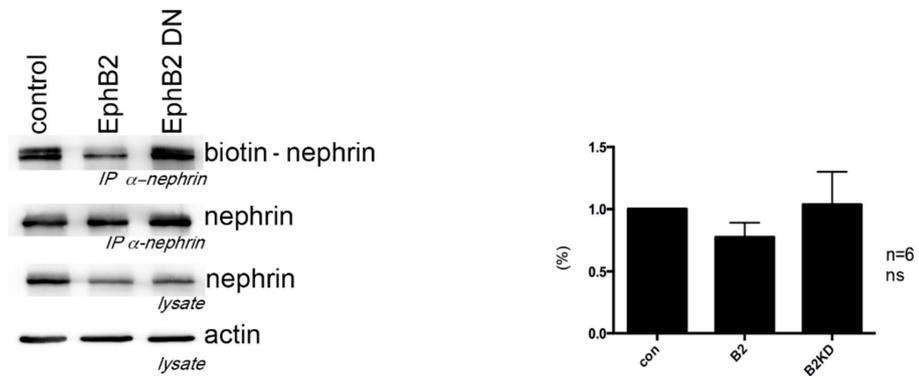


Abbildung 9: (A) Der EphB2-Rezeptor beeinflusst die Nephriendozytose nicht. Die Proteine Nephrin und EphB2 bzw. EphB2 DN wurden in HEK293T-Zellen Co-Transfiziert. Das Nephrin-Protein an der Zelloberfläche wurde mithilfe von Biotin markiert. Nach der Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen das Nephrin-Protein und Protein-A-Sepharose fand eine SDS-Gelelektrophorese statt. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mithilfe von Antikörpern gegen Nephrin, Aktin und Streptavidin für die Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Densitometrisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Nephriexpression an der Zelloberfläche zwischen dem Rezeptor EphB2 und EphB2 DN (n=6).

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Liganden ephrin1-3- und die Rezeptoren EphB1-3 in humanen Podozyten exprimiert werden und die EphB-Rezeptoren mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin interagieren. Die Interaktion der Rezeptoren EphB1 und EphB2 mit dem Oberflächenprotein Nephrin führt zur Phosphorylierung des Nephrin-Proteins an wichtigen Tyrosinen im C-terminalen Anteil. Die Nephrintyrosinphosphorylierung ist sowohl von der Tyrosinkinasedomäne des EphB-Rezeptors als auch von Src-Kinasen abhängig. Essentielle Nephrininteraktionen, wie die mit den Proteinen Nck2 und β -Arrestin2, werden durch die Expression und Phosphorylierung der EphB-Rezeptoren reguliert. Zudem interagieren die EphB-Rezeptoren mit Regulatoren des Zytoskeletts.

Die Ursachen für eine glomeruläre Proteinurie sind heterogen. Die Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen ist häufig eine Schädigung des glomerulären Filters. Die Filtrationsbarriere des Glomerulums besteht von innen nach außen aus dem fenestrierten Endothel, der Basalmembran und den Podozyten. Zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten bildet sich die Schlitzmembran aus. Eine glomeruläre Proteinurie geht mit einer Verplumpung der podozytären Fußfortsätze einher, welche auch als *foot process effacement* bezeichnet wird. Beim *foot process effacement* kommt es zu einem Verlust einer intakten glomerulären Schlitzmembran (Farquhar et al., 1957).

Podozyten exprimieren an ihrer Oberfläche Schlitzmembranproteine. Als bedeutend haben sich unter anderem die Proteine Nephrin, Nck2 und β -Arrestin2 herausgestellt. Das Oberflächenprotein Nephrin bildet Homodimere mit dem Nephrin-Protein gegenüberliegender Podozyten. Hierdurch wird die Stabilität der Schlitzmembran erhöht (Khoshnoodi et al., 2003). Tryggvason et al. stellten die Theorie auf, dass zwischen dem Nephrin-Protein und den anderen Oberflächenproteinen Mikroporen entstehen durch die der Primärharn aus dem Plasma filtriert wird (Wartiovaara et al., 2004).

Hashimoto et al. konnten das Oberflächenprotein ephrin an der Schlitzmembran lokalisieren. Die ephrin-Eph-Familie bildet die größte Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen (Kullander and Klein, 2002). Sie sind membrangebunden und an der Ausbildung von Gewebegrenzen und Zell-Zell-Kontakten beteiligt (Mellitzer et al., 1999). Außerdem regulieren sie das Aktin-Zytoskellet unter anderem in renalen Tubuluszellen (Ogawa et al., 2006). Es gibt Hinweise

darauf , dass die Bindung von ephrin an seinen Rezeptor Eph zu einer Zellrepulsion führt (Miao et al., 2000).

Wir konnten zeigen, dass die Liganden ephrin1-3 und ihre Rezeptoren EphB1-3 in humanen und murinen Podozyten exprimiert werden. In dieser Arbeit konnten wir eine Interaktion sowohl zwischen den EphB-Rezeptoren und den ephrinb-Liganden mit dem Oberflächenprotein Nephrin zeigen. Wir untersuchten daraufhin, ob eine Regulation des Nephrin-Proteins durch den EphB-Rezeptor stattfindet.

4.1 Nephrintyrosinphosphorylierung – Funktionelle Bedeutung für den Podozyten und die Beeinflussung durch EphB-Rezeptoren

Nephrin ist ein Signalprotein, welches durch seine Tyrosinphosphorylierung reguliert wird. Es gibt hierzu zwei etablierte Theorien. Holzman et al. stellten die Theorie auf, dass die Nephrintyrosinphosphorylierung vor allem in der embryonalen Phase und bei Schädigung des Filters auftritt. Die Nephrintyrosinphosphorylierung führt anschließend über eine Bindung der Proteine Nephrin an Nck zu einer Reorganisation des Zytoskeletts. Ziel dieser Reorganisation ist die Ausbildung bzw. Rückbildung hin zu einer intakten Schlitzmembran (Verma, 2006).

New et al. konnten zeigen, dass die Nephrintyrosinphosphorylierung auch im physiologischen Gleichgewicht der Schlitzmembran vorkommt. Sie stellte eine zweite Theorie auf nach der die Aktivierung des Zytoskeletts die Nephrintyrosinphosphorylierung über das Nck-Protein verstärkt. Dies führt zu Stabilisierung des Zytoskeletts und damit der Schlitzmembran (Jones et al., 2009, 2006; New et al., 2013).

Für die Theorie nach New et al. spricht die Tatsache, dass physiologischerweise eine starke Phosphorylierung von Nephrintyrosin in Rattenglomeruli vorliegt (Zhang et al., 2010). Die Reduktion des Nck-Proteins in vivo führt zu einer verminderten Nephrintyrosinphosphorylierung. Die verminderte Nephrintyrosinphosphorylierung lässt sich noch vor einem glomerulären Schaden nachweisen (Jones et al., 2009). Nach der Theorie von Holzman et al. sollte eine reduzierte Nephrintyrosinphosphorylierung nicht zu einem glomerulären Schaden führen. Unserer Meinung nach spricht dies für eine stabilisierende Funktion der Nephrintyrosinphosphorylierung auf die Schlitzmembran und für die Theorie nach New et al.

Quack et al. postulierten eine dynamische Regulation der glomerulären Schlitzmembran. Dieses Modell stützt die zweite Theorie nach New et al.. Eine zentrale Rolle spielt in diesem Modell nach Quack et al. das Oberflächenprotein Nephrin. Reguliert wird das Gleichgewicht der homodimeren Bindung durch die Nephrintyrosinphosphorylierung. Die Nephrintyrosinphosphorylierung führt über das Protein Podocin zur Stabilisierung des Oberflächenproteins Nephrin in *lipid rafts* und schützt dieses vor Endozytose (Huber et al., 2003; Quack et al., 2006). Zudem kommt es zur Bindung der Proteine Nephrin und Nck2, einem Regulator des Aktin-Zytoskeletts (Jones et al., 2006; Li et al., 2006). Diese Mechanismen sind Teil der Stabilisation des Oberflächenproteins Nephrin in der Schlitzmembran (Buday et al., 2002; Jones et al., 2006). Dephosphorylierung führt mithilfe des β -Arrestin2-Proteins zu einer Nephrinendozytose und damit zu einer verminderten Homodimerisierung und Verknüpfung benachbarter Podozyten. Hierdurch wird die Integrität der Schlitzmembran herabgesetzt (Quack et al., 2006) (Abb. 1).

Als wichtige Tyrosine für die regulatorische Nephrintyrosinphosphorylierung haben sich Tyrosin 1176, Tyrosin 1193 und Tyrosin 1217 herausgestellt. Sie besitzen ein typisches YDXV-Motif für die Phosphorylierung durch Src-Kinasen (Li et al., 2004). In Neuronen phosphorylieren Eph-Rezeptoren Tyrosine am NMDA-Rezeptor indirekt mithilfe von Src-Kinasen (Takasu et al., 2002).

Unsere Ergebnisse in Podozyten und HEK293T-Zellen bestätigen eine Phosphorylierung von Nephrintyrosin an Tyrosin 1176, 1193 und 1217 durch den EphB-Rezeptor. Hieran ist die Tyrosinkinasedomäne des EphB-Rezeptors beteiligt. Sie beeinflusst außerdem die Nephrin- β -Arrestin2 und die Nephrin-Nck2-Bindung. Wir zeigten, dass der EphB-Rezeptor zu einer Bindung der Proteine Nephrin und Nck2 führt und Src-Kinasen hieran beteiligt sind. Zudem indizieren unsere Ergebnisse, dass die Stimulation der EphB-Rezeptoren mit dem ephrin-B-Liganden zu einer verminderten Phosphorylierung an Nephrintyrosin führt.

Aus den oben beschriebenen Daten stellen wir die folgende Hypothese auf: EphB-Rezeptoren haben eine regulatorische und stabilisierende Funktion auf die Schlitzmembran. Durch die Phosphorylierung des Oberflächenproteins Nephrin wird die homodimere Bindung von Nephrinmolekülen mit gegenüberliegenden Podozyten bewirkt. Die Bindung des EphB-Rezeptors an seinen Liganden ephrin führt zu einer Reduktion der Nephrintyrosinphosphorylierung und zur Durchlässigkeit des glomerulären Filters.

Hierdurch ergibt sich ein dynamisches Regulationsmodell für die Oberflächenproteine ephrin und Eph an der Schlitzmembran.

Unser Modell ist an die Theorien nach New et al. und Quack et al. angelehnt. Für dieses Modell spricht die komplementäre Funktion des EphB-Rezeptors allein und nach Bindung mit seinem Liganden. Es gibt Hinweise wonach die Bindung der Oberflächenproteine ephrin und Eph nicht nur zur Dephosphorylierung, sondern auch zu einer Zellrepulsion führen (Miao et al., 2000). Wenn man sich die Schlitzmembran als dynamisch reguliertes Modell der Stabilität vorstellt, so spricht vieles dafür, dass eine Phosphorylierung von Nephrintyrosin durch den Eph-Rezeptor zu einer verbesserten Stabilität an der Schlitzmembran führen könnte. Die Bindung des ephrin-Liganden an seinen Rezeptor könnte wiederum zu einer Dephosphorylierung am Oberflächenproteine Nephrin und zu einer Destabilisierung und Zellrepulsion führen.

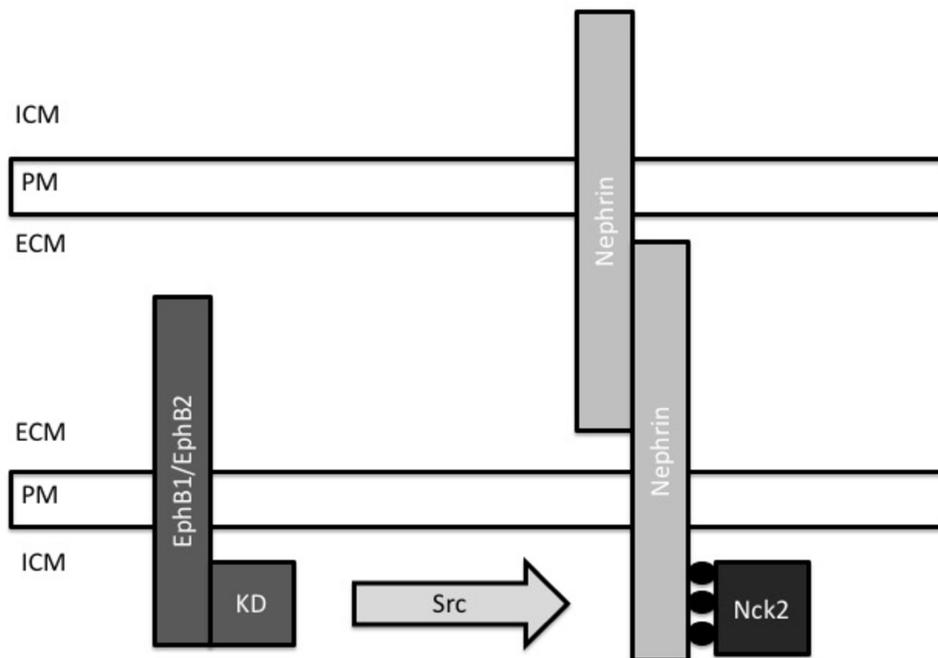


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrintyrosinphosphorylierung und Stabilisierung der Schlitzmembran. Das Oberflächenprotein Nephrin bildet Homodimere zwischen benachbarten Podozyten und stabilisiert hierdurch die Schlitzmembran. Der EphB-Rezeptor vermittelt über seine Tyrosinkinasedomäne und Src-Kinasen die Nephrintyrosinphosphorylierung. Dies führt zu einer vermehrten Bindung der Proteine Nephrin und Nck2. ICM = Intrazellulärraum, PM= Plasmamembran, ECM = Extrazellulärraum, KD = Tyrosinkinasedomäne

4.2 Funktionelle Bedeutung der Nephrinendozytose für die Entstehung einer Proteinurie

Die dynamische Regulation an der Schlitzmembran nach Quack et al. besteht neben einem stabilisierenden aus einem destabilisierenden Mechanismus. Das Protein β -Arrestin2 vermittelt die Endozytose des Oberflächenproteins Nephrin. Eine verminderte Tyrosinphosphorylierung von Nephrintyrosin führt zu einer stärkeren Nephrin- β -Arrestin2-Bindung. Die Bindung der Proteine β -Arrestin2 und Nephrin führt zur Nephrinendozytose. Durch eine verminderte Bildung von Homodimeren mit benachbarten Podozyten kommt es zur Destabilisierung der Schlitzmembran (Quack et al., 2006).

Wir konnten zeigen, dass die EphB-Rezeptoren zu einer verminderten Bindung der Proteine Nephrin und β -Arrestin2 führen. Ein Effekt der Tyrosinkinasedomäne und der Src-Kinasen auf die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung konnte nicht nachgewiesen werden. Auch ein Effekt des EphB-Rezeptors auf die Nephrinendozytose konnte nicht gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass ein Effekt des EphB-Rezeptors auf die Nephrin- β -Arrestin2-Bindung und Endozytose von untergeordneter Bedeutung wäre.

4.3 Podozytäres Zytoskelett – Bedeutung von Adhäsion und Repulsion

Für die Funktion des Podozyten ist sein Zytoskelett von zentraler Bedeutung. Die Rückbildung von Aktinfilamenten führt durch ein sogenanntes *foot process effacement* zur Proteinurie (Tryggvason, 2001). Eine Mutation im α -actinin4-Protein kann eine Ursache der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) sein. Es kommt zur Verplumpung der Podozyten und insbesondere der Fußfortsätze. Hierdurch ist die Filtrationsbarriere gestört und es kommt zur Proteinurie (Kaplan et al., 2000). Um zu untersuchen, ob der EphB-Rezeptor einen Effekt auf das Zytoskelett des Podozyten hat untersuchten wir exemplarisch eine Interaktion mit den Proteinen IQGAP1, FAK und Nck2.

Das Gerüstprotein IQGAP1 ist ein Teil des Nephrin-Multiproteinkomplexes in Podozyten, ein Adapterprotein des Aktin-Zytoskeletts und reguliert dessen Reorganisation mittels Rho-GTPasen (Bashour et al., 1997; Briggs and Sacks, 2003; Rigother et al., 2012). Auch Eph-Rezeptoren regulieren das Zytoskelett von renalen Tubuluszellen über Rho-GTPasen (Ogawa et al., 2006). Wir konnten zeigen, dass die EphB-Rezeptoren mit dem Gerüstprotein

IQGAP1 interagieren. Durch Interaktion mit dem IQGAP1-Protein könnten die Eph-Rezeptoren auch in Podozyten eine Regulation des Zytoskeletts übernehmen.

Die *focal adhesion kinase* (FAK) ist ein Regulator des Aktin-Zytoskeletts. Die Inhibition der FAK-Kinase schützt vor Proteinurie und *foot process effacement* der podozytären Fußfortsätze (Ma et al., 2010). Die Bindung des ephrin-Liganden an den EphA2-Rezeptor führt über die FAK-Kinase zur Zellrepulsion in Prostatakarzinomzellen (Miao et al., 2000). Wir konnten zeigen, dass die EphB-Rezeptoren mit FAK-Kinasen interagieren. Durch Interaktion mit FAK-Kinasen könnten die Eph-Rezeptoren auch Einfluss auf die fokalen Adhäsionen in Podozyten nehmen.

Die EphB-Rezeptoren führen zu einer vermehrten Nephrin-Nck2-Bindung. Nck ist ein Adapterprotein zwischen dem Oberflächenprotein Nephrin und dem Zytoskelett (Li et al., 2006). Das Nck-Protein aktiviert mithilfe seiner SH3-Domäne Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und so zu einer Polymerisation des Aktins und einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (Buday et al., 2002; Jones et al., 2006). Wir konnten zeigen, dass die EphB-Rezeptoren die Nephrin-Nck2-Bindung verstärken. Wir stellen die Hypothese auf, dass EphB-Rezeptoren hierdurch die Stabilität des glomerulären Filters erhöhen.

Wir vermuten eine adhäsive Funktion des Eph-Rezeptors auf Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Podozyten. Dies wird durch Ergebnisse gestützt wonach der EphB1-Rezeptor isoliert eine adhäsive Funktion auf HEK293-Zellen ausübt. Bei dominant inaktiver Tyrosinkinasedomäne ist die adhäsive Eigenschaft aufgehoben (Huynh-Do, 1999). Die Bindung des Liganden ephrin an den EphB-Rezeptor führt vermutlich über die FAK-Kinasen zu einer Zellrepulsion. Diese Theorie wäre vereinbar mit der regulatorischen Funktion des EphB-Rezeptors auf das Gleichgewicht der Schlitzmembran.

Die Interaktion der EphB-Rezeptoren mit den Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts deutet auf eine regulatorische Funktion bei der Ausbildung und Erhaltung des Zytoskeletts, der Fußfortsätze und der Schlitzmembran hin. In einem zweiten Projekt werden diese Effekte auf das Zytoskelett, die Zell-Zell-Kontakte und die Ausbildung von Fußfortsätzen sowie deren Erhaltung genauer untersucht.

4.4 Schlussfolgerungen

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ephrin-Eph-Familie die dynamische Regulation an der Schlitzmembran moduliert. Der EphB-Rezeptor reguliert dieses Gleichgewicht durch Tyrosinphosphorylierung des Oberflächenproteins Nephrin und eine Interaktion mit dem Zytoskelett. Nach der Bestätigung dieser Ergebnisse im Tiermodell könnte die ephrin-Eph-Familie ein potientiell Ziel für eine medikamentöse Therapie von glomerulären Erkrankungen darstellen.

4.5 Selbstkritik

Die vorliegende Arbeit hat folgende Schwächen: Die Schlitzmembran bildet sich zwischen benachbarten Podozyten aus. Für wissenschaftliche Untersuchungen an der Schlitzmembran gibt es zurzeit kein adäquates in-vitro-Modell. Die Zell-Zell-Kontakte der Podozyten bilden sich in der Zellkultur zwar nicht aus, dennoch findet ein Großteil der Schlitzmembranforschung in Zellkulturen statt. Die Ergebnisse müssen daher in-vivo bestätigt werden.

Wir konnten zeigen, dass der EphB-Rezeptor zu einer verminderten Nephrin- β -Arrestin2-Bindung führt. Ein Effekt auf die Src-Kinasen und die Nephrinendozytose ließ sich nicht nachweisen. Möglicherweise spielen zusätzlich andere Mechanismen für die Nephrinendozytose eine Rolle, die nicht von EphB-Rezeptoren moduliert werden.

Exemplarisch haben wir nur die Tyrosinkinasedomäne des EphB2-Rezeptors untersucht. Die Homologie auf Proteinebene in der Tyrosinkinasedomänen der Rezeptoren EphB1 und EphB2 ist sehr groß. Es ist daher zu erwarten, dass die erlangten Ergebnisse zwischen den Rezeptoren EphB2 und EphB1 übertragbar sind. In dieser Arbeit wurde die Tyrosinkinasedomäne des EphB1-Rezeptors nicht untersucht.

Wir untersuchten den Effekt einer Bindung des ephrin-Liganden mit dem Eph-Rezeptor auf die Nephrintyrosinphosphorylierung. Unsere Ergebnisse indizieren eine verminderte Nephrintyrosinphosphorylierung durch Bindung des ephrin-Liganden mit dem Eph-Rezeptor. Aufgrund der niedrigen Fallzahl ist eine wissenschaftlich fundierte Aussage in diesem Zusammenhang nicht möglich. In einem weiteren Projekt wird dieser Effekt genauer untersucht.

5 Literaturverzeichnis

- Alazzouzi, H., Davalos, V., Kokko, A., Domingo, E., Woerner, S.M., Wilson, A.J., Konrad, L., Laiho, P., Espín, E., Armengol, M., Imai, K., Yamamoto, H., Mariadason, J.M., Gebert, J.F., Aaltonen, L.A., Schwartz, S., Arango, D., 2005. Mechanisms of Inactivation of the Receptor Tyrosine Kinase EPHB2 in Colorectal Tumors. *Cancer Res.* 65, 10170–10173. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2580
- Avasthi, P.S., Koshy, V., 1988. Glomerular endothelial glycocalyx. *Contrib. Nephrol.* 68, 104–113.
- Barker, D.F., Hostikka, S.L., Zhou, J., Chow, L.T., Oliphant, A.R., Gerken, S.C., Gregory, M.C., Skolnick, M.H., Atkin, C.L., Tryggvason, K., 1990. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248, 1224–1227.
- Bashour, A.M., Fullerton, A.T., Hart, M.J., Bloom, G.S., 1997. IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments. *J. Cell Biol.* 137, 1555–1566.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M.C., Niaudet, P., Antignac, C., 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat. Genet.* 24, 349–354. doi:10.1038/74166
- Briggs, M.W., Sacks, D.B., 2003. IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4, 571–574. doi:10.1038/sj.embor.embor867
- Brill, S., Li, S., Lyman, C.W., Church, D.M., Wasmuth, J.J., Weissbach, L., Bernards, A., Snijders, A.J., 1996. The Ras GTPase-activating-protein-related human protein IQGAP2 harbors a potential actin binding domain and interacts with calmodulin and Rho family GTPases. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4869–4878.
- Buday, L., Wunderlich, L., Tamás, P., 2002. The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell. Signal.* 14, 723–731.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K., 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.
- Davis, S., Gale, N.W., Aldrich, T.H., Maisonpierre, P.C., Lhotak, V., Pawson, T., Goldfarb, M., Yancopoulos, G.D., 1994. Ligands for EPH-related receptor tyrosine kinases that require membrane attachment or clustering for activity. *Science* 266, 816–819.
- Drenckhahn, D., Franke, R.P., 1988. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 59, 673–682.
- Eph Nomenclature Committee, 1997. Unified Nomenclature for Eph Family Receptors and Their Ligands, the Ephrins. *Cell* 90, 403–404. doi:10.1016/S0092-8674(00)80500-0
- Farquhar, M.G., Vernier, R.L., Good, R.A., 1957. An Electron Microscope Study of the Glomerulus in Nephrosis, Glomerulonephritis, and Lupus Erythematosus. *J. Exp. Med.* 106, 649–660. doi:10.1084/jem.106.5.649

- Gerke, P., Huber, T.B., Sellin, L., Benzing, T., Walz, G., 2003. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J. Am. Soc. Nephrol.* *JASN* 14, 918–926.
- Hashimoto, T., Karasawa, T., Saito, A., Miyauchi, N., Han, G.D., Hayasaka, K., Shimizu, F., Kawachi, H., 2007. Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney Int.* 72, 954–964. doi:10.1038/sj.ki.5002454
- Henry, C.B., Duling, B.R., 1999. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *Am. J. Physiol.* 277, H508–514.
- Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T., 1995. Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase. *Mol. Biol. Cell* 6, 637–647.
- Huber, T.B., Simons, M., Hartleben, B., Sernetz, L., Schmidts, M., Gundlach, E., Saleem, M.A., Walz, G., Benzing, T., 2003. Molecular basis of the functional podocin–nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum. Mol. Genet.* 12, 3397–3405. doi:10.1093/hmg/ddg360
- Hudson, B.G., Reeders, S.T., Tryggvason, K., 1993. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J. Biol. Chem.* 268, 26033–26036.
- Hudson, B.G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M., Neilson, E.G., 2003. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.* 348, 2543–2556. doi:10.1056/NEJMra022296
- Huynh-Do, U., 1999. Surface densities of ephrin-B1 determine EphB1-coupled activation of cell attachment through alpha vbeta 3 and alpha 5beta 1 integrins. *EMBO J.* 18, 2165–2173. doi:10.1093/emboj/18.8.2165
- Ishibe, S., Joly, D., Liu, Z.-X., Cantley, L.G., 2004. Paxillin Serves as an ERK-Regulated Scaffold for Coordinating FAK and Rac Activation in Epithelial Morphogenesis. *Mol. Cell* 16, 257–267. doi:10.1016/j.molcel.2004.10.006
- Jones, N., Blasutig, I.M., Eremina, V., Ruston, J.M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S.S.-C., Takano, T., Quaggin, S.E., Pawson, T., 2006a. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature* 440, 818–823. doi:10.1038/nature04662
- Jones, N., New, L.A., Fortino, M.A., Eremina, V., Ruston, J., Blasutig, I.M., Aoudjit, L., Zou, Y., Liu, X., Yu, G.-L., Takano, T., Quaggin, S.E., Pawson, T., 2009. Nck Proteins Maintain the Adult Glomerular Filtration Barrier. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 1533–1543. doi:10.1681/ASN.2009010056
- Kalo, M.S., Pasquale, E.B., 1999. Multiple in vivo tyrosine phosphorylation sites in EphB receptors. *Biochemistry (Mosc.)* 38, 14396–14408.
- Kaplan, J.M., Kim, S.H., North, K.N., Rennke, H., A, L., Tong, H.-Q., Mathis, B.J., Rodríguez-Pérez, J.-C., Allen, P.G., Beggs, A.H., Pollak, M.R., 2000. Mutations in ACTN4, encoding α -actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Genet.* 24, 251–256. doi:10.1038/73456

- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., Tryggvason, K., 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* 1, 575–582.
- Khoshnoodi, J., Sigmundsson, K., Öfverstedt, L.-G., Skoglund, U., Öbrink, B., Wartiovaara, J., Tryggvason, K., 2003. Nephrin Promotes Cell-Cell Adhesion through Homophilic Interactions. *Am. J. Pathol.* 163, 2337–2346. doi:10.1016/S0002-9440(10)63590-0
- Kos, C.H., Le, T.C., Sinha, S., Henderson, J.M., Kim, S.H., Sugimoto, H., Kalluri, R., Gerszten, R.E., Pollak, M.R., 2003. Mice deficient in α -actinin-4 have severe glomerular disease. *J. Clin. Invest.* 111, 1683–1690. doi:10.1172/JCI200317988
- Kriz, W., Kobayashi, N., Elger, M., 1998. New aspects of podocyte structure, function, and pathology. *Clin. Exp. Nephrol.* 2, 85–99. doi:10.1007/BF02479929
- Kullander, K., Klein, R., 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 475–486. doi:10.1038/nrm856
- Lahdenperä, J., Kilpeläinen, P., Liu, X.L., Pikkarainen, T., Reponen, P., Ruotsalainen, V., Tryggvason, K., 2003. Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int.* 64, 404–413. doi:10.1046/j.1523-1755.2003.00097.x
- Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K., 2005. Transduction of Receptor Signals by β -Arrestins. *Science* 308, 512–517. doi:10.1126/science.1109237
- Li, H., Lemay, S., Aoudjit, L., Kawachi, H., Takano, T., 2004. SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 15, 3006–3015. doi:10.1097/01.ASN.0000146689.88078.80
- Li, H., Zhu, J., Aoudjit, L., Latreille, M., Kawachi, H., Larose, L., Takano, T., 2006. Rat nephrin modulates cell morphology via the adaptor protein Nck. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 310–316. doi:10.1016/j.bbrc.2006.08.053
- Lu, W., Katz, S., Gupta, R., Mayer, B.J., 1997. Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr. Biol.* CB 7, 85–94.
- Ma, H., Togawa, A., Soda, K., Zhang, J., Lee, S., Ma, M., Yu, Z., Ardito, T., Czyzyk, J., Diggs, L., Joly, D., Hatakeyama, S., Kawahara, E., Holzman, L., Guan, J.L., Ishibe, S., 2010. Inhibition of Podocyte FAK Protects against Proteinuria and Foot Process Effacement. *J. Am. Soc. Nephrol.* 21, 1145–1156. doi:10.1681/ASN.2009090991
- Martínez, A., Soriano, E., 2005. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: emphasis on the hippocampal system. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 49, 211–226. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.02.001
- Mellitzer, G., Xu, Q., Wilkinson, D.G., 1999. Eph receptors and ephrins restrict cell intermingling and communication. *Nature* 400, 77–81. doi:10.1038/21907

- Miao, H., Burnett, E., Kinch, M., Simon, E., Wang, B., 2000. Activation of EphA2 kinase suppresses integrin function and causes focal-adhesion-kinase dephosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 2, 62–69. doi:10.1038/35000008
- New, L.A., Chahi, A.K., Jones, N., 2013. Direct Regulation of Nephrin Tyrosine Phosphorylation by Nck Adaptor Proteins. *J. Biol. Chem.* 288, 1500–1510. doi:10.1074/jbc.M112.439463
- Ni, X., Ji, C., Cao, G., Cheng, H., Guo, L., Gu, S., Ying, K., Zhao, R.C., Mao, Y., 2003. Molecular cloning and characterization of the protein 4.1O gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary. *J. Hum. Genet.* 48, 101–106. doi:10.1007/s100380300015
- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S., Kaibuchi, K., 2005. IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J. Cell Sci.* 118, 2085–2092. doi:10.1242/jcs.02379
- Ogawa, K., Wada, H., Okada, N., Harada, I., Nakajima, T., Pasquale, E.B., Tsuyama, S., 2006. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of medullary tubule cells through Rho family GTPases. *J. Cell Sci.* 119, 559–570. doi:10.1242/jcs.02777
- Palmer, A., Klein, R., 2003. Multiple roles of ephrins in morphogenesis, neuronal networking, and brain function. *Genes Dev.* 17, 1429–1450. doi:10.1101/gad.1093703
- Pasquale, E.B., 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 462–475. doi:10.1038/nrm1662
- Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M., 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol. Rev.* 83, 253–307. doi:10.1152/physrev.00020.2002
- Poliakov, A., Cotrina, M., Wilkinson, D.G., 2004. Diverse roles of eph receptors and ephrins in the regulation of cell migration and tissue assembly. *Dev. Cell* 7, 465–480. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.006
- Quack, I., Rump, L.C., Gerke, P., Walther, I., Vinke, T., Vonend, O., Grunwald, T., Sellin, L., 2006. β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 14110–14115. doi:10.1073/pnas.0602587103
- Rigothier, C., Auguste, P., Welsh, G.I., Lepreux, S., Deminière, C., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., Ripoche, J., Combe, C., 2012. IQGAP1 Interacts with Components of the Slit Diaphragm Complex in Podocytes and Is Involved in Podocyte Migration and Permeability In Vitro. *PLoS ONE* 7, e37695. doi:10.1371/journal.pone.0037695
- Rodewald, R., Karnovsky, M.J., 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* 60, 423–433.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H.Y., Kirschner, M.W., Mayer, B.J., 2001. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 26448–26452. doi:10.1074/jbc.M103856200

- Roselli, S., Gribouval, O., Boute, N., Sich, M., Benessy, F., Attié, T., Gubler, M.-C., Antignac, C., 2002. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am. J. Pathol.* 160, 131–139. doi:10.1016/S0002-9440(10)64357-X
- Schiffer, M., Mundel, P., Shaw, A.S., Böttinger, E.P., 2004. A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor-beta-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 37004–37012. doi:10.1074/jbc.M403534200
- Schmieder, S., Nagai, M., Orlando, R.A., Takeda, T., Farquhar, M.G., 2004. Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 15, 2289–2298. doi:10.1097/01.ASN.0000135968.49899.E8
- Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M.A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A.S., Holzman, L.B., Mundel, P., 2001. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J. Clin. Invest.* 108, 1621–1629.
- Takasu, M.A., Dalva, M.B., Zigmond, R.E., Greenberg, M.E., 2002. Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors. *Science* 295, 491–495. doi:10.1126/science.1065983
- Takeda, T., McQuistan, T., Orlando, R.A., Farquhar, M.G., 2001. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J. Clin. Invest.* 108, 289–301. doi:10.1172/JCI12539
- Topham, P.S., Kawachi, H., Haydar, S.A., Chugh, S., Addona, T.A., Charron, K.B., Holzman, L.B., Shia, M., Shimizu, F., Salant, D.J., 1999. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J. Clin. Invest.* 104, 1559–1566. doi:10.1172/JCI7728
- Tryggvason, K., 2001. Molecular basis of glomerular permselectivity : Current Opinion in Nephrology and Hypertension [WWW Document]. LWW. URL http://journals.lww.com/co-nephrologyhypertens/Fulltext/2001/07000/Molecular_basis_of_glomerular_permselectivity.9.aspx (accessed 2.25.16).
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Burrige, K., 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *J. Cell Biol.* 111, 1059–1068.
- Verma, R., 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J. Clin. Invest.* 116, 1346–1359. doi:10.1172/JCI27414
- Verma, R., Kovari, I., Soofi, A., Nihalani, D., Patrie, K., Holzman, L.B., 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J. Clin. Invest.* 116, 1346–1359. doi:10.1172/JCI27414
- Verma, R., Wharram, B., Kovari, I., Kunkel, R., Nihalani, D., Wary, K.K., Wiggins, R.C., Killen, P., Holzman, L.B., 2003. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J. Biol. Chem.* 278, 20716–20723. doi:10.1074/jbc.M301689200

- Vinke, T., 2011. β -arrestin2 interagiert phosphorylierungsabhängig mit Nephrin [Elektronische Ressource]: ein neues, dynamisch reguliertes Modell der glomerulären Schlitzmembran / Tobias Vinke. Gutachter: L. Christian Rump; Brigitte Royer-Pokora. Universitäts- und Landesbibliothek der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf.
- Wartiovaara, J., Öfverstedt, L.-G., Khoshnoodi, J., Zhang, J., Mäkelä, E., Sandin, S., Ruotsalainen, V., Cheng, R.H., Jalanko, H., Skoglund, U., Tryggvason, K., 2004. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J. Clin. Invest.* 114, 1475–1483. doi:10.1172/JCI22562
- Yamaguchi, Y., Pasquale, E.B., 2004. Eph receptors in the adult brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 288–296. doi:10.1016/j.conb.2004.04.003
- Zhang, Y., Yoshida, Y., Nameta, M., Xu, B., Taguchi, I., Ikeda, T., Fujinaka, H., Mohamed, S.M., Tsukaguchi, H., Harita, Y., Yaoita, E., Yamamoto, T., 2010. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* gfp697. doi:10.1093/ndt/gfp697

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der dynamischen Regulation an der Schlitzmembran nach Quack et al. <i>Copyright (2006) National Academy of Sciences</i>	6
Abbildung 2: Die Rezeptoren EphB1-3 und die Liganden ephrinb1-3 werden in humanen und murinen Zellen exprimiert	23
Abbildung 3: Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 interagieren mit der FAK-Kinase und dem Gerüstprotein IQGAP1 nicht jedoch mit dem Protein Paxillin	24
Abbildung 4: Die Liganden ephrinb1 und ephrinb2 interagieren mit dem Nephrin-Protein	26
Abbildung 5: Der EphB-Rezeptor phosphoryliert das Oberflächenprotein Nephrin mithilfe seiner Tyrosinkinasedomäne und Src-Kinasen	29
Abbildung 6: Stimulation mit dem Liganden ephrinb1 reduziert die Nephrintyrosinphosphorylierung	31
Abbildung 7: Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 verstärken die Nephrin-Nck2-Bindung .	34
Abbildung 8: Die Rezeptoren EphB1 und EphB2 reduzieren Nephrin- β -Arrestin2-Bindung	37
Abbildung 9: Der Rezeptor EphB2 beeinflusst die Nephrinendozytose nicht	39
Abbildung 10: Schematischer Aufbau der EphB-Rezeptor-vermittelten Nephrintyrosinphosphorylierung und Stabilisierung der Schlitzmembran	43

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der Geräte und ihrer Hersteller	12
Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien und ihrer Hersteller	12
Tabelle 3: Antikörper mit Hersteller und verwendeter Verdünnung.....	16
Tabelle 4: Primer mit Sequenz und Basenpaaren	17
Tabelle 5: Kommerzielle Kits und ihre Hersteller.....	18

6.3 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Dissertation ermöglicht haben. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Herrn Prof. Sellin für seine Vorarbeit und seine Unterstützung bedanken. Einen besonderen Dank für ihr Engagement bei der Betreuung und die Überlassung des Themas möchte ich an Frau Dr. Königshausen aussprechen. Bei Herrn Prof. Rump bedanke ich mich für die Vermittlung und Möglichkeit mich in der experimentellen Nephrologie zu engagieren.

Ich möchte mich bei allen technischen Angestellten und Doktoranden für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung bedanken. Zudem möchte ich auch meinen Freunden und meiner Familie für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Unterstützung ein Dankeschön aussprechen.