

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. L. C. Rump

Der Einfluss von podozytären Proteinen auf die Zellmigration

Dissertation

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

vorgelegt von
Marie Schönberger

2020

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

gez: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Florian Simon

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Vor kurzem wurden Mutationen von zytoskelettalen Proteinen im Podozyten bei hereditären proteinurischen Erkrankungen entdeckt. Dazu gehören zum einen Mutationen im GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1*) kodierenden Gen beim idiopathischen nephrotischen Syndrom von Kindern und zum anderen Mutationen im Protein 4.1O kodierenden Gen bei der Anfälligkeit für diabetische Nephropathie. Es ist bekannt, dass der Podozyt hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationsbarriere ist und das spezifische podozytäre Zytoskelett einschließlich der Migrationseigenschaften für seine Zellfunktion unerlässlich ist.

In dieser Arbeit geht es um den Einfluss von GLEPP1 bzw. Protein 4.1O auf Zellmigration und die Auswirkungen von GLEPP1 als Rezeptor Tyrosinphosphatase auf Proteine fokaler Adhäsionen wie FAK (*Focal Adhesion Kinase*) und Paxillin. Dazu wurden Migrationsassays, Immunfluoreszenzen und Immunopräzipitationen durchgeführt. Es zeigte sich, dass GLEPP1 *Knockout* die Zellmigration steigert. Überexpression von GLEPP1 und Expression von Protein 4.1O verstärkten jeweils interessanterweise ebenfalls die Zellmigration. In Immunfluoreszenzen wurde dargestellt, dass GLEPP1 Expression die Anzahl fokaler Adhäsionen steigert. Durch Immunopräzipitationen wurde deutlich, dass GLEPP1 FAK (*Focal Adhesion Kinase*) in den fokalen Adhäsionen aktiviert, durch indirekte Phosphorylierung am Tyrosin 576/577, der Hauptaktivierungsstelle von FAK. GLEPP1 hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung an der Hauptautophosphorylierungsstelle von FAK, Tyrosin 397, oder auf die Phosphorylierung von Paxillin an Tyrosin 31.

GLEPP1 *Knockout* steigerte erwartungsgemäß die Zellmigration - Hypermotilität wird klassischerweise mit Proteinurie verbunden. Erstaunlicherweise führten GLEPP1 Überexpression und Protein 4.1O Expression jeweils auch zu vermehrter Zellmigration. Möglicherweise hat eine gewisse podozytäre Motilität auch einen nephroprotektiven Effekt.

Neben dem bereits bekannten Weg der FAK Aktivierung über Integrinligation und Autophosphorylierung an Tyrosin 397 stimuliert GLEPP1 einen alternativen Weg der FAK Aktivierung über Src-vermittelte Phosphorylierung an Tyrosin 576/577 und kann so Zellmigration fördern. Die Aktivierung von Paxillin ist dagegen nicht primär von GLEPP1 abhängig. Dysregulation der Zellmigration durch fehlende Expression von GLEPP1 bzw. Protein 4.1O kann zum Zusammenbruch der glomerulären Filtrationsbarriere und somit zu proteinurischen Erkrankungen führen.

Abstract

Recently, short nucleotide polymorphisms in podocyte cytoskeletal proteins have been identified in hereditary proteinuric diseases. These include mutations in the gene encoding GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1*) in childhood idiopathic nephrotic syndrome and mutations in the gene encoding protein 4.1O in susceptibility for diabetic nephropathy. It is widely known that the podocyte is mainly responsible for the maintenance of the glomerular filtration barrier and that the specific podocyte cytoskeleton including its migration characteristics are crucial for the function of the podocyte.

In this study the influence of GLEPP1 respectively protein 4.1O on cell migration and the effect of GLEPP1 as a receptor tyrosine phosphatase on focal adhesion proteins as FAK (*Focal Adhesion Kinase*) and Paxillin were examined. Migration assays, immunofluorescences and immunoprecipitations were part of the investigation. We showed that GLEPP1 knockout increases cell migration. Interestingly, overexpression of GLEPP1 and expression of protein 4.1O both also heighten cell migration. In immunofluorescence GLEPP1 expression raises the number of focal adhesions. In immunoprecipitation we verified that GLEPP1 activates FAK (*Focal Adhesion Kinase*) in focal adhesions via indirect phosphorylation of tyrosine 576/577, the main activation site of FAK. We could not detect any influence of GLEPP1 on the main autophosphorylation site of FAK, tyrosine 397, or on phosphorylation of paxillin on tyrosine 31.

GLEPP1 knockout increases cell migration as expected – hypermotility is conventionally associated with proteinuria. Astonishingly, GLEPP1 overexpression and protein 4.1O expression also lead to enhanced cell migration. Certain podocyte motility might also have a nephroprotective effect.

Besides the familiar signaling path of FAK activation, via integrin ligation and autophosphorylation on tyrosine 397, GLEPP1 stimulates an alternative path to activate FAK by Src-induced Phosphorylation on tyrosine 576/577 and can thus promote migration. However, activation of paxillin is not primarily GLEPP1 dependant. Missing GLEPP1 respectively protein 4.1O expression followed by dysregulation of cell migration can cause a breakdown of the glomerular filtration barrier and thereby result in proteinuria.

Abkürzungsverzeichnis

a-	anti-
ACE	<i>Angiotensin Converting Enzyme</i>
A. d.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arp 2/3	<i>actin related protein</i>
BAC1.2F5	<i>colony stimulating factor (CSF)-1 bzw. granulocyte-macrophage-CSF</i> abhängige murine Makrophagen
BSA	Bovines Serum Albumin
CAS	<i>Crk-associated substrate</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
COS	<i>CV1 in origin with SV40 genes</i>
Crk	<i>CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase</i>
CSF	<i>colony stimulating factor</i>
Csk	<i>COOH-terminal Src kinase</i>
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOCK180	<i>180kDa Protein downstream of Crk</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECV304 Zellen	<i>endothelial cell of vessel 304</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELMO	<i>engulfment and cell motility</i>
ESRD	<i>End-Stage Renal Disease</i>
F.	<i>Flag</i>

FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FERM	Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin
FRMD3	<i>4.1 protein ezrin, radixin, moesin domain containing 3</i>
FRNK	<i>FAK-related-non kinase</i>
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
G418	Geneticin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GDP	Guanosinnukleotiddiphosphat
GFB	Glomeruläre Filtrationsbarriere
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLEPP1	<i>Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1</i>
GTP	Guanosinnukleotidtriphosphat
HEBS	<i>HEPES-buffered saline solution</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HPLC-Wasser	<i>High performance liquid chromatography-Wasser</i>
hPodo	humaner Podozyt
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
IFN- γ	Interferon γ
IP	Immunopräzitation
IQGAP	<i>IQ motif containing GTPase activating protein</i>
ITS	Insulin, Transferrin, Selen
KO	<i>Knockout</i>
Kon	Kontrolle
LB	<i>lysogeny broth</i>
LIM	Lin-11, Isl-1, Mec-3

LMA	<i>low melting Agarose</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Maxipräp	Maxipräparation
MCD	<i>Minimal Change Disease</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mPodo	muriner Primärpodozyt
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ns	nicht signifikant
NPHS	<i>nephrotic syndrome</i>
OD	optische Dichte
PAK	<i>p21 activated kinase</i>
PAN	Puromycin Aminonukleosid Nephrose
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase
PIPK γ	Typ 1 Phosphatidylinositolphosphatkinase- γ
PIX	<i>PAK interacting exchange factor</i>
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PTPRO	Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase O
P-Y	Phospho-Tyrosin
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RPMI	Eigenname (Roswell Park Memorial Institute)
sec	Sekunde(n)
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNGFR	<i>single nephron GFR</i>
SH2	<i>Src homology 2</i>
SH3	<i>Src homology 3</i>
slg	<i>surface immunoglobulin</i>
SRNS	Steroid resistentes Nephrotisches Syndrom
SV	<i>Simian Virus</i>

Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
U/min	Umdrehungen pro Minute
uPAR	<i>urokinase-type plasminogen activator receptor</i>
VLE	<i>Very Low Endotoxin</i>
WASp	<i>Wiskott–Aldrich Syndrome protein</i>
WPA Mutante	Mutante mit WPA Aminosäuresequenz (Tryptopan-Prolin-Alanin) statt wie beim Wildtyp WPD (Tryptophan-Prolin-Asparaginsäure)
WT	Wildtyp
WT1	Wilms-Tumor-Protein
x g	Einheit der g-Kraft
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema vom Glomerulum	3
Abb. 2: Scannendes Elektronenmikrogramm von Podozyten im Glomerulum	4
Abb. 3: Wichtige Proteine der glomerulären Filtrationsbarriere	5
Abb. 4: Top Ansicht von normalen und retrahierten podozytären Fußfortsätzen	6
Abb. 5: Struktur von GLEPP1 als transmembranäre Rezeptor Tyrosinphosphatase in der Podozytenmembran	8
Abb. 6: Struktur und Bindestellen von <i>Focal Adhesion Kinase</i>	12
Abb. 7: Struktur und Bindestellen von Paxillin	14
Abb. 8: Protrusionen und Adhäsionen einer migrierenden Zelle	17
Abb. 9: Maturation von Adhäsionen und Aktivierung der Rho GTPasen	18
Abb. 10: Migrationsassay mit GLEPP1 Wildtyp (GLEPP1 +/+) und GLEPP1 <i>Knockout</i> (GLEPP1 -/-) murinen Primärpodozyten	46
Abb. 11: Statistische Auswertung der Migration von GLEPP1 Wildtyp und GLEPP1 <i>Knockout</i> murinen Primärpodozyten nach 12 h und 24 h	47
Abb. 12: Migrationsassay mit stabil transduzierten COS-7 Zellen: GLEPP1 überexprimierende Zellen vs. Kontrolle (GFP überexprimierende Zellen)	48
Abb. 13: Statistische Auswertung der Migration von GLEPP1 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen nach 12 und 24h	49
Abb. 14: Immunfluoreszenz von murinen Primärpodozyten	50
Abb. 15: Immunfluoreszenzen von slg, slg GLEPP1 cyt und slg GLEPP1 cyt WPA transfizierten COS-7 Zellen mit Färbung von slg (<i>surface immunoglobulin</i>) (grün), FAK (rot) und P-Tyrosin (blau) und <i>merge</i> -Bild aus den drei Färbungen	52
Abb. 16: Statistische Darstellung der Tyrosinphosphorylierung in fokalen Adhäsionen von slg, slg GLEPP1 cyt und slg GLEPP1 cyt WPA transfizierten Zellen	53
Abb. 17: Repräsentativer Western Blot von der Immunopräzipitation (IP) zur Phosphorylierung von FAK Y576/577 bei CD16.7 (Kontrolle), CD16.7 GLEPP1 cyt bzw. CD16.7 GLEPP1 cyt WPA Expression	54

Abb. 18: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y576/577 FAK in CD16.7 GLEPP1 bzw. CD16.7 GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen in Bezug zur Kontrolle (CD16.7 exprimierende Zellen)	55
Abb. 19: Repräsentativer Western Blot zur Phosphorylierung von Y397 FAK in slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) bzw. slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) exprimierenden Zellen ..	56
Abb. 20: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y397 FAK in slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen in Bezug zur Kontrolle (slg exprimierende Zellen)	57
Abb. 21: Repräsentativer Western Blot zur Phosphorylierung von Y31 Paxillin in slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA überexprimierenden Zellen	58
Abb. 22: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y31 Paxillin in slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen im Vergleich zu slg exprimierenden Zellen (Kontrolle)	59
Abb. 23: Repräsentativer Migrationsassay mit stabil transduzierten humanen Podozyten: 4.10 vs. Kontrolle (GFP)	60
Abb. 24: Statistische Auswertung der Migration von stabil transduzierten humanen Podozyten: 4.10 vs. Kontrolle mit GFP ..	61

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Proteinurische Erkrankungen	1
1.2	Die Niere	3
1.3	Der Podozyt und der glomeruläre Filter	3
1.4	GLEPP1	7
1.5	Fokale Adhäsionen.....	9
1.5.1	Aufbau	9
1.5.2	Signaltransduktion an fokalen Adhäsionen.....	10
1.5.3	FAK.....	11
1.5.4	Paxillin.....	13
1.5.5	Die Rolle von fokalen Adhäsionen in Zellmigration	15
1.6	Protein 4.10	19
1.7	Zellmigration	21
1.8	Fragestellung der Doktorarbeit	22
2	Methoden	23
2.1	Materialien.....	23
2.1.1	Zellkultur.....	23
2.1.2	Migrationsassays	25
2.1.3	Immunfluoreszenz	25
2.1.4	Immunopräzipitation.....	26
2.1.5	Ligation	28
2.1.6	Transformation	28
2.1.7	Mini- und Maxikultur, Maxi-Präp	29
2.1.8	Restriktionsenzymverdau	29
2.1.9	Geräte	30
2.1.10	Statistik	30
2.2	Zellkultur	31
2.2.1	HEK 293T (<i>Human Embryonic Kidney</i>).....	31
2.2.2	COS-7 Zellen (CV1 in origin with SV40 genes)	32

2.2.3	Murine Primärpodozyten	32
2.2.4	Humane Podozyten	33
2.2.5	Zellen auszählen	34
2.3	Migrationsassays.....	35
2.4	Immunfluoreszenz	35
2.4.1	Grundlagen	35
2.4.2	Transfektion von COS-7 Zellen für die Immunfluoreszenz.....	36
2.4.3	Fixierung, Antikörper-Inkubation, Präparatherstellung.....	36
2.5	Immunopräzipitation	38
2.5.1	Grundlagen	38
2.5.2	Transfektion für die Immunopräzipitation	38
2.5.3	Zellernte.....	39
2.5.4	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	41
2.6	DNA-Subklonierung.....	43
2.6.1	Ligation	43
2.6.2	Transformation/Amplifikation.....	43
2.6.3	Minikultur	44
2.6.4	Maxikultur und Maxipräp.....	44
2.6.5	Restriktionsenzymverdau	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	GLEPP1	46
3.1.1	Migrationsassays	46
3.1.2	Immunfluoreszenzen	50
3.1.3	Immunopräzipitationen.....	54
3.2	Protein 4.1O	60
3.2.1	Der Einfluss von Protein 4.1O Expression auf die Zellmigration in humanen Podozyten.....	60
4	Diskussion	62
5	Literaturverzeichnis	78
6	Danksagung	86

1 Einleitung

1.1 Proteinurische Erkrankungen

Die Proteinurie ist ein wichtiges Gesundheitsproblem, da Proteinurie mit kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert ist (Welsh and Saleem 2012). Progressive Proteinurie kann zu terminaler Niereninsuffizienz führen (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007).

Eine Proteinurie ist in der Regel durch eine Schwächung der glomerulären Filtrationsbarriere gekennzeichnet (Welsh and Saleem 2012). Ätiologisch sind glomeruläre Erkrankungen auf systemische metabolische Erkrankungen (z. B. Diabetes mellitus), autoimmune Komplexbildung (z. B. bei Membranöser oder Lupusnephropathie) oder primär podozytäre Erkrankungen (z. B. *Minimal Change Disease* (MCD; steroid-sensitiv) oder die Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS; steroid-insensitiv)) zurückzuführen (Kerjaschki 2001).

Vererbte Formen von Proteinurie umfasst eine heterogene Gruppe von renalen Erkrankungen (Tryggvason, Patrakka et al. 2006). Der Krankheitsverlauf, z. B. bezogen auf den Symptombeginn oder das Ausmaß der Proteinurie, ist sehr variabel; unabhängig von der Ursache sind viele hereditäre Podozytopathien jedoch resistent gegenüber einer Immunsuppression (Jefferson, Alpers et al. 2011) und es kommt häufig zum Progress bis zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Tryggvason, Patrakka et al. 2006).

Vor wenigen Jahren wurden neue Entdeckungen bezüglich der Pathogenese von hereditären proteinurischen Erkrankungen gemacht.

Bei einem Teil der Kinder mit idiopathischem nephrotischem Syndrom wurden vererbte Defekte in der Podozytenstruktur und -funktion festgestellt (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Mutationen des Nephrin kodierenden Gens NPHS1 wurden als pathogenetische Ursache des Kongenitalen Nephrotischen Syndroms vom Finnischen Typ identifiziert, welche bereits in utero zu schwerem nephrotischen Syndrom führt

und von kompletter Abflachung der podozytären Fußfortsätze begleitet ist (Kerjaschki 2001). Außerdem wurden Mutationen des Podocin kodierenden NPHS2 Gens als Ursache einer autosomal-rezessiven Form der FSGS erkannt (Boute, Gribouval et al. 2000).

Neuerdings gab es zwei weitere Erkenntnisse, die Gegenstand dieser Arbeit sind: Erstens wurden Mutationen im GLEPP1 kodierenden PTPRO (Rezeptor-Protein-Tyrosinphosphatase O) Gen als eine Ursache des idiopathischen nephrotischen Syndroms im Kindesalter entdeckt (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

Zweitens wurden das Protein 4.1O kodierende FRMD3 (*4.1 protein ezrin, radixin, moesin domain containing 3*) Gen als Kandidatengen für diabetische Nephropathie identifiziert (Pezzolesi, Poznik et al. 2009).

Gemeinsam ist diesen Proteinen, dass sie vermutlich an dem spezifischen Zytoskelett des Podozyten beteiligt sind bzw. es regulieren. Eine Neuordnung des Aktinzytoskeletts durch Mutationen von podozytären Proteinen kann zu einer Störung der Filtrationsbarriere und darauffolgender renaler Erkrankung führen (Faul, Asanuma et al. 2007). Proteinurische Nierenerkrankungen sind typischerweise assoziiert mit einer Auslöschung der Fußfortsätze und/oder Störungen der Schlitzmembran durch eine Umordnung des podozytären Mikrofilamentsystems (Faul, Asanuma et al. 2007, Wei, Moller et al. 2008). Im Kontext mit proteinurischen Nierenerkrankungen ist es daher nötig, die Regulation des Aktinzytoskeletts im Podozyten zu erforschen (Faul, Asanuma et al. 2007).

16 von 100.000 Kindern sind von idiopathischem nephrotischem Syndrom, charakterisiert durch eine massive Proteinurie infolge eines Verlustes der glomerulären Permeabilitätsselektivität, betroffen (1978, Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). 10 – 20 % der Kinder mit idiopathischem nephrotischem Syndrom sind steroidresistent (SRNS) und ihre Nierenfunktion nimmt progredient ab, typischerweise bis hin zu einer terminalen Niereninsuffizienz (1981, Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

Die diabetische Nephropathie ist eine komplexe Erkrankung, die durch eine abnormale Albuminexkretion in den Urin und eine abnehmende Nierenfunktion gekennzeichnet

ist (Pezzolesi, Jeong et al. 2013). Für Patienten unter 21 Jahren mit Insulin-abhängigem Diabetes mellitus beträgt die kumulative Inzidenz circa 21,3%, innerhalb von 35 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz zu entwickeln (Krolewski, Eggers et al. 1996).

1.2 Die Niere

Die humane Niere enthält circa eine Million Nephrone, die je aus einem Glomerulum und einem renalen Tubulus bestehen (Jefferson, Alpers et al. 2011). Das Glomerulum ist ein Büschel aus Kapillarschleifen, das durch das Mesangium gestützt wird und durch eine taschenartige Extension des renalen Tubulus, die Bowman-Kapsel, eingeschlossen wird (Jefferson, Alpers et al. 2011). Im Glomerulum gibt es vier Zelltypen: (1) die mesangiale Zelle, (2) die glomeruläre endotheliale Zelle, (3) die viszerale epitheliale Zelle (der Podozyt) und (4) die parietale epitheliale Zelle (siehe Abb. 1) (Jefferson, Alpers et al. 2011).

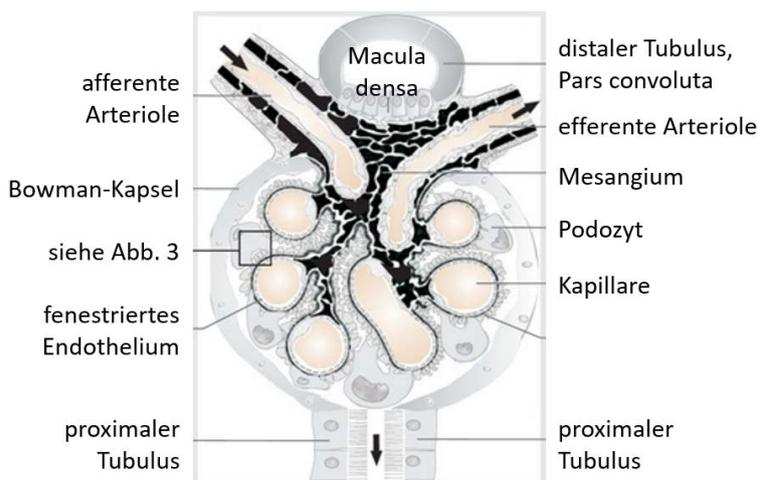


Abb. 1: Schema vom Glomerulum. Modifiziert übernommen von (Toblli, Bevione et al. 2012)

1.3 Der Podozyt und der glomeruläre Filter

Es ist bekannt, dass der Podozyt hauptverantwortlich für die Entwicklung und Progression von glomerulären Erkrankungen bis hin zum chronischen renalen Versagen ist (Kriz 2002). Das klassische klinische Merkmal von *podocyte injury* ist ein Proteinverlust (Jefferson, Alpers et al. 2011).

Der Podozyt ist eine hochdifferenzierte epitheliale Zelle aus dem viszeralem Blatt der Bowman-Kapsel im Glomerulum (Jefferson, Alpers et al. 2011). Er besteht aus einem Zellkörper, Hauptfortsätzen, Sekundärfortsätzen und den feinen Fußfortsätzen, die mit den Fußfortsätzen der Nachbarzellen reißverschlussartig interdigitieren und so die glomerulären Kapillarschlingen von außen bedecken (siehe Abb. 2) (Welsh and Saleem 2012). Die Zelloberfläche des Podozyten ragt somit in die Bowman Kapsel hinein, während die Zellbasis auf der Außenseite der Kapillarschleife liegt (Jefferson, Alpers et al. 2011). Die Basen von Endothelzellen und Podozyten liegen also gegeneinander und bilden gemeinsam die spezielle glomeruläre Basalmembran (GBM) (Mundel and Reiser 2010).

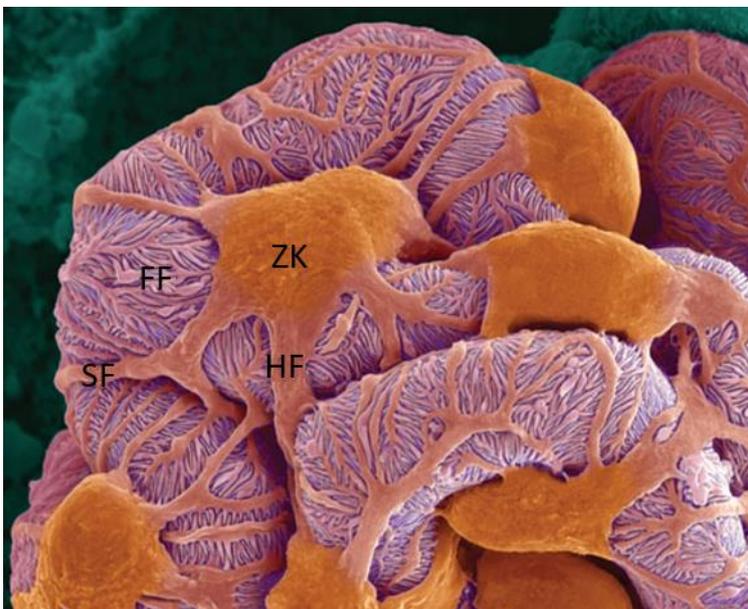


Abb. 2: Scannendes Elektronenmikrogramm von Podozyten im Glomerulum mit Zellkörper (ZK), Hauptfortsätzen (HF), Sekundärfortsätzen (SF) und feinen, interdigitierenden Fußfortsätzen (FF).

Modifiziert übernommen von © Dennis Kunkel Microscopy (Welsh and Saleem 2012)

Die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) ist dreischichtig und besteht aus dem fenestriertem Endothel der Kapillarschlingen, der speziellen GBM und den Podozyten bzw. ihren Filtrationsschlitzten (Welsh and Saleem 2012). Die circa 40 nm breiten Filtrationsschlitzte liegen zwischen benachbarten podozytären Fußfortsätzen und werden von einer Schlitzmembran ausgefüllt, die hoch durchlässig für Wasser und kleine gelöste Partikel ist (Jefferson, Alpers et al. 2011). Die geringe Größe der Poren in

der Schlitzmembran (5-15 nm) limitiert die Passage von größeren Proteinen, einschließlich Albumin (Jefferson, Alpers et al. 2011), sodass bei normaler Nierenfunktion mindestens 99,9% von Albumin und großen Proteinen zurückgehalten werden (Zandi-Nejad, Eddy et al. 2004). Alle Schichten der GFB enthalten negativ geladene Moleküle (Pavenstadt, Kriz et al. 2003).

Die Schlitzmembran (siehe Abb. 3) innerhalb der Filtrationsschlitz ist ein Multiproteinkomplex, ähnlich zu *adherence junctions* (Faul, Asanuma et al. 2007); sie enthält Nephrin und andere Strukturproteine, die eng an das Aktinzytoskelett geknüpft sind (Jefferson, Alpers et al. 2011). Signalwege von den Molekülen der Schlitzmembran regulieren die Dynamik des Aktins und erlauben den Podozyten, speziell den Podozytenfußfortsätzen, ihre Form zu ändern (Jefferson, Alpers et al. 2011).

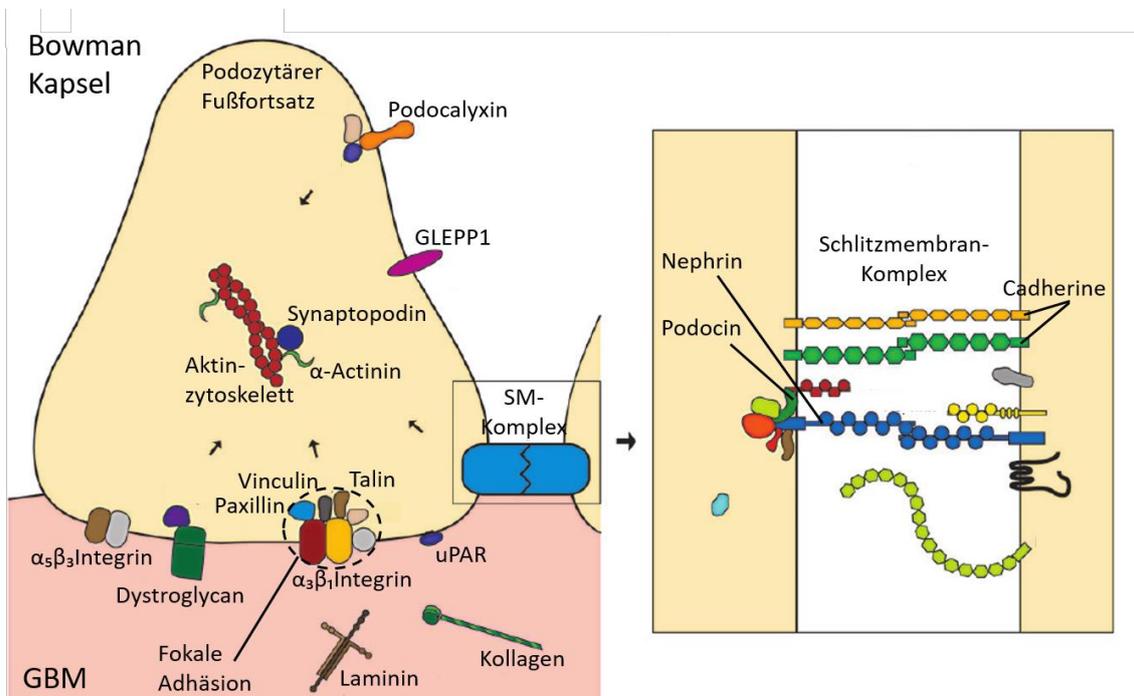


Abb. 3: Wichtige Proteine der glomerulären Filtrationsbarriere: Proteine des podozytären Fußfortsatzes, der Glomerulären Basalmembran (GBM) und des Schlitzmembran-Komplexes wie Nephrin und Podocin. Fokale Adhäsionen befinden sich an der Sohle des Fußfortsatzes. GLEPP1=Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1, uPAR=urokinase-type plasminogen activator receptor, SM=Schlitzmembran. Modifiziert übernommen von (Patrakka and Tryggvason 2010, Finne, Vethe et al. 2014).

Die Fußfortsätze haben ein kortikales Netzwerk aus kurzen, verzweigten Aktinfilamenten und axial liegende hoch geordnete, parallele, kontraktile Aktinbündel

(d=7-9 nm), die die Permeabilität der GFB durch Veränderungen in der Fußfortsatzmorphologie modulieren können (Drenckhahn and Franke 1988, Faul, Asanuma et al. 2007). Die zentraleren Sekundär- und Hauptfortsätze und der Zellkörper enthalten dagegen Vimentin-reiche Intermediärfilamente (d=10 nm), größere Mikrotubuli (d=24 nm) und kaum F-Aktin (Cortes, Mendez et al. 2000, Pavenstadt, Kriz et al. 2003, Welsh and Saleem 2012).

Zur normalen Funktion des glomerulären Filters ist die Erhaltung der podozytären Fußfortsatzstruktur erforderlich (Wharram, Goyal et al. 2000). Das Aktin basierte Zytoskelett der Fußfortsätze ist basal durch fokale Adhäsionen (siehe Abb. 3) mit der glomerulären Basalmembran verbunden (Faul, Asanuma et al. 2007). Bei Umordnung des Aktinzytoskeletts kann es zu aktiver Retraktion der Fußfortsätze in den Zellkörper kommen, dem sogenannten *foot process effacement* (Jefferson, Alpers et al. 2011). Podozyten scheinen bei glomerulären Erkrankungen stereotyp mit *foot process effacement* zu reagieren (Kerjaschki 2001). Dabei durchleben sie in Revers ihre embryonale Entwicklung (Kerjaschki 2001).

Bei retrahierten Fußfortsätzen geht die grazile, interdigitierende Struktur verloren, die Podozytenfortsätze verplumpen und grenzen breitflächig aneinander (Faul, Asanuma et al. 2007). Statt der parallelen, kontraktile Aktinbündel im gesunden Fußfortsatz befindet sich im retrahierten Fußfortsatz im Bereich der Sohle eine sehr dichte Matte aus sich überkreuzenden *stress fibres* (siehe Abb. 4) (Pavenstadt, Kriz et al. 2003)

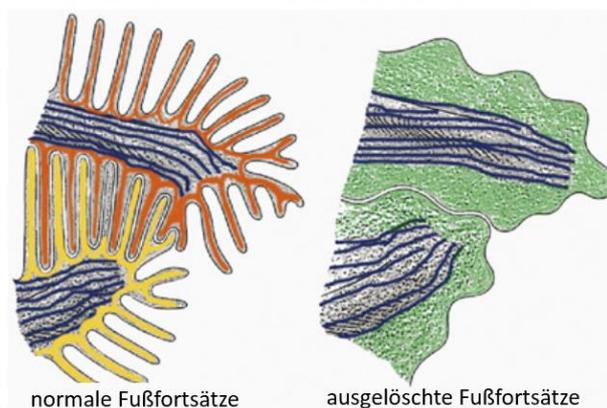


Abb. 4: Top Ansicht von normalen und retrahierten podozytären Fußfortsätzen. In gesunden Podozyten interdigitieren die Fußfortsätze normalerweise. Die hoch organisierten Aktinbündel von interdigitierenden Fußfortsätzen von zwei benachbarten Podozyten sind in Rot bzw. Gelb gezeigt. Die

Mikrotubuli der Hauptfortsätze sind in Dunkelblau dargestellt. Im Gegensatz dazu steht die nur leicht gewundene Zellgrenze bei retrahierten Fußfortsätzen, die flächig ausgebreitet und mit reorganisierten, kurzen, verzweigten Aktinfilamenten (in Grün) gefüllt sind. (Faul, Asanuma et al. 2007)

Die Funktionen des Podozyten sind die strukturelle Unterstützung der glomerulären Kapillarschleife, die Hauptkomponente, Synthese und Reparatur der GBM, der *Crosstalk* mit anderen glomerulären Zellen (Ausschüttung von Wachstumsfaktoren) und eine immunologische Funktion (Jefferson, Alpers et al. 2011).

In der humanen Erwachsenenenniere gibt es 500-600 Podozyten pro glomerulärer Kapillarschlinge, ihr Turnover ist sehr langsam (Jefferson, Alpers et al. 2011). Wenn Podozyten durch Apoptose oder Ablösung verloren gehen, können sie kaum ersetzt werden, um die ‚baren‘ Bereiche der glomerulären Basalmembran wieder abzudecken, da die verbleibenden Zellen nur sehr langsam proliferieren (Jefferson, Alpers et al. 2011). Durch den Mangel an Abdeckung der Kapillarschlingen kann es zur Ballonierung der Kapillaren, zur synechialen Anhaftung an die Bowman Kapsel, interstitiell abgelagertem Filtrat mit Kapillareinsprossung und Nephrondegeneration, kurz zur Entwicklung einer Fokal Segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) kommen (Kriz 2002, Jefferson, Alpers et al. 2011).

Podozyten formen die letzte Barriere gegen einen Proteinverlust, was erklärt, warum Podozytenschaden typischerweise mit ausgeprägter Proteinurie verbunden ist (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007).

1.4 GLEPP1

Bei Untersuchungen zum idiopathischen nephrotischen Syndrom bei Kindern konnten kürzlich Mutationen im GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1*) kodierenden PTPRO Gen als mögliche Ursache der Erkrankung identifiziert werden (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

GLEPP1 ist eine membranständige Protein Tyrosinphosphatase des podozytären Fußfortsatzes (Thomas, Wharram et al. 1994). Sie besteht aus einer großen extrazellulären Domäne aus acht *fibronectin-type-III-like repeats* (Fibronectindomänen),

einem hydrophoben transmembranären Segment und einer einzelnen, intrazellulären Protein Tyrosinphosphatase Domäne (siehe Abb. 5) (Thomas, Wharram et al. 1994).

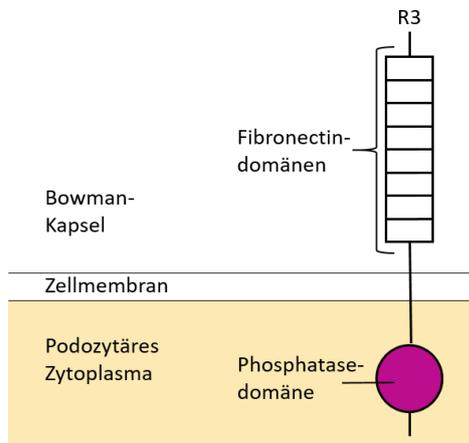


Abb. 5: Schematische Struktur von GLEPP1 als transmembranäre Rezeptor Tyrosinphosphatase in der Podozytenmembran. Modifiziert übernommen aus (Tonks 2006)

Bei GLEPP1 handelt sich um ein Protein, das relativ spezifisch für den Podozyten ist (Thomas, Wharram et al. 1994). Vom PTPRO (Protein-Rezeptor-Tyrosinphosphatase-O) Gen werden mehrere Isoformen kodiert (Pixley, Lee et al. 2001). Die zwei größten Isoformen haben beide eine extrazelluläre Domäne mit acht Fibronectindomänen; die größere dieser zwei Isoformen wird in Neuronen, die kleinere, GLEPP1, im Podozyten exprimiert (Thomas, Wharram et al. 1994, Pixley, Lee et al. 2001). Kürzere Isoformen von GLEPP1 ohne die acht extrazellulären Fibronectindomänen, auch Protein Tyrosinphosphatase phi (ϕ) genannt, gibt es auch in hämatopoetischen Zellen, inklusive Osteoklasten (Gobert, van den Eijnden et al. 2009).

Bekannte Funktionen von GLEPP1 außerhalb der Niere sind *axonal guidance* (Stepanek, Stoker et al. 2005), die Tumorsuppression (Motiwala, Kutay et al. 2004), die Aktivierung von Osteoklasten und die Förderung von Chemotaxis (Gobert, van den Eijnden et al. 2009).

Die GLEPP1 Expression ist reduziert in proteinurischen Nierenerkrankungen: Bei Untersuchungen von Sharif et al. zur GLEPP1 Expression im Podozyten zeigte sich, dass GLEPP1 bei der *Minimal Change Disease* (MCD) aberrant verteilt ist. In FSGS Glomeruli beim Finnischen Typ des Kongenitalen Nephrotischen Syndroms fehlt GLEPP1 regelmäßig vollständig im Podozyten, sogar wenn keine Sklerose in diesem

Glomerulum zu detektieren ist. Podozyten scheinen im Fall der FSGS die GLEPP1 Expression zu verlieren; diesem Verlust folgt die Vernarbung des Gewebes. Diese Beobachtung geht einher mit dem Konzept der Dedifferenzierung des podozytären Phänotyps bei der MCD und der FSGS. Sharif et al. spekulieren, dass ein veränderter Podozytenphänotyp, der GLEPP1 nicht mehr exprimiert, Gemeinsamkeiten mit dem frühen, undifferenzierten Podozytenphänotyp hat. (Sharif, Goyal et al. 1998)

Auch in Glomeruli von Immunoglobulin A (IgA) Nephritis Patienten, insbesondere bei Patienten mit nephrotischer Proteinurie und schweren pathologischen Manifestationen ist die GLEPP1 Expression reduziert (Tian, Wang et al. 2007).

Die molekulare Funktion von GLEPP1 im Podozyten ist bisher nicht bekannt (Charba, Wiggins et al. 2009). Tatsächlich zeigten Podozyten von GLEPP^{-/-} Mäusen eine veränderte Fußfortsatzarchitektur (Wharram, Goyal et al. 2000). Die Zellmembran der GLEPP^{-/-} Podozyten verlief eher amöboid anstatt mit den sonst typischen zahlreichen Ausläufern, die Fußfortsätze waren kürzer und breiter als normal (Wharram, Goyal et al. 2000).

Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (Doktorarbeiten von Laura Lennartz, Christian Weigel und Philip Schüppler) konnten nachweisen, dass GLEPP1^{-/-} Mäuse im Alter von 6 Monaten eine Proteinurie entwickeln. Histomorphologisch konnten wir die Retraktion der Fußfortsätze bestätigen und stellten dazu eine lokalisierte Verdickung der glomerulären Basalmembran fest. Diese histologischen Auffälligkeiten führten zu der Frage nach der Rolle von GLEPP1 für die podozytäre Adhäsion auf der glomerulären Basalmembran und für die Zellmigration.

1.5 Fokale Adhäsionen

1.5.1 Aufbau

Zellmigration und Zelladhäsion hängen eng zusammen (Parsons, Horwitz et al. 2010). Fokale Adhäsionen sind Regionen, in denen die Zelle über Integrine an das unterliegende Substratum adhärert (Burrige, Turner et al. 1992). In Bezug auf

Podozyten sind sie dort lokalisiert, wo das Aktin-basierte Zytoskelett der Fußfortsätze mit der glomerulären Basalmembran verbunden ist (siehe Abb. 3) (Faul, Asanuma et al. 2007).

Integrine sind Transmembranproteine, die nach extrazellulär an die Extrazellulärmatrix (z. B. Fibronectin, Kollagen (Parsons, Horwitz et al. 2010)) inserieren und nach intrazellulär mit einer Plaque aus zytoskelettalen Gerüstproteinen und Signalproteinen verbunden sind. Die Gerüstproteine wiederum haben Anschluss an Aktinfilamente (Calalb, Polte et al. 1995). Integrine haben somit eine strukturelle, überbrückende Funktion: sie dienen als Rezeptoren für Proteine der Extrazellulärmatrix und als Anker für zytoskelettale Proteine (Burrige, Fath et al. 1988, Schaller and Parsons 1995). Integrine haben keine innewohnende enzymatische Aktivität (Brown and Turner 2004). Das Hauptintegrin an der Podozytensohle ist $\alpha_3\beta_1$ (Faul, Asanuma et al. 2007), es ist essentiell für die Maturation von Podozyten (Kreidberg, Donovan et al. 1996). Auf der zytoplasmatischen Seite assoziiert es mit Paxillin, Talin und Vinculin (Drenckhahn and Franke 1988, Kerjaschki 2001), die Membran an der Sohle des Fußfortsatzes ist also darüber mit dem Aktinnetzwerk verbunden (siehe Abb. 3) (Kerjaschki 2001).

1.5.2 Signaltransduktion an fokalen Adhäsionen

Dass Proteine fokaler Adhäsionen wichtig sind zur lokalisierten Rezeption, Übertragung und Amplifikation extrazellulärer Stimuli ist bekannt (Brown and Turner 2004).

Die Integrine rekrutieren indirekt Gerüst- und Signalproteine wie die Proteintyrosinkinase *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und das Paxillin, sie binden jeweils wiederum an zusätzliche Proteine, die wiederum Signalkaskaden an Rho GTPasen vermitteln (Parsons 2003, Brown and Turner 2004, Parsons, Horwitz et al. 2010). FAK und Paxillin sind Beispiele von Proteinen fokaler Adhäsionen, die als ‚switchable‘ Gerüstproteine dienen, indem Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste zur Rekrutierung von funktionellen Regulatoren der Rho GTPasen und anderer Signalproteine führt (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Von den Integrinen ausgehende Signalkaskaden regulieren die Aktivierung der kleinen Rho GTPasen Rac, Rho und Cdc42, indem entweder die *guanine nucleotide exchange*

factors (GEFs) oder die *GTPase activating proteins* (GAPs) rekrutiert werden (Parsons, Horwitz et al. 2010). Die GEFs aktivieren die Rho GTPasen, indem sie den Austausch von gebundenem Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) katalysieren, während die GAPs die Rho GTPasen durch Hydrolyse eines Phosphatrestes deaktivieren (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Die Rho GTPasen sind vorrangig für ihre Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts bekannt (Etienne-Manneville and Hall 2002). Die kleinen Rho GTPasen (Rac, Cdc42 und RhoA) dirigieren die Versammlung von lokalem Aktin in *stress fibres*, Lamellipodien und Filopodien (Mitra, Hanson et al. 2005) und haben so unmittelbaren Einfluss auf die Zellmigration.

1.5.3 FAK

Die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist eine zytoplasmatische Proteintyrosinkinase, die involviert ist in der Zytoskelettremodellierung, Formation und Auflösung fokaler Adhäsionen und in der Regulation von Rho GTPasen (Tomar and Schlaepfer 2009). FAK ist weit akzeptiert als wichtiger Promoter der directionalen Zellmigration (Tomar and Schlaepfer 2009).

Die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist eine prototypische Integrin-assoziierte Nonrezeptor-Tyrosinkinase, sie bindet an die zytoplasmatische Domäne von β -Integrinen (Pavenstadt, Kriz et al. 2003) und ist zur Transduktion von Integrinsignalen an die GEFs und GAPs wichtig (Geiger, Spatz et al. 2009).

FAK ist in den meisten Geweben exprimiert und ihre Sequenz ist unter verschiedenen Spezies hoch konserviert (Schaller 2010).

Die FAK enthält eine zentrale katalytische Domäne, flankiert von großen, N- und C-terminalen non-katalytischen Domänen (siehe Abb. 6) (Parsons 2003).

Die N-terminale Domäne zeigt eine ähnliche Sequenz wie die Proteinfamilie mit FERM (4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) Domäne (Girault, Labesse et al. 1999). Normalerweise verbinden diese FERM Proteine Transmembranproteine mit dem Aktinzytoskelett (Parsons 2003), auch das Protein 4.1O gehört zu dieser Proteinfamilie. Die FERM-Domäne von FAK scheint jedoch nicht im Membran-*Targeting* involviert zu sein,

sondern könnte stattdessen eine Rolle in der Regulation der Autophosphorylierung und somit der biologischen Aktivität des Proteins spielen (Girault, Labesse et al. 1999). Die C-terminale Domäne von FAK ist reich an Protein-Protein-Interaktionsstellen (Parsons 2003). Sie enthält zwei Prolin-reiche Regionen, die als Bindestelle für SH3-Domänen-haltige Proteine wie p130CAS (*Crk-associated substrate*) dienen (Mitra, Hanson et al. 2005). Die ebenfalls C-terminale *focal adhesion targeting* FAT-Domäne dirigiert FAK zu neu gebildeten und bereits existierenden fokalen Adhäsionen (Martin, Boerner et al. 2002) und dient auch als Bindestelle für Paxillin und Talin (Schlaepfer, Mitra et al. 2004). Eine Bindung an Paxillin ist jedoch nicht erforderlich für die Lokalisation von FAK an fokale Adhäsionen (Martin, Boerner et al. 2002).

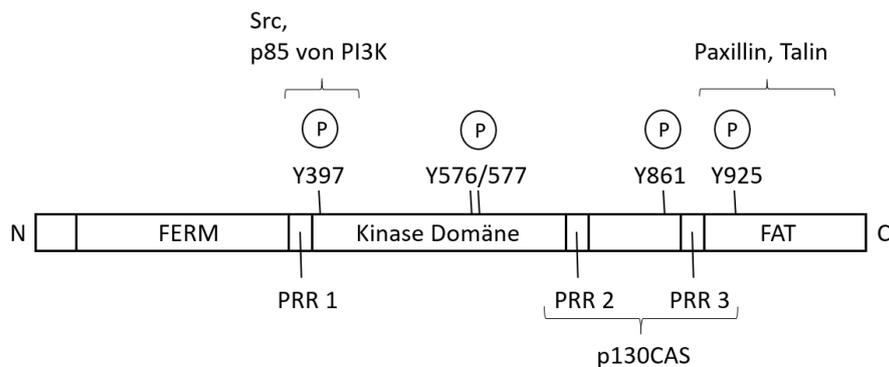


Abb. 6: Struktur und Bindestellen von *Focal Adhesion Kinase*. FERM=Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin; FAT= *focal adhesion targeting*; PI3K= Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase; PRR=Prolin-reiche Region; Y=Tyrosin. Modifiziert übernommen von (Mitra, Hanson et al. 2005).

Gefolgt von der Zelladhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix wird FAK an multiplen Stellen phosphoryliert, inklusive den Tyrosinen 397, 576 und 577 (Owen, Ruest et al. 1999).

Das Tyrosin 397 ist eine Autophosphorylierungsstelle, die Interaktion mit den *Src-family* Kinasen c-Src oder Fyn fördert (Owen, Ruest et al. 1999).

Die Tyrosine 576 und 577 liegen in der mutmaßlichen Aktivierungsschleife der Kinase-Domäne; die katalytische Aktivität von FAK wird durch Phosphorylierung an diesen Stellen durch assoziierte Src-Kinasen gesteigert (Owen, Ruest et al. 1999).

Die Tyrosinphosphorylierung von FAK korreliert direkt mit der Kinasenaktivität (Calalb, Polte et al. 1995).

Clustering von Integrinen an der Zelloberfläche durch Bindung an Extrazellulärmatrix führt u. a. zur Autophosphorylierung von FAK an Tyrosin 397 (Richardson, Malik et al. 1997). Die Tyrosin 397 umgebenden Endungen an FAK bilden eine Sequenz, die effektiv an die SH2(*Src homology 2*)-Domäne der Src-Kinase bindet (Richardson, Malik et al. 1997). Src wiederum tyrosinphosphoryliert dann effektiv andere FAK-Stellen wie Tyrosin 576/577 (Owen, Ruest et al. 1999), sowie die FAK-bindenden Proteinen Paxillin und p130CAS (Schaller, Hildebrand et al. 1999, Parsons 2003). Paxillin und p130CAS können andere Moleküle zu den fokalen Adhäsionen rekrutieren und regulieren so die Organisation des Aktinzytoskeletts (Webb, Donais et al. 2004).

Es gibt Hinweise, dass FAK eine Schlüsselkomponente in der Förderung des Turnover fokaler Adhäsionen und somit der Migration ist (Tomar and Schlaepfer 2009). In FAK -/- Zellen ist die Auflösung von Adhäsionen signifikant gestört (Webb, Donais et al. 2004).

Sowohl FAK, als auch Src werden für einen effizienten *adhesion turnover* an der Zellfront und Adhäsionsauflösung am Zellende gebraucht (Webb, Donais et al. 2004).

Ma et. al entdeckten im murinen Mausmodell, dass glomeruläre Schädigung zu Aktivierung von podozytärem FAK führte, gefolgt von der Retraktion der Podozytenfußfortsätze und Proteinurie (Ma, Togawa et al. 2010).

1.5.4 Paxillin

Paxillin ist ein an fokale Adhäsionen assoziiertes zytoskelettales Adapterprotein, das koordiniert tyrosinphosphoryliert wird, bestimmte Kombinationen von Signalproteinen in fokale Adhäsionen rekrutiert und so *downstream signaling* koordiniert (Schaller 2001). Es besitzt keine eigene Enzymaktivität (Schaller 2001).

Paxillin kann direkt an den zytoplasmatischen Teil von β_1 -Integrinen binden (Tanaka, Yamaguchi et al. 1996) und interagiert mit Src, Vinculin und FAK (Brown, Perrotta et al. 1996). Dies suggeriert die Funktion von Paxillin als molekularen Adapter, der für die Rekrutierung von Signal- und Strukturproteinen in fokale Adhäsionen verantwortlich ist (Brown, Perrotta et al. 1996).

Paxillin spielt zudem eine kritische Rolle in der embryonalen Entwicklung, da Paxillin *-/-* Mäuseembryonen am neunten Tag sterben (S Thomas an Schaller (2003) persönlich kommuniziert).

Die N-terminale Domäne von Paxillin (siehe Abb. 7) enthält unter anderem fünf Peptidsequenzen, die mit Leucin (L) beginnen und mit Aspartat (D) enden, kurz LD-Motive (Brown, Perrotta et al. 1996). FAK kann an LD2 und LD4 binden (Schaller 2001). Paxillin LD4 bindet zudem einen Komplex aus PAK (*p21-activated kinase*), PIX (*PAK interacting exchange factor*) und PKL (*paxillin-kinase-linker*) (Brown, West et al. 2002). Außerdem befinden sich N-terminal vier Stellen der Tyrosinphosphorylierung (31, 40, 88, 118) und eine Prolin-reiche Region (PRR) (Schaller 2001). Paxillin ist in den verschiedenen Formen von Adhäsionen differentiell an Tyrosin 31 und 118 phosphoryliert (Zaidel-Bar, Milo et al. 2007).

Die C-terminale Domäne umfasst vier LIM (Lin-11, Isl-1, Mec-3) Domänen, die Zinkfinger Domänen ähneln und von denen LIM3 hauptsächlich für die Steuerung von Paxillin an fokale Adhäsionen verantwortlich ist (Brown, Perrotta et al. 1996).

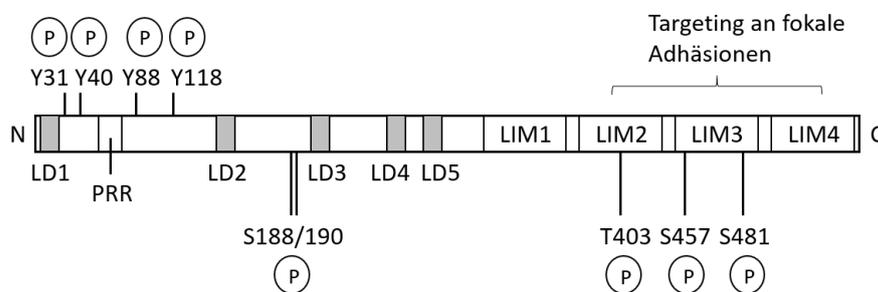


Abb. 7: Struktur und Bindestellen von Paxillin. Modifiziert übernommen von (Schaller 2001).

Die Induktion von Paxillin Tyrosinphosphorylierung wird mit Adhäsions-orientierter Integrinligation via FAK und Src Kinasen assoziiert (Brown and Turner 2004). Speziell die Tyrosine 31 und 118 von Paxillin werden durch Adhäsion (und Wachstumsfaktoren) stimuliert, durch FAK/Src phosphoryliert (Schaller and Parsons 1995) und dienen so als Bindestellen für SH2-Domänen anderer Proteine wie Src, Csk (*COOH-terminal Src kinase*) und Crk (*CT10 (chicken tumor virus number 10) regulator of kinase*) (Schaller 2001). Das Adapterprotein Crk assoziiert mit seiner SH3-Domäne wiederum an andere

Signalmoleküle, wie den GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) C3G (Knudsen, Feller et al. 1994) oder DOCK180 (*180kDa Protein downstream of Crk*) (Feller, Posern et al. 1998). Crk-DOCK180 kann lokal Rac aktivieren, um die Bildung von Membranprotrusionen (Lamellipodien) und Zellmigration zu fördern (siehe 1.5.5) (Brown and Turner 2004).

Dazu fördert Phosphorylierung von Paxillin an Tyrosin 31 und 118 die Interaktion mit FAK und damit den Turnover von Adhäsionen (Zaidel-Bar, Milo et al. 2007).

Zusammenfassend ist tyrosinphosphoryliertes Paxillin die Basis für die Rekrutierung von positiven Regulatoren von Rac und CDC42, außerdem ist es über die FAK-Rekrutierung für den Turnover von fokalen Adhäsionen mitverantwortlich (Zaidel-Bar, Milo et al. 2007), (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Für die Tyrosindepshosphorylierung von Paxillin ist eine Isoform von GLEPP1 (PTP ϕ) Kandidatentyrosinphosphatase (Schaller 2001): in BAC1.2F5 Makrophagen reduzierte die Expression von PTP ϕ die Tyrosinphosphorylierung von Paxillin, während Expression einer katalytisch inaktiven Mutante von PTP ϕ Tyrosinphosphorylierung von Paxillin förderte (Pixley, Lee et al. 2001). An seinen Tyrosin-Enden dephosphoryliertes Paxillin aktiviert PAK (*p21 activated kinase*), was zu Adhäsion/Migration führt (Larsen, Tremblay et al. 2003).

Sowohl Signale von phosphoryliertem Paxillin als auch Signale von dephosphoryliertem Paxillin können Migration stimulieren.

Paxillin $-/-$ Fibroblasten zeigen Defekte im kortikalen Zytoskelett, *cell spreading* und der Zellmigration (Hagel, George et al. 2002).

Im nephrotischen Rattenmodell war die glomeruläre Expression von Paxillin erhöht, zeitgleich mit einer schweren Proteinurie (Koukouritaki, Tamizuddin et al. 1998).

1.5.5 Die Rolle von fokalen Adhäsionen in Zellmigration

Für die meisten Zellen beginnt die Zellbewegung mit der Protrusion der Zellmembran, gefolgt von der Formation neuer Adhäsionen an der Zellfront, die das Aktinzytoskelett

mit dem Substratum verbinden, der Generation von Zugkräften, die die Zelle vorwärts bewegen und der Auflösung der Adhäsionen am Zellende (Parsons, Horwitz et al. 2010). Die Bildung von fokalen Adhäsionen und die begleitende Rekrutierung von zytoskelettalen Proteinen und Aktinfilamenten spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration (Lauffenburger and Horwitz 1996).

Zu den Protrusionen am *leading edge* einer migrierenden Zelle gehören von peripher nach zentral Filopodien, Lamellipodien und eine Lamella:

Filopodien sind lange, dünne Protrusionen der Lamellipodien, sie basieren auf F-Aktinbündeln und werden häufig durch Cdc42 induziert (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Lamellipodien sind breite, flache Protrusionen der Lamella, sie enthalten ein dynamisches, verzweigtes Aktinnetzwerk, das durch eine *actin related protein 2/3* (Arp2/3)-Komplex vermittelte Aktinpolymerisation generiert wird (Small, Stradal et al. 2002, Geiger, Spatz et al. 2009). Die Aktivität des Arp2/3-Komplexes wird durch die Rho GTPasen Rac und Cdc42 (Parsons, Horwitz et al. 2010) über Signalwege mit WASp (*Wiskott–Aldrich Syndrome protein*)/Scar Proteinen reguliert (Pollard and Borisy 2003).

Eine Lamella ist eine flache, fächerartige Extension im Bereich der Zellperipherie zwischen den Lamellipodien und dem Zellinnerem. Sie basiert im Gegensatz zu den Lamellipodien auf dicken, parallel in Migrationsrichtung liegenden Aktinbündeln (*stress fibres*) mit Myosin II (Geiger, Spatz et al. 2009, Parsons, Horwitz et al. 2010). Diese *stress fibres* erstrecken sich von zentral in der Zelle bis nach peripher an den Übergang von der Lamella in das Lamellipodium, wo sie über fokale Adhäsionen an das Substratum inserieren (siehe Abb. 8) (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Die früheste Integrin enthaltende Adhäsionsstruktur nennt sich *nascent adhesion*, sie umfasst einige hundert Proteine, ist punktförmig und wird an der Unterseite des Lamellipodiums gebildet (Alexandrova, Arnold et al. 2008, Geiger, Spatz et al. 2009). Zur Entstehung von *nascent adhesions* gibt es zwei Modelle, die sich jedoch nicht ausschließen: (1) Sie werden durch Bindung von Integrinen an ECM-Proteine und Liganden vermitteltes *clustering* initiiert; (2) sie werden durch Aktinpolymerisation initiiert und verzweigtes Aktin dient ihnen als Ausgangspunkt (Parsons, Horwitz et al.

2010). Die *nascent adhesions* verschwinden entweder innerhalb von ca. 60 Sekunden wieder oder vergrößern sich zu sich zu fokalen Komplexen (ca. 1 μm Durchmesser) am Übergang des Lamellipodiums in die Lamella; fokale Komplexe reifen wiederum zu noch größeren fokalen Adhäsionen (2 μm breit und 3-10 μm lang) unterhalb der Lamella (siehe Abb. 8) (Geiger, Spatz et al. 2009, Parsons, Horwitz et al. 2010).

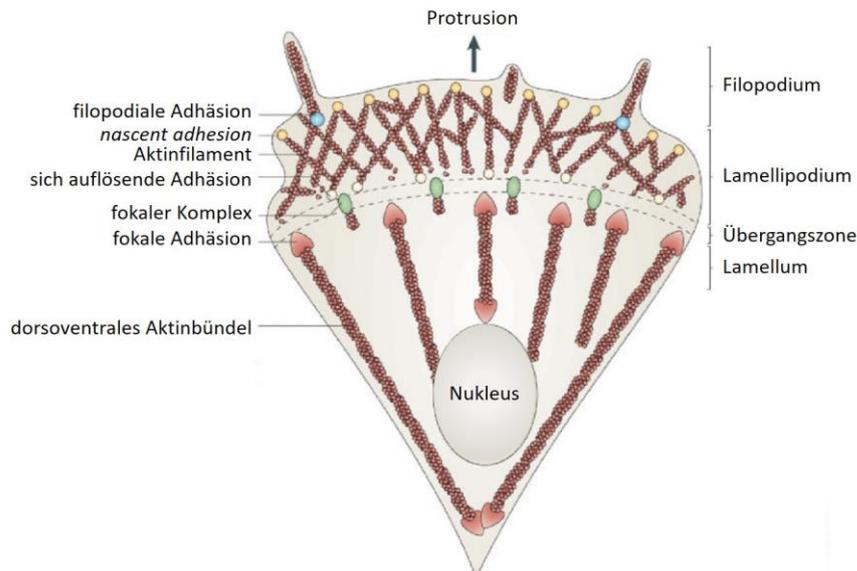


Abb. 8: Protrusionen und Adhäsionen einer migrierenden Zelle. Modifiziert übernommen von (Parsons, Horwitz et al. 2010)

In migrierenden (*motile*) oder sich ausbreitenden (*spreading*) Zellen bewegt sich der Zellpol mit dem Lamellipodium kontinuierlich vorwärts, während die fokalen Adhäsionen immobil bleiben, jedoch an Länge und Dicke durch Inkorporation ergänzender Integrinmoleküle und zytoplasmatischer Plaqueproteine weiter zunehmen (Geiger, Spatz et al. 2009). Reife fokale Adhäsionen sind elongiert und an den Enden von *stress fibres* lokalisiert (Geiger, Spatz et al. 2009). Sie funktionieren als Zugpunkte gegen die Kraft des Rückwärtsstroms an Aktinfilamenten, und übertragen die mechanische Energie an den Untergrund, was die Protrusion steigert (Parsons, Horwitz et al. 2010).

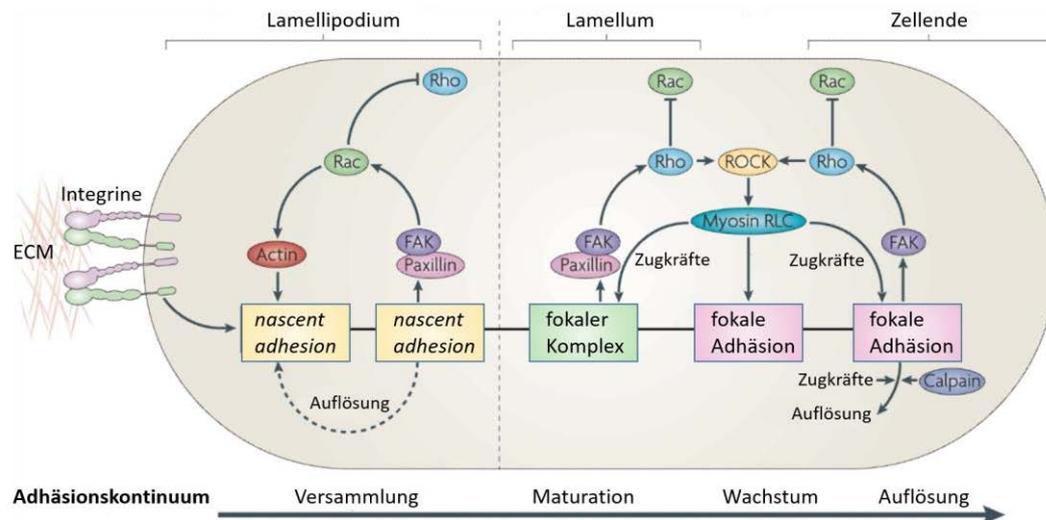


Abb. 9: Maturation von Adhäsionen und Aktivierung der Rho GTPasen. ECM=Extrazellulärmatrix; FAK=Focal Adhesion Kinase; ROCK=Rho-associated protein kinase. Modifiziert und übernommen von (Parsons, Horwitz et al. 2010).

FAK ist sowohl im führenden Zellteil, als auch im Zellende an der Regulation der Zellmigration beteiligt (siehe Abb. 9):

Im führenden Zellteil maturieren die *nascent adhesions* unter hoher Kontraktilität und setzen sich unter dem Verlust der Kontraktilität um (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge 1996, Gupton and Waterman-Storer 2006). In einer schnell wachsenden Membranprotrusion inhibiert FAK Aktivität Rho über p190RhoGAP Tyrosinphosphorylierung; eine verminderte RhoA GTPasen Aktivität ist assoziiert mit reduzierter Aktinkontraktilität in der *leading edge* Lamella und ermöglicht so eine directionale Zellbewegung. Gleichzeitig stimuliert FAK eine Rac Aktivierung durch Phosphorylierung von Adaptorproteinen wie p130CAS oder PIX (*p21-activated kinase* (PAK) *interacting exchange factor*) (Chang, Lemmon et al. 2007, Tomar and Schlaepfer 2009). Somit vermittelt FAK im *leading edge* eine verminderte Rho und eine gesteigerte Rac Aktivität, wodurch die Maturation von fokalen Adhäsionen verhindert und indirekt der Turnover von *nascent adhesions* erleichtert wird (Tomar and Schlaepfer 2009).

Im Zellende ist eine hohe Rho Aktivität und eine gesteigerte Aktomyosin-Kontraktilität ein wichtiger Auslöser für die Auflösung von fokalen Adhäsionen (Gupton and Waterman-Storer 2006). In diesem Zusammenhang kann eine FAK Assoziation mit

verschiedenen Rho GEFs zu einer erhöhten RhoA und ROCK (*Rho-associated protein kinase*) Aktivierung, einer gesteigerten Kontraktion zur Retraktion des Zellendes und einer Auflösung von fokalen Adhäsionen führen.

In Fibroblasten rekrutiert PY397-FAK dephosphoryliertes und aktiviertes Src in fokale Adhäsionen, welches wiederum p130CAS (*Crk-associated substrate*) rekrutiert. An Y31 und/oder Y118 phosphoryliertes Paxillin rekrutiert das Adapterprotein Crk zu p130CAS. Zum Crk-p130CAS Komplex kommt DOCK180 (*180kDa Protein downstream of Crk*) zusammen mit ELMO (*engulfment and cell motility*). Der Crk-p130CAS-DOCK180-ELMO Komplex stimuliert Rac-GTP *loading* und eine Aktinpolymerisation in den Lamellipodien. Paxillin wird durch GLEPP1 dephosphoryliert und aktiviert so die migrationsfördernde PAK (*p21-activated kinase*). (Larsen, Tremblay et al. 2003).

1.6 Protein 4.10

Bei einer genomweiten Analyse 2009 von Pezzolesi et al. wurde das für Protein 4.10 kodierende FRMD3 Gen (FERM (Protein 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) Domäne enthaltendes Gen 3) als Kandidatengen für diabetische Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 identifiziert (Pezzolesi, Poznik et al. 2009). Für Typ-1-Diabetiker ist das Risiko einer diabetischen Nephropathie mit Proteinurie um 1,45 erhöht bei Trägerschaft eines *Single Nucleotide Polymorphismus* im Protein 4.10 kodierenden Gen (Pezzolesi, Poznik et al. 2009).

Protein 4.1 wurde erstmalig in Erythrozyten charakterisiert, wo es eine Schlüsselrolle in der Regulation der mechanischen Stabilisierung der Zelle spielt (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Es ist der Prototyp für eine wachsende Gruppe von verwandten Proteinen auch in anderen Zelltypen, der Protein 4.1 Familie (Hoover and Bryant 2000). Gemeinsame Funktion ist die Bindung des Aktinzytoskeletts an Transmembranproteine (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Die 4.1 Proteine sind charakterisiert durch drei konservierte strukturelle und funktionelle Domänen: eine N-terminale, 30-kDa membran-bindende FERM-Domäne (Chishti, Kim et al. 1998), eine interne, 10-kDa

Spektrin-Aktin-bindende Domäne (Schischmanoff, Winardi et al. 1995) und eine C-terminale 22-24-kDa Domäne (Ni, Ji et al. 2003).

Das ursprünglich im Erythrozyten entdeckte 4.1 Protein wurde dann in 4.1R umbenannt (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003), 4.1R ist essentiell zur Aufrechterhaltung der erythrozytären Form und mechanischen Membraneigenschaften, insbesondere der Deformabilität und Stabilität des Erythrozyten (Takakuwa 2000). Es interagiert lateral mit Spektrin und Aktin im zytoskelettalen Netzwerk und interagiert vertikal mit den zytoplasmatischen Domänen der Transmembranproteine Glykophorin C und Bande 3 (Takakuwa 2000).

Protein 4.1O wurde zunächst im Ovar entdeckt (Ni, Ji et al. 2003). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten erstmals, dass 4.1O (sowie 4.1G, 4.1B und 4.1N) im humanen Podozyten exprimiert wird und mit Proteinen der glomerulären Schlitzmembran interagiert.

Im Zusammenhang mit Protein 4.1O im Podozyten entdeckten Kramer-Zucker et al. 2005 im Pronephros von Zebrafischen, dass neben Nephrin und Podocin zur regulären Ausbildung von Schlitzmembranen die Expression des FERM-Domänen Proteins *mosaic eyes* in Podozyten nötig ist (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). *Mosaic eyes* ist ein 4.1 orthologes Protein im Zebrafisch (Buffon, Sortica et al. 2015), das u. a. für die Formation von *tight junctions* im retinalen Pigmentepithel erforderlich ist (Jensen and Westerfield 2004). Im Pronephros führt die Abwesenheit von *mosaic eyes* wie auch die Abwesenheit von Nephrin und Podocin zu Verlust der glomerulären Filtrationsdiskrimination und aberranter Passage von hochmolekulargewichtigem Substanzen in das glomeruläre Filtrat (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005).

Die *mosaic eyes* *-/-* Zebrafischembryos zeigten 80 Stunden nach Befruchtung schwere perikardiale Ödeme, was auf eine mögliche Funktion von *mosaic eyes* für die normale Osmoregulation und Nierenfunktion hinweisen könnte (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). Bei der ultrastrukturellen Untersuchung zeigten sich erstens aberrant extendierte Fußfortsätze von den apikalen Podozytenmembran (,mikrovillare Projektionen'), ähnliche Strukturen werden beim Menschen in frühen Stufen der FSGS und anderen glomerulären Pathologien beobachtet (Kramer-Zucker, Wiessner et al.

2005). Zweitens fehlten größtenteils die Schlitzmembranen zwischen den Fußfortsätzen (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005).

Das Protein 4.1O verbindet über seine N-terminale 30-kDa FERM-Domäne in spezifischen Zellbereichen die Membran mit dem Aktinzytoskelett (Chishti, Kim et al. 1998). Das submembranöse Aktinzytoskelett hat eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der Infrastruktur der Membrandomänen und ist entscheidend für die Stabilität der Podozytenform (Kerjaschki 2001). Im abgeflachten Fußfortsatz ist seine Dynamik grundlegend verändert (Kerjaschki 2001).

4.1 Proteine sind neben dem Nukleus häufig in Zell-Zell-Junktionen konzentriert (Hoover and Bryant 2000). Es wurde berichtet, dass einige Schlitzmembranmoleküle mit Aktin und Aktin-assoziierten Proteinen verbunden sind (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein Signaling von der Schlitzmembran die Aktin Re-Organisation moduliert, was zur Auslöschung der Fußfortsätze führen kann (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007).

Hyperglykämie verletzt direkt den Podozyten (Jefferson, Alpers et al. 2011). Konditional immortalisierte Mauspodozyten in *high Glucose* erfahren eine Umordnung des F-Aktins, begleitet von Paxillinphosphorylierung und einer erhöhten Zellmotilität (Lv, Hu et al. 2016). Eine Disorganisation der Aktin *stress fibres* könnte somit eine Ursache für die Hyperfiltration bei Diabetes sein (Cortes, Mendez et al. 2000).

Im *diabetic kidney disease mouse model* von Buffon et al. war die FRMD3 Expression reduziert (Buffon, Sortica et al. 2015). Martini et. al. stellten konkordant dazu durch renale Biopsien bei Patienten mit fortschreitender diabetischer Nephropathie signifikant reduzierte FRMD3 Transkriptionslevel fest (Martini, Nair et al. 2013).

1.7 Zellmigration

Zellmigration ist ein integrierter Prozess, der die koordinierte Regulation von verschiedenen Signalmolekülen bedarf, einschließlich einiger Kinasen und

Phosphatasen (Webb, Donais et al. 2004, Lauffenburger and Horwitz 1996, Webb, Parsons et al. 2002).

Direktionale Zellmigration wird initiiert durch extrazelluläre Reize wie ein Gradient von Wachstumsfaktoren/Chemokinen, mechanische Kräfte, bestimmte Proteine der Extrazellulärmatrix (ECM), die Topographie und Beschaffenheit der ECM und elektrochemische Gradienten (Geiger, Spatz et al. 2009, Parsons, Horwitz et al. 2010).

Es ist bisher unklar, wie podozytäre Migration mit dem Auftreten von Fußfortsatzretraktion unter pathologischen Bedingungen in Beziehung steht (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007).

1.8 Fragestellung der Doktorarbeit

In dieser Arbeit geht es darum, den Einfluss der beiden podozytären Proteine GLEPP1 und 4.1O auf Zellmigration zu untersuchen (siehe 3.1.1 bzw. 3.2.1).

In Bezug auf GLEPP1 soll außerdem folgendes erforscht werden:

- Wie beeinflusst GLEPP1 über seine Wirkung an fokalen Adhäsionen die Migration der Zelle (siehe 3.1.2)?
- Wie wirkt sich GLEPP1 auf die Tyrosinphosphorylierung der Proteine fokaler Adhäsionen *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und Paxillin aus (siehe 3.1.3)?

2 Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellkultur

Für alle Zellreihen

- PBS (*Phosphate buffered saline*): PBS Dulbecco (w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺; Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Solution (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- FCS (Fetal Calf Serum): Fetal Bovine Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland)

HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*)

- VLE (*Very Low Endotoxin*) Dulbecco's MEM (*Minimum Essential Medium*) Medium (4,5 g/L D-Glucose; Biochrom, Berlin, Deutschland); 10 % FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Hungermedium: Dulbecco's MEM Medium (1,0 g/L D-Glucose; Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 10 cm Schalen (Corning, Wiesbaden, Deutschland)

COS-7 Zellen (*CV1 in origin with SV40 genes*)

- VLE Dulbecco's MEM Medium (4,5 g/L D-Glucose; Biochrom, Berlin, Deutschland); 10 % FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- 10 cm Schalen (Corning, Wiesbaden, Deutschland)

Murine Primärpodozyten (**mPodo; ZETT Aktenzeichen O68/08**)

- Für 648 ml Medium:
 - 300 ml 3T3L1-Überstand von 3T3L1-Zellen, die kultiviert wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Low Glucose (ATCC/LGC

- Standards, Wesel, Deutschland); 10 % FCS (Hyclone Lab/GE Healthcare, München, Deutschland)); 1 % Penicillin/Streptomycin (enthält 10.000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 204 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM) (Invitrogen/Gibco, Darmstadt, Deutschland)
 - 102 ml Ham's F-12, with L-Glutamine (Lonza, Köln, Deutschland)
 - 30 ml Defined Fetal Bovine Serum, (Hyclone Lab/GE Healthcare, München, Deutschland)
 - 6 ml Penicillin/Streptomycin (enthält 10.000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - 6 ml ITS (Insulin, Transferrin, Selen) Liquid Media Supplement (100×) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - Bei Bedarf zur Kryoprotektion zusätzlich 8 % Dimethylsulfoxid (DMSO)
 - Kollagenisierte, sonst oberflächenunbehandelte T75 Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland): Beschichtung mit einer Kollagenlösung aus 0,1 mg/ml Kollagen Typ 1 (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) in 0,02N Essigsäure (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - a-WT1 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)

Humane Podozyten (hPodo)

- RPMI 1640 Medium mit Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland); 10 % FCS (Biochrom, Berlin, Deutschland); 10 µg/ml Insulin (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland); 5,5 µg/ml Transferrin (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)); 5 ng/ml Selenium (Na selenite) (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
Unter permissiven Bedingungen (Zellproliferation): direkt in die neue Kulturflasche: 0,05 µl Puromycin/ml (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) als Selektionsantibiotikum der Wahl
- Beschichtete T75 Zellkulturflaschen für adhärente Zellen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

2.1.2 Migrationsassays

- Zwischenwand-Well (ibidi, Planegg/Martinsried, Deutschland)

2.1.3 Immunfluoreszenz

- 12-Well Platte (Corning, Wiesbaden, Deutschland)
- Glasplättchen
- **Transfektionsreagenz:** X-treme 9 DNA Transfection Reagent (Roche, Mannheim, Deutschland)
- **PBS:** 136 mM NaCl (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); 2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt, Deutschland); 8,1 mM Na₂HPO₄ x 7H₂O (Merck, Darmstadt, Deutschland); 1,5 mM KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- **Methanol/Aceton-Lösung (-20°C):** 20 % Methanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); 80 % Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- **4 %-PFA-Lösung (-20°C):** 40 g PFA (Paraformaldehyd) in 800 ml Aqua destillata (A. d.); 10 ml 1 M NaOH; vorsichtig Rühren unter Erhitzen bei 65°C; 100 ml 10xPBS; abkühlen lassen auf RT; mit 1 M HCl pH auf 7,4 einstellen; auf 1 L mit A. d. auffüllen; durch 0,45 mm Filter filtrieren
- **Permeabilisierungslösung (4°C):** 4 % BSA (Bovines Serum Albumin) (VWR, Darmstadt, Deutschland) in PBS; 0,1 % Triton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **Primärantikörper:**
 - a-FAK (1:50; BD, Heidelberg, Deutschland)
 - a-Phospho-Tyrosin (1:50; BD, Heidelberg, Deutschland)
 - a-V5 (1:50; Serotec, Puchheim, Deutschland)
- **Sekundärantikörper:**
 - Alexa Fluor® 555 goat anti-mouse IgG (H+L) (1:1000 bzw. 1:5000; invitrogen, Darmstadt, Deutschland))
 - Alexa Fluor® 647 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:500; invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
 - a-hIgG FITC (1:500) (Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Vereinigtes Königreich)

- Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Eindeckmedium: ProLong® antifade reagent with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (Invitrogen Molecular Probes™, Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Immunopräzipitation

- **2x HEBS (HEPES-buffered saline solution) pH 7,05** (-20°C): 41,9 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure); 273,0 mM NaCl; 10,0 mM KCl; 1,5mM Na₂HPO₄-2H₂O; 11,1 mM Dextrose; durch 0,22 µm Filter filtrieren
- **0,25 M CaCl₂** (-20°C)
- **(1 %-Triton-) Lysispuffer** (4°C): 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 20 mM Tris HCl pH 7,5 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 150 mM KCl; 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraacetylsäure) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 100 nM Na₃VO₄ (BioChemica, Flacht, Deutschland); Complete Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten (Roche, Mannheim, Deutschland); erst kurz vor dem Einsatz dazu: 0,25 mM PMSF (s. u.)
- **PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)** (-20°C): 10 mM PMSF (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 100 % Isopropanol
- **IP-Antikörper:**
 - **a-V5** (novex® by life technologies™, Darmstadt, Deutschland) + **Protein G Sepharose** (GE Healthcare, München, Deutschland)
 - **M2-Beads** (Sigma, Taufkirchen, Deutschland)
- **2x Laemmli mit DTT (Dithiothreitol)** (-20°C):

2x Laemmli Stock Solution: 100 mM Tris-HCl pH 6,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 4 % *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (Biomol, Hamburg, Deutschland); 20 % Glycerol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 1 g Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), auf 500 ml mit A. d. auffüllen

2x Laemmli mit DTT: 900 µl 2x Laemmli Stock Solution, 100 µl 1 M DTT (Biomol, Hamburg, Deutschland)
- **Polyacrylamidgele (10%ig):** Gießstation (Bio-Rad, München, Deutschland); 0,75 mm Dicke; Zusammensetzung der Gelpuffer siehe Tabelle 1

- **Puffer A** (pH 8,8): 360 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland); 1140 mM Tris Base (Roth, Karlsruhe, Deutschland); 14 mM SDS (Biomol, Hamburg, Deutschland); A. d.
- **Puffer B** (pH 6,9): 484 mM Tris HCl; 16 mM Tris Base; 14 mM SDS; A. d.)

	Trenngelpuffer für 2 Trenngele à 3,9 ml	Sammelgelpuffer für 2 Sammelgele
Rotiphorese (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	3 ml	0,535 ml
A. d.	1,5 ml	1,135 ml
Puffer	4,5 ml Puffer A	1,665 ml Puffer B
Kurz vor dem Gießen hinzufügen:		
10%iges APS (Ammoniumpersulfat) (Biomol, Hamburg, Deutschland)	90 µl	40 µl
Temed (N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)	10 µl	5 µl

Tabelle 1: Zusammensetzung von Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer

- Proteinlaufmarker (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland)
- **Nitrocellulosemembran:** Protran BA 85 (GE Healthcare, München, Deutschland)
- **10x Laufpuffer** (4°C): 191,8 mM Glycin (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); 247,7 mM Tris Base; 3,5 mM SDS; 1:10 verdünnt eingesetzt
- **Transferpuffer** (4°C): 10 Vol% 10x Transferpuffer (247,7 mM Tris Base; 187,8 mM Glycin; A. d.); 20 Vol% Methanol (AppliChem, Darmstadt, Deutschland); A. d.
- **25x Proteinwaschpuffer** (4°C): 680ml 5M NaCl; 340ml 1M Tris-HCl pH 7,5; 34ml Tween 20 (Roth, Karlsruhe, Deutschland); 1:25 verdünnt eingesetzt
- **Blockpuffer:** 5% BSA (VWR, Darmstadt, Deutschland) in Waschpuffer
- **Primärantikörper:**
 - a-M2 (1:400): Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
 - a-PY31 Paxillin: Paxillin (pY31) RB Polyclonal Antibody (invitrogen, Darmstadt, Deutschland)

- a-PY397-FAK: FAK (pY397) RB Polyclonal Antibody (invitrogen, Darmstadt, Deutschland)
- a-PY576/577-FAK: Phospho-FAK (Tyr576/577) Antibody (Cell Signaling, Leiden, Niederlande)
- **Sekundärantikörper**
 - a-mouse (1:10.000) aus der Ziege (Dako, Hamburg, Deutschland))
 - a-rabbit (1:7500) aus dem Esel (GE Healthcare UK limited, München, Deutschland)
- **ECL (Elektrochemilumineszenz)-Lösung** (lichtgeschützt, 4°C): unmittelbar vor Anwendung eine 1:1 Mischung aus Lösung A und B ansetzen
 - **Lösung A:** 100 mM Tris Base pH 8,5; 2,5 mM Luminol (Fluka, Taufkirchen, Deutschland) in DMSO; 0,4 mM Cumarinsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in DMSO; A. d.
 - **Lösung B:** 100 mM Tris Base pH 8,5; 1,5 % H₂O₂ (Roth, Karlsruhe, Deutschland); A. d.

2.1.5 Ligation

- 1,5% low melting Agarose (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **1x TAE-Puffer** für die Gelelektrophorese: 2 ml 50x TAE (242g Tris Base; 57,1 g Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 100 ml H₂O; 98ml H₂O)
- 5 µl Ethidiumbromidlösung (10mg/ml; Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 15 µl Vektor-DNA (Desoxyribonukleinsäure) nach Restriktionsenzymverdau
- 15 µl Insert-DNA nach Restriktionsenzymverdau
- 35 µl A. d.
- 0,4 µl T4 DNA Ligase (400.000 U/ml; New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland)
- 5 µl 10x Puffer für T4 DNA Ligase mit 10mM ATP (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland)

2.1.6 Transformation

- **1 µg DNA** des zu amplifizierenden Plasmids

- **50 µl E. coli MC1061** bei Ampicillin-Resistenz als Selektionsgen bzw.
50 µl E. coli MC1061P3 bei Ampicillin/Tetracyclin- Resistenz als Selektionsgen
- **LB (*lysogeny broth*) Broth Base Agarplatten** mit Ampicillin- bzw.
Ampicillin/Tetracyclinresistenz

2.1.7 Mini- und Maxikultur, Maxi-Präp

- **LB Broth Base Medium (4°C):** 6 g LB Broth Base; 250 ml A. d.; pH mit NaOH auf 7 einstellen; auf 300 ml mit A. d. auffüllen; autoklavieren
Für Plasmide mit Ampicillin-Resistenz als Selektionsgen:
1 ml einer (10 mg/1 ml) Ampicillin-Stammlösung/100 ml Medium
Für Plasmide mit Ampicillin/Tetracyclin-Resistenz als Selektionsgen:
0,25 ml einer (10 mg/1 ml) Ampicillin-Stammlösung + 0,75 ml einer (1 mg/1 ml) Tetracyclin-Stammlösung/100 ml Medium
- **Maxi-Präp-Kit** (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- **100%iges Isopropanol**
- **70%iges Ethanol**
- **HPLC-Wasser** (*High performance liquid chromatography*-Wasser)

2.1.8 Restriktionsenzymverdau

- Ansatz: 1,5 µg DNA; 0,6 µl Restriktionsendonuklease 1 (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland); 0,6 µl Restriktionsendonuklease 2 (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland); 3 µl zu den Enzymen gehöriger Puffer (10x NEBuffer 1-3) (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Deutschland); bis 30 µl mit A. d. auffüllen
- 1%iges Ethidiumbromid-Agarose-Gel
- 20 µl λ-Marker (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) pro Gel
- 7 µl 100 bp Marker (New England BioLabs, Frankfurt a. M., Deutschland) pro Gel

2.1.9 Geräte

Fluoreszenzmikroskop	AXIO Observer.Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Blotkammer	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Imager	Multimage™ Light Cabinet	Alpha Innotech, Kasendorf, Deutschland
Kamera für Migrationsassays	E4500	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop Zellkultur	Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Proteingelelektrophorese-kammer	Mini-PROTEAN Tetra cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Zentrifuge (15 ml Falcons, Zellkultur)	ROTIXA/RP	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge (15 ml Falcons)	HERAEUS MULTIFUGE 4KR Centrifuge	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge (1,5 ml Gefäße)	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Tabelle 2: Geräte

2.1.10 Statistik

Alphaview, Image J, Excel, GraphPad Prism 6

2.2 Zellkultur

2.2.1 HEK 293T (*Human Embryonic Kidney*)

HEK 293T Zellen sind humane embryonale Nierenzellen, die ursprünglich aus der Niere eines menschlichen Abortes isoliert und mit DNA-Abschnitten des Adenovirus 5 transformiert wurden (Graham, Smiley et al. 1977). Diese DNA-Abschnitte kodieren für Proteine, die Apoptose hemmen; dadurch wurden die Zellen immortalisiert.

Zusätzlich können sie als *Simian Virus (SV40) large T antigen* exprimierende Zellen Vektoren mit SV40 origin amplifizieren und haben somit ein gesteigertes Expressionslevel bei transienter Transfektion (Lin, Boone et al. 2014).

Die HEK 293T-Zellen wurden in 10cm-Schalen im Brutschrank bei 37°C, 21 % O₂ und 5 % CO₂ mit 10%igem FCS-VLE Dulbecco's MEM Medium (4,5 g/L D-Glucose) kultiviert. Mindestens alle zwei Tage wurden die Zellen passagiert. Unter der Sterilbank wurde dazu zunächst das alte Medium abpipettiert und die Zellen mit sterilem PBS (*Phosphate buffered saline*) (Raumtemperatur (RT)) gewaschen, da FCS (*Fetal Calf Serum*) Reste aus dem Medium eine erfolgreiche Ablösung der Zellen mittels Trypsin/EDTA behindern. Anschließend wurde der Zellrasen mit 1 ml vorgewärmten Trypsin/EDTA überschichtet und für ca. 5 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die Trypsinisierung wieder zu stoppen, wurden 6 ml frisches vorgewärmtes Medium zu den bisher in 1 ml Trypsin/EDTA gelösten Zellen hinzugegeben; diese Zellsuspension wurde gleichmäßig auf sieben Schalen mit frischem Medium verteilt (1:7 Splitten für zwei Tage). Je nach Konfluenz der Zellen empfahl sich zum Erhalt der Zellen für zwei Tage ein Verhältnis von 1:6-1:8.

In dieser Arbeit wurden HEK 293T-Zellen für Immunopräzipitationen verwendet.

2.2.2 COS-7 Zellen (CV1 in origin with SV40 genes)

COS-7 Zellen stammen von CV-1 Zellen (Fibroblasten aus der Niere der Grünen Meerkatze) ab, die wie die HEK 293T Zellen auch das large T antigen des SV40 exprimieren (Rio, Clark et al. 1985).

Die COS-7-Zellen wurden wie die HEK-293T Zellen kultiviert, nur erhielten die stabil transduzierten COS-7 Zellen eine Zugabe von 60 µl G418-Sulfat (Geneticindsulfat) pro 10 cm Schale zur Selektion. Hierbei handelte es sich um stabil transduzierte GFP (*green fluorescent protein*) und GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1*) WT (Wildtyp) COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden für Migrationsassays und Immunfluoreszenzen gebraucht.

2.2.3 Murine Primärpodozyten

Murine Primärpodozyten wurden aus Glomeruli von 6-8 Wochen alten GLEPP1 WT bzw. GLEPP1 KO Mäusen isoliert (ZETT Aktenzeichen O68/08). Dabei wurde nach dem Protokoll von Zuo, Yang, Potthoff et al. vorgegangen (Zuo, Yang et al. 2012):

Die isolierten Glomeruli wurden nach der Aufreinigung mit sterilem PBS unter der Sterilbank in Medium (siehe 2.1.1) aufgenommen und 4 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ auf kollagenisierten T75 Zellkulturflaschen ohne Mediumwechsel kultiviert. Die im speziellen Medium durch den 3T3L1-Überstand enthaltenen Faktoren waren wichtig für das Wachstum der Primärpodozyten.

Nach lichtmikroskopischer Bestätigung der Aussprossung der Podozyten konnte das alte Medium dann abgesaugt und die Glomeruli durch Spülen mit 10 ml PBS gelöst werden. Mit 3,5 ml Trypsin/EDTA wurde anschließend 5-10 min bei 37 °C inkubiert, die restlichen Zellen bei Bedarf mit dem Zellschaber abgekratzt und in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min auf dem Magnetcatcher belassen. Der Überstand wurde bis auf 1-2 ml entfernt, die Zellen wieder resuspendiert und in einem neuen Reaktionsgefäß 4 min bei 216 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Medium aufgelöst und auf neue, kollagenisierte T75 Zellkulturflaschen verteilt. Durch Wilms-

Tumor-Protein (WT1) Färbung mit α -WT1 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) wurde die Reinheit der Podozyten überprüft.

Die murinen Primärpodozyten wurden bis maximal zur sechsten bis siebten Passage genutzt.

Zur Subkultivierung wurde das alte Medium abgenommen, der Zellrasen mit sterilem PBS (RT) gewaschen und die Zellen mit 5 ml vorgewärmten Trypsin/EDTA für 5-6 min bei 37°C inkubiert. Nach Beobachtung der Ablösung der Zellen unter dem Lichtmikroskop konnte der Inhalt der Kulturflasche in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Inaktivierung des Trypsins 5 ml vorgewärmtes Medium hinzugegeben werden. Da murine Primärpodozyten empfindlich auf Trypsin-Reste reagieren, erfolgte anschließend eine Zentrifugation der Zellen bei 216 x g für 5 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 6 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 1:3 verteilt auf vorbereitete kollagenisierte Zellkulturflaschen mit frischem Medium.

Murine Primärpodozyten aus den Glomeruli von GLEPP1 Wildtyp und GLEPP1 *Knockout* Mäusen wurden für Migrationsassays und Immunfluoreszenzen kultiviert.

2.2.4 Humane Podozyten

Humane Podozyten vom Typ AB8/13 sind konditional immortalisierte Zellen. Sie wurden freundlicherweise von Prof. Moin Saleem, Bristol, UK zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus der Niere eines dreijährigen Kindes mit einseitiger antenataler Hydronephrose (10% Restfunktion) isoliert und mit dem temperatursensitiven SV40-Gen (Konstrukt-Nr. 8) und einer katalytischen Untereinheit des Enzyms Telomerase (*Human telomerase reverse transcriptase*, hTERT) (Konstrukt-Nr. 13) transfiziert (Saleem, O'Hare et al. 2002). Durch die Überexpression von hTERT wird der Degradation der Chromosomenenden selbst nach zahlreichen Replikationen in der ausdifferenzierten Zelle vorgebeugt.

Durch die Temperaturabhängigkeit proliferierten die Zellen bei 33°C und differenzierten bei 37,5°C.

Die Subkultivierung während der **Proliferation** bei 33°C erfolgte bei den humanen prinzipiell wie bei den murinen Primärpodozyten, die Trypsinisierung geschah nur mit 3,5 ml vorgewärmten Trypsin/EDTA pro Zellkulturflasche und das Abstoppen der Reaktion mit ca. 7 ml vorgewärmtem Medium. Die humanen Zellen wurden 1:3 bis 1:5 in frisch mit Puromycin zugesetztem Medium verdünnt, da es sich in dieser Arbeit ausschließlich um stabil transduzierte Zellen (4.10 und GFP) mit Puromycinresistenz als Selektionsmarker handelte.

Damit die Zellen bei der **Ausdifferenzierung** überwiegend einzeln lagen, wurden sie vor der Aussaat ausgezählt (s. u.) und mit nur 52.850 Zellen/ml ausgesät, denn gerade humane Podozyten bilden stark verzweigte Fußfortsätze aus. Zur Ausdifferenzierung wurden die Zellen bei 37,5°C mit Puromycin-freiem Medium inkubiert, ein Mediumwechsel fand drei Mal pro Woche statt. Der Prozess der Ausdifferenzierung wurde täglich lichtmikroskopisch beobachtet, nach 10-14 Tagen war er vollzogen.

Humane Primärpodozyten vom Typ AB8/13 wurden stabil transduziert (4.10 und *green fluorescent protein* (GFP)) für Migrationsassays verwendet.

2.2.5 Zellen auszählen

Um die Zellzahl zu bestimmen wurde die Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht es, anhand von Stichproben auf die gesamte Zellzahl rückzuschließen.

Die Zellsuspension wurde mit 1000-1500 U/min gevortext, aus der Mitte des Falcons 10 µl entnommen und langsam an die Zählvorrichtung pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wurden Zellen aus acht markierten Großquadranten ausgezählt und hochgerechnet: $(\text{gezählte Zellen}/8) \times 10.000 = \text{Zellen/ml}$ im untersuchten Falcon.

2.3 Migrationsassays

Migrationsassays wurden in dieser Arbeit sowohl mit murinen Primärpodozyten als auch mit humanen Podozyten und COS-7 Zellen durchgeführt.

Zum Ansatz des Assays wurden die Zellen ausgezählt und auf die Fläche eines 1x1 cm großen Wells (ibidi, Planegg/Martinsried, Deutschland) ausgesät. Dieses Well war mittig durch eine Zwischenwand (1mm Dicke) in zwei Kammern unterteilt, in die je 70 µl der Zellsuspension (mPodo 62.500 Zellen/ml; hPodo 52.850 Zellen/ml) gegeben wurden.

Der Assay konnte gestartet werden, wenn die Fläche nahe der Zwischenwand dünn besiedelt war, bei den humanen Podozyten war zusätzlich eine vorangehende Ausdifferenzierungszeit von 10-14 Tagen (siehe 2.2.4) zu beachten. Zum Start wurde die Zwischenwand steril mit einer Pinzette entfernt, sodass zwischen den beiden Zellrasen eine gut abgrenzbare, in den Versuchsreihen immer gleich große leere Fläche bestand (*wound healing assay*).

Im Assay wurden Zellen, die nach 0, 12, 24 h und teils 48 h auf die vormals freie Fläche migriert waren, gezählt und fotografiert.

2.4 Immunfluoreszenz

2.4.1 Grundlagen

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, um mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die subzelluläre Lokalisation von Proteinen darzustellen.

Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit mit Podozyten und COS-7 Zellen gemacht.

Tag 1 abends	Aussaat
Tag 2 morgens	Transfektion (bei COS-7 Zellen)
Tag 3 morgens	Mediumwechsel
Tag 4 morgens	Fixierung, Antikörper-Inkubation, Präparatherstellung

Tabelle 3: Zeitlicher Ablauf bei Immunfluoreszenzen

Die Zellen wurden am Tag 1 abends auf dünne runde Glasplättchen (d=1 cm) ausgesät, die auf dem Boden jeweils eines Wells einer 12-Well-Platte lagen (siehe Tabelle 3).

Damit die Zellen auch an Tag 4 bei der Präparatherstellung noch einzeln lagen, wurden sie sehr dünn (je nach vorliegender Konfluenz 1:100-1:200) ausgesät (1 ml/Well).

2.4.2 Transfektion von COS-7 Zellen für die Immunfluoreszenz

Für eine hohe Expression des untersuchten Proteins wurden die COS-7 Zellen am Tag 2 morgens transfiziert. Für die Transfektion wurde unter der Sterilbank in einem Mikroreaktionsgefäß pro Datenpunkt 3 µl X-treme GENE 9 DNA Transfection Reagent auf 100 µl serumfreiem Medium (VLE Dulbecco's MEM Medium (4,5 g/L D-Glucose)) gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde 1µg DNA hinzugegeben und wieder vorsichtig gemischt. Nach 15-minütigem Inkubieren bei Raumtemperatur konnte das Gemisch in das Well gegeben werden.

Am Tag 3 morgens wurde das alte Medium vorsichtig abgenommen und vorsichtig frisches 5 % FCS Medium (VLE Dulbecco's MEM Medium (4,5 g/L D-Glucose)) in das Well gegeben.

2.4.3 Fixierung, Antikörper-Inkubation, Präparatherstellung

Je nach Versuch wurden die Zellen an Tag 4 mit Methanol/Aceton oder mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und sehr vorsichtig mit 500 µl PBS gewaschen. Erst unmittelbar vor der Fixierung wurde das PBS wieder abgenommen, um eine Austrocknung der Plättchen zu verhindern.

Beim Fixieren sollte zum einen die Zellstruktur möglichst wie in vivo erhalten werden, zum anderen sollte die Zellmembran permeabilisiert werden, damit später die Antikörper Zutritt zum Zytoplasma erlangten (siehe Tabelle 4).

Methanol/Aceton	Paraformaldehyd
<p>Methanol/Aceton präzipitiert als organisches Lösungsmittel die Zellproteine und permeabilisiert gleichzeitig die Zellmembran; ist somit nicht für lösliche Antigene geeignet.</p> <p>Bei längerer Inkubation mit Methanol-Aceton wird die Zelle zu sehr geschädigt. Deshalb wurde das Methanol-Aceton (-20°C, 500 µl pro Well) schnell auf die Zellen geben und sehr zügig wieder abgenommen. Im Anschluss wurde sofort 3x mit je 500 µl PBS gewaschen.</p>	<p>Paraformaldehyd vernetzt die Proteine quer („crosslinks“) und hat selber kaum Permeabilisierungseigenschaften.</p> <p>Je 500 µl der 4 % PFA-Lösung wurden auf ein Well gegeben und 10 min. inkubiert. Anschließend wurde 3x mit 500 µl PBS gewaschen. Durch 10-minütige Inkubation von 500 µl 4% BSA in 0,1 % Triton in PBS pro Well wurde permeabilisiert.</p> <p>Im Anschluss wurde 3x mit je 500 µl PBS gewaschen.</p>

Tabelle 4: Methoden der Fixierung bei der Immunfluoreszenz

In dieser Arbeit wurde ausschließlich die indirekte Immunfluoreszenz genutzt. Hier bindet ein unmarkierter Antikörper, der sog. Primärantikörper, spezifisch an das Antigen. Erst ein zweiter, gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper ist fluoreszenzmarkiert. Stammt der Primärantikörper z. B. aus der Maus, dann ist der Sekundärantikörper aus einer anderen Spezies, die nach Präsentation von Maus-Immunglobulin spezifisch Antikörper gegen Maus-Fc-Teile ausgebildet hat.

Für die Antikörperinkubation wurden die hochkonzentrierten Antikörper in 4 % BSA in PBS gelöst. Die fixierten Zellen wurden mit 200 µl Primärantikörper pro Glasplättchen für mindestens 30 min. inkubiert. Danach wurde vorsichtig 3x mit je 500 µl PBS pro Well gewaschen. Anschließend konnte mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (300 µl/Glasplättchen) mindestens 30 min. inkubiert werden, ab dessen Zugabe mussten die Zellen vor Licht geschützt werden. Dann wurde wieder vorsichtig 3x mit je 500 µl PBS pro Well gewaschen.

Bei jeder indirekten Immunfluoreszenz wurden Negativkontrollen nur mit Sekundärantikörper, ohne Primärantikörper gemacht. So konnte unspezifisches Binden der Sekundärantikörper an andere Zellstrukturen ausgeschlossen werden.

Bei der Präparatherstellung erfolgte das Eindeckeln für jedes Glasplättchen einzeln. Dafür wurde das Glasplättchen nach vorsichtigem Trockentupfen am Plättchenrand langsam und schräg ohne Luftblasen mit der zellbedeckten Seite auf einen Tropfen ProLong® antifade reagent with DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) auf einem Objektträger gesetzt. Nach einer Trockenphase wurde das Präparat weiterhin lichtgeschützt aufbewahrt und im Fluoreszenzmikroskop (ZEISS Observer Z1 AXIO) am nächsten Tag betrachtet und fotografiert. Mit Image J wurde ausgewertet.

2.5 Immunopräzipitation

2.5.1 Grundlagen

Die Immunopräzipitation ist die Methode der Wahl um Protein-Protein-Interaktionen wie Phosphorylierung darzustellen. Der Nachweis funktioniert vereinfacht über spezifische Bindung eines beschwerten Antikörpers an ein Protein und Extraktion dieses Proteins durch Herunterziehen. Wenn nach Gelelektrophorese und Western Blot des Präzipitats die Proteinbande und die Bande des phosphorylierten Proteins ins Verhältnis gesetzt werden, kann der Grad der Phosphorylierung nachgewiesen werden.

Tag 1 abends	Aussaat
Tag 2 morgens	Transfektion
Tag 2 mind. 6h nach der Transfektion	Mediumwechsel
Tag 3 morgens	Zellernte

Tabelle 5: Zeitlicher Ablauf bei der Immunopräzipitation

An Tag 1 abends wurden HEK 293T Zellen in 10 % FCS Dulbecco's MEM Medium 2,75 % D-Glucose in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:14 je nach vorliegender Konfluenz ausgesät (siehe Tabelle 5). Pro Datenpunkt wurden 2 Schalen (d=10cm) benötigt.

2.5.2 Transfektion für die Immunopräzipitation

Damit die Zellen die untersuchten Proteine überexprimierten, wurden sie mit der Calciumphosphat-HEBS-Methode transfiziert (modifiziert nach Graham, van der Eb 1973).

Durch Zusammenführung der 0,25 M Calciumchlorid-Lösung und der 2x HEBS-Lösung (pH=7,05) präzipitierten die Calcium-Ionen aus der CaCl₂-Lösung mit den Phosphat-Ionen aus der 2x HEBS-Lösung. An der Oberfläche des Präzipitats band die beigefügte DNA (Graham and van der Eb 1973). Zusammen mit dem Präzipitat wurde die DNA sowohl über Caveolae- als auch über Clathrin-vermittelte Endozytose (Olton, Close et al. 2011) in die Zelle aufgenommen und gelangte so in den Zellkern.

Bei der Transfektion am 2. Tag morgens wurden die Plasmide in einem Mikroreaktionsgefäß pro 10cm Schale vorgelegt, 500 µl 4°C kalte CaCl₂-Lösung hinzugefügt und 500 µl 4°C kalte HEBS-Lösung in Tröpfchen unter Vortexen bei 1500 U/min dazugegeben. Nach kurzer Inkubation von 1 min konnte das Gemisch auf die Zellen gegeben werden.

Wenn die Bildung von Kristallen im Lichtmikroskop bestätigt wurde, konnte nach mind. 6 h das alte Medium abgesaugt und Hungermedium (Dulbecco's MEM Medium (1,0 g/L D-Glucose) ohne FCS hinzugegeben werden.

2.5.3 Zellernte

Während des gesamten Versuchs empfahl es sich für optimale Proben ausschließlich auf Eis zu arbeiten.

Am dritten Tag morgens wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums durch einen Strahl von 4°C kaltem PBS aus der Pipette in 15 ml Falcons geerntet. Im Anschluss folgte das Abzentrifugieren der Zellen bei 4°C und 453 x g für 5 min. Der PBS-Überstand konnte nun abgesaugt und das erhaltene Zellpellet je nach Größe in 150-400 µl frisch mit PMSF versetzten Lysispuffer resuspendiert werden. Die Lyse der Zellen fand in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 15 min. auf Eis statt. Um Membranreste und anderen Zellschrott zu entfernen, wurde für mindestens 15 min. bei 4°C und 11.337 x g zentrifugiert. Der Überstand fand zu einem Zehntel als Lysat, also als allgemeines Proteingemisch aus den Zellen Verwendung; der Rest der Probe wurde für die Immunopräzipitation genutzt.

Den Lysaten wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß im 1:1-Verhältnis 2x Laemmli mit DTT hinzugefügt, der das Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) enthält. Durch das SDS

und Kochen für 5 min bei 95°C wurden die Proteine denaturiert. Intermolekulare Wechselwirkungen wie z. B. Disulfidbrücken würden so unterbunden, die Proteine lagen in der Probe nur noch linear in ihrer Primärstruktur vor. Dank dieser beiden Schritte befanden sich die Proteine bei der Gelelektrophorese später einzeln im Gel.

Für die eigentliche Immunopräzipitation wurden die verbleibenden neun Zehntel des Überstandes nach oben beschriebener Zentrifugation verwendet. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die IP-Probe mit einem Antikörper gegen das untersuchte Protein für mind. 1 h auf dem 360° Schüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit 30 µl Protein G Sepharose pro Probe für mindestens eine weitere Stunde auf dem 360° Schüttler bei 4°C inkubiert.

In der Protein G Sepharose sind schwere Sepharose Kügelchen (*beads*) aus Polysacchariden rundherum mit Protein G beschichtet. Protein G ist ein Protein aus der Zellwand von Streptococcus-Bakterien, welches eine hohe Bindungsaffinität für die Fc-Region von Antikörpern der IgG-Klasse vieler Säugetiere, besonders z. B. Mäuse-IgG hat.

Bei der ersten Inkubation band ein Primärantikörper spezifisch an ein Protein aus dem Proteingemisch. Die zweite Inkubation mit Protein G Sepharose diente dazu, den Antigen-Antikörper-Komplex zu beschweren.

In den folgenden Waschschrritten konnten die Antigen-Antikörper-Komplexe präzipitieren und so von den anderen Proteinen getrennt werden. Dazu wurden die Proben nach den beiden Inkubationen bei 4°C und 604 x g für 3 min. zentrifugiert. Außerhalb der Zentrifuge wurde weiterhin auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 4°C kalten 800 µl Lysispuffer mit frisch zugesetztem PMSF resuspendiert. Dann wurde wieder bei 4°C und 604 x g für 3 min. zentrifugiert. Insgesamt wurde dreimal mit Lysispuffer (+PMSF) gewaschen. Die letzte Zentrifugation war abweichend bei 4°C und 11.337 x g für 1 min. Das Pellet wurde anschließend mit je 30 µl 2x Laemmli mit DTT resuspendiert, die Proben bei 96°C für 5 min denaturiert und dann weiter für die SDS-Gelelektrophorese und den Western Blot verwendet.

2.5.4 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse in einem Polyacrylamidgel durch Anlegen einer elektrischen Spannung. Nach dem Aufkochen der Proteine mit dem SDS-enhaltenden 2x Laemmli mit DTT wurden die Proteine nicht nur denaturiert (s. o.), sondern bildeten mit dem Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) auch Komplexe. Dank der so erhaltenen negativen Ladung wanderten die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld in Richtung der positiven Anode.

In dieser Arbeit wurde nach einem Protokoll basierend auf dem diskontinuierlichen System von U. K. Laemmli (1970) gearbeitet. Die Proteine wanderten die zunächst im Sammelgel (ca. 2 cm) und später im Trenngel zur Anode. Je länger das Protein war, desto schlechter kam es im elektrischen Feld durch das Polyacrylamidgel und desto weiter oben lag es im Gel.

Die Gele basierten auf Tris-Glycin-Puffern (siehe 2.1.4) und wurden 0,75 mm dick am Vortag gegossen und von feuchten Papiertüchern umwickelt bei 4°C aufbewahrt. Vor dem Laden des Gels wurde die Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München, Deutschland) eingerichtet, mit Laufpuffer gefüllt, auf Dichtigkeit überprüft und die Taschen im Gel gereinigt. Dann wurden die Taschen mit jeweils 15 µl Lysat oder 10 µl IP-Probe beladen, dazu lief in jedem Gel ein Proteinmarker (6 µl/Tasche) mit.

Die SDS-Gelelektrophorese geschah zunächst mit 70 V und später 20 mA/Gel, sie dauerte ca. 1:45 h.

Ziel des Western Blot ist es, die Proteine des Polyacrylamidgels elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran zu übertragen. Auf der Membran ist es möglich, die Proteinbanden durch Inkubation mit Antikörpern sicht- und quantifizierbar zu machen. Der Western Blot wurde in einer Blotkammer (Bio-Rad, München, Deutschland) wie in einem Sandwich durchgeführt, das zunächst in einer flachen Wanne aus 4°C kaltem Transferpuffer zusammengelegt wurde. Dazu kamen auf die Klemmvorrichtung in folgender Reihenfolge Schwamm, Blottingpapier, Gel (so um 180° wenden, dass die ganz links geladene Probe jetzt im Sandwich ganz rechts lag), beschriftete Nitrocellulosemembran, Blottingpapier, Schwamm. Um Luftblasen zu vermeiden,

wurden die Schichten beim Zusammensetzen regelmäßig mit Transferpuffer übergossen und nach Auflegen des zweiten Blottingpapiers vorsichtig ausgestrichen.

Das Sandwich wurde neben einem Eisblock in die Blotkammer geschoben, die mit 4°C kaltem Transferpuffer gefüllt war, welcher 20 % Methanol zur Aktivierung der Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran enthielt. Es wurde 1:30 h bei 200 mA geblottet.

Vor der Antikörper-Inkubation war es notwendig, die restlichen Proteinbindungsstellen der Nitrocellulosemembran mit BSA (Bovines Serum Albumin) für 60 min bei 37 °C auf dem Querschüttler abzublocken. Dann konnte die Nitrocellulosemembran mit dem spezifischen Primärantikörper reagieren (über Nacht; bei 4°C auf dem Querschüttler). Nach dreimaligem Waschen mit Proteinwaschpuffer für je 5 min auf dem 3D-Schüttler wurde auf dem Querschüttler mit dem Peroxidase-markierten, an den Fc-Teil des Primärantikörpers koppelnden Sekundärantikörper inkubiert (siehe Tabelle 6).

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Inkubation mit Sekundärantikörper	
		Konzentration	Zeit
Aus der Maus	α-mouse	Mind. 30 min	1:10.000
Aus dem Kaninchen	α-rabbit	Mind. 45 min	1:7.500

Tabelle 6: Wahl des Sekundärantikörpers in Abhängigkeit von dem Primärantikörper

Auch nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper folgten drei Waschschrte von je 5 min auf dem 3D-Schüttler.

Mithilfe einer Elektrochemilumineszenz-Lösung (siehe 2.1.4) konnten nun die Nitrocellulosemembranen im Imager entwickelt werden und damit Position, Größe und Stärke der Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Peroxidase-markierten Antikörper katalysierten die Oxidation von Luminol aus der ECL-Lösung und lösten damit eine Chemilumineszenz aus, das entstehende Licht wurde mit einem Film im Imager gemessen.

Für das Entwickeln wurde je 1 ml der Lösung A und 1 ml der Lösung B (beides 4°C) gemischt und vorsichtig auf die Nitrocellulosemembran getropft. Unmittelbar im Anschluss wurde die ECL-Reaktion mit dem Imager (Alpha Innotec, Kasendorf, Deutschland) nach 1, 4 und 11 min. aufgenommen.

Nachher wurden die Proteinbanden mithilfe des Alpha View Programms densitometrisch unter Berücksichtigung des jeweiligen Hintergrundes einzeln

ausgemessen. Durch den Quotienten (IP Phospho-Protein/IP Protein) konnte die Phosphorylierung quantifiziert werden.

2.6 DNA-Subklonierung

2.6.1 Ligation

Eine Ligation dient dem Einbau Protein-kodierender DNA-Abschnitte (Insert) in Vektoren, die zur Einschleusung eines fremden Gens in eine Zelle im Rahmen einer Transfektion genutzt werden können.

Zunächst wurden das Insert und ein Vektor mit bereits bestehender Antibiotikaresistenz als Selektionsgen jeweils mit den gleichen Restriktionsendonukleasen drei Stunden bei 37°C verdaut. Dann wurden je 15 µl Insert und 15 µl Vektor auf ein Ethidiumbromid-haltiges *low melting Agarose* (LMA) Gel geladen und bei maximal 85 V über 30 min. elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und bei 70°C in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß geschmolzen. Eine Lösung aus 35 µl A. d., 0,4 µl T4 DNA Ligase, 5 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer und 2 µl der verflüssigten Vektor LMA wurde auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Das eine Reaktionsgefäß diente zur Kontrolle, das andere wurde mit 4 µl verflüssigter Insert LMA versetzt und war somit Ort der Ligation. Beide Reaktionsgefäße wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, nach erfolgreichem Ablauf war im Ligations-Reaktionsgefäß das Insert jetzt im Vektor integriert. Fünf µl des Ligationsansatzes wurden anschließend transformiert.

2.6.2 Transformation/Amplifikation

Bei der Transformation wird das Plasmid in chemisch kompetente Bakterien von außen eingeschleust, dort vermehrt es sich unabhängig vom bakteriellen Genom (bis zu mehrere hundert Kopien/Bakterium) (siehe Tabelle 7).

Tag 1 abends	Transformation
Tag 2 morgens	Ansatz der Minikultur

Tag 2 abends (mind. 8 h später)	Ansatz der Maxikultur
Tag 3 morgens (optimal 16 h später)	Maxipräparation

Tabelle 7: Zeitlicher Ablauf bei der Transformation

Die Wahl des E. coli Bakterienstamms hing von dem Selektionsgen auf dem zu transformierenden Plasmid ab (siehe 2.1.6).

Bei der Transformation wurde auf Eis gearbeitet, 1 µg der zu amplifizierenden DNA bzw. 5 µg des Ligationsansatzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt, vorsichtig mit 50 µl der Bakteriensuspension gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock für 5 min. bei 37°C verstärkte die Aufnahme des Plasmids in die Bakterien. Nachfolgend konnte die Bakteriensuspension auf 10cm Ampicillin (Amp) bzw. Ampicillin/Tetracyclin (Amp/Tet) LB Broth Base Agar Schalen (gemäß den bakteriellen Resistenzen) dünn ausplattiert werden. Zur Vermehrung der Bakterien wurden sie 12-20 h über Kopf bei 37°C bebrütet.

2.6.3 Minikultur

Am 2. Tag morgens wurden die Minikulturen angelegt, indem mit einer sterilen Pipettenspitze an den Rand einer Kolonie getippt und die Pipettenspitze in ein 15 ml Tube mit 3 ml Amp bzw. Amp/Tet LB Broth Base Medium fallen gelassen wurde. Die Minikulturen wurden bei mäßig erhaltener Luftzufuhr für mind. 8 h bei 37°C und 220 U/min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt.

2.6.4 Maxikultur und Maxipräg

Für die Maxikulturen zur weiteren Vervielfachung des Plasmids wurden 200 µl der trüben Bakteriensuspension aus den Minikulturen entnommen und zu 200 ml sterilem Amp bzw. Amp/Tet LB Broth Base Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben. Die Maxikultur wurde für mind. 12 h bei 37°C und 220 U/min auf einem Orbitalschüttler bebrütet.

In dieser Arbeit wurde mit dem Maxi-Präg-Kit von Qiagen, Hilden, Deutschland, nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet.

Nach alkalischer Lyse der Bakterien und anschließender Neutralisierung wurde die Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschersäule gereinigt und dann eluiert. Schließlich wurde sie mit 100 % Isopropanol gefällt, dazu wurde sie für mind. 1 h bei 3896 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (mind. 20 min bei 3896 x g und 4°C). So wurden Salz- und Alkoholreste entfernt und das DNA-Pellet konnte luftgetrocknet und anschließend mit 200 µl HPLC-Wasser resuspendiert werden (Lagerung bei 4°C).

Zur Konzentrationsbestimmung der DNA in der Lösung wurde die optische Dichte (OD) bei 260 nm mittels Photometer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bestimmt.

2.6.5 Restriktionsenzymverdau

Um die Amplifikation des korrekten DNA-Abschnittes zu bestätigen, wurde ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Im Verdau schnitten Endonukleasen die DNA an bestimmtem Basenfolgen. Die so entstandenen DNA-Stücke wanderten in der Gelelektrophorese im Ethidiumbromid-Agarose-Gel bis zu einer bestimmten Höhe, die Rückschlüsse auf das enthaltene Plasmid zuließen.

1,5 µg DNA wurde mit Aqua destillata (A. d.), je 0,6 µl Restriktionsendonuklease, 3 µl zu den Enzymen gehöriger Puffer gemischt und bis 30 µl mit A. d. aufgefüllt und 1-3 h bei 37°C inkubiert. Als Enzyme wurden meist Mlul/NotI verwendet. Dann wurde je 5 µl der Probe zusammen mit 20 µl λ-Marker und 7 µl 100 bp Marker in einem 1%igen Ethidiumbromid Agarose-Gel 30-45 min bei 90 mV aufgetrennt.

3 Ergebnisse

3.1 GLEPP1

3.1.1 Migrationsassays

3.1.1.1 Der Einfluss von GLEPP1-Defizienz auf die Zellmigration in Primärpodozyten

Um zu untersuchen, inwieweit *Glomerular Epithelial Protein Phosphatase 1* (GLEPP1) als podozytäres Protein die Migration von Podozyten beeinflusst, wurden Migrationsassays mit murinen Primärpodozyten durchgeführt.

Dabei wurden Wildtyp und GLEPP1 KO (*Knockout*) murine Podozyten verglichen (siehe Abb. 10). Die Zellen wurden unter oben beschriebenen Bedingungen kultiviert (siehe 2.2.3) und der Migrationsassay im Zwischenwand-Well mit jeweils gleicher Zellzahl als *wound healing assay* gestartet (siehe Abb. 10).

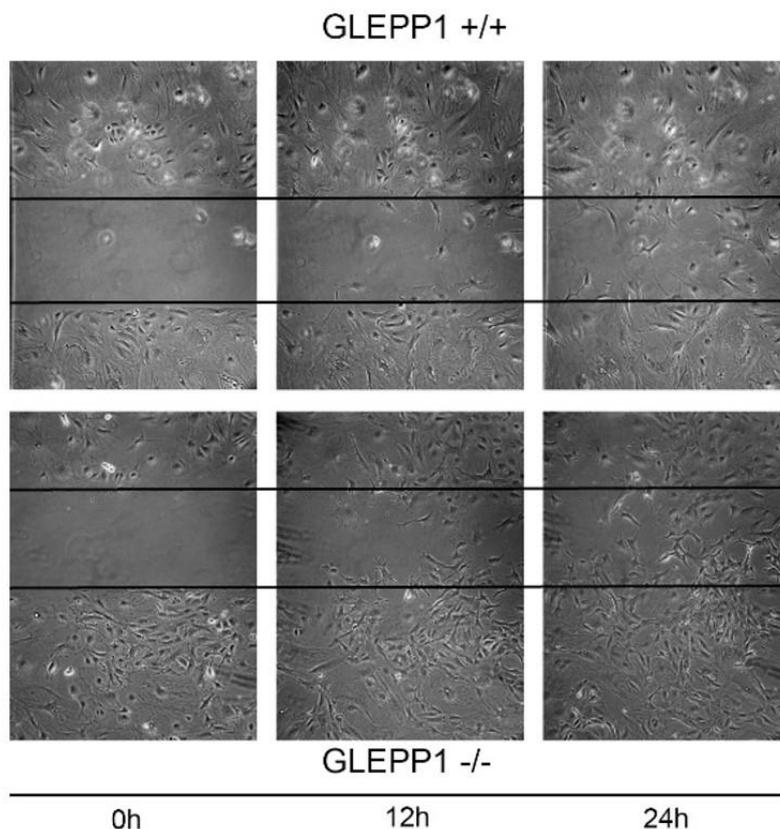


Abb. 10: Migrationsassay mit GLEPP1 Wildtyp (GLEPP1 +/+) und GLEPP1 *Knockout* (GLEPP1 -/-) murinen Primärpodozyten: Repräsentative Aufnahmen von GLEPP1 Wildtyp und GLEPP1 *Knockout*

Podozyten nach 0, 12 und 24 h. Nach 12 und 24 h sind deutlich mehr GLEPP1 *Knockout* Podozyten als Wildtyp Podozyten auf die Wundfläche zwischen den beiden Linien migriert.

Nach 12 h migrierten 21,9 ($\pm 11,9$) GLEPP1 $-/-$ Zellen im Vergleich zu 17,9 ($\pm 14,8$) GLEPP1 $+/+$ Zellen auf die freie Wundfläche, es zeigte sich noch kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 *Knockout* (KO) Zellen und GLEPP1 Wildtyp (WT) Zellen in Bezug auf Zellmigration (nicht signifikant (ns), $n=16$, Friedman Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test) (siehe Abb. 11).

Nach 24 h jedoch waren 47,8 ($\pm 23,4$) GLEPP1 $-/-$ Zellen bei 27,3 ($\pm 12,1$) GLEPP1 $+/+$ Zellen auf die Wundfläche migriert. Damit migrierten nach 24 h signifikant mehr GLEPP1 KO Zellen als GLEPP1 WT Zellen ($p \leq 0,05$, $n=16$, Friedman Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test) (siehe Abb. 11).

GLEPP1 Defizienz fördert also die Zellmigration.

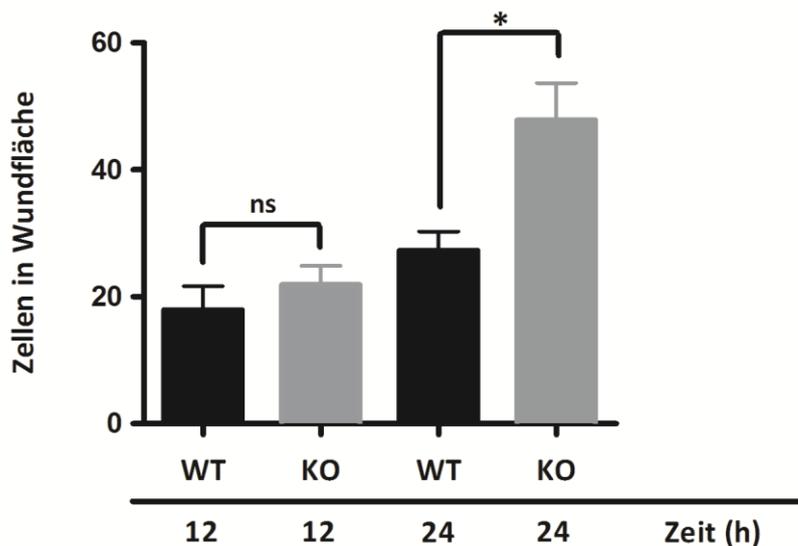


Abb. 11: Statistische Auswertung der Migration von GLEPP1 Wildtyp und GLEPP1 *Knockout* murinen Primärpodozyten nach 12 h und 24 h. Friedman Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test. Nach 12 h lag noch kein signifikanter Unterschied der in der Migration zwischen GLEPP1 KO und GLEPP1 WT Zellen vor. Nach 24 h migrierten signifikant mehr GLEPP1 KO Zellen als GLEPP1 WT Zellen ($p \leq 0,05$, $n=16$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM (*standard error of the mean*). ns=nicht-signifikant, WT=Wildtyp, KO=*Knockout*.

3.1.1.2 Der Einfluss von GLEPP1-Überexpression auf Zellmigration

Nachdem der Einfluss von GLEPP1 *Knockout* auf Migration erforscht wurde, sollte nun die Auswirkung von GLEPP1 Überexpression untersucht werden. Hierzu wurden stabil transduzierte COS-7 Zellen verwendet.

Dazu wurden Migrationsassays mit GLEPP1 überexprimierenden COS-7 Zellen und Kontrollzellen durchgeführt (siehe Abb. 12). Als Kontrolle dienten *green fluorescent protein* (GFP) überexprimierende Zellen.

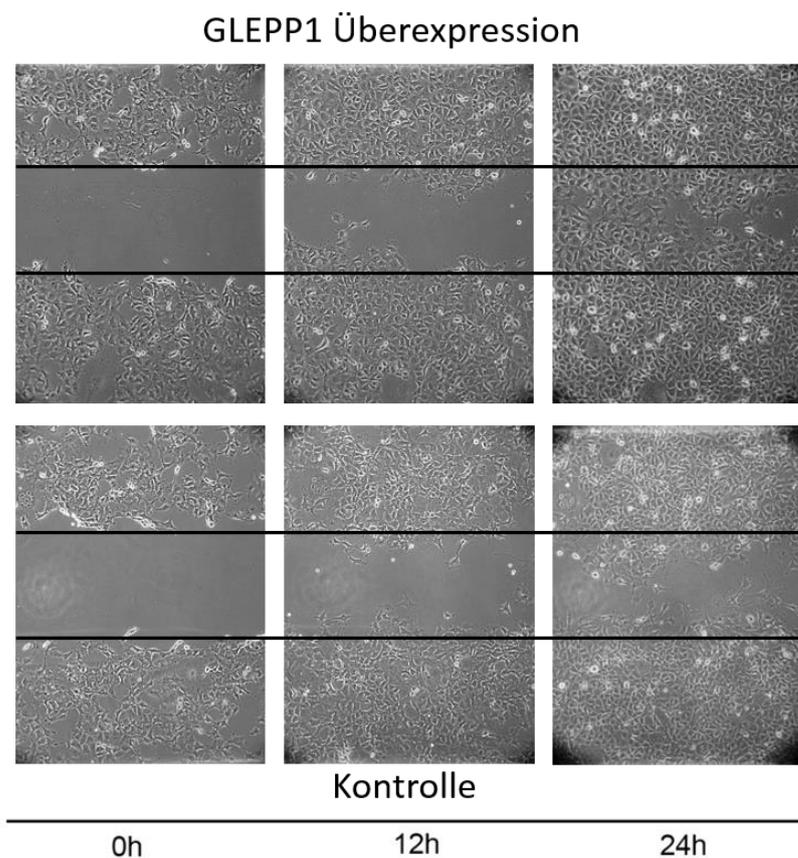


Abb. 12: Migrationsassay mit stabil transduzierten COS-7 Zellen: GLEPP1 überexprimierende Zellen vs. Kontrolle (GFP überexprimierende Zellen). Repräsentative Aufnahmen nach 0, 12 und 24 h. Nach 12 und 24 h sind deutlich mehr GLEPP1 überexprimierende Zellen als Kontrollzellen auf die Wundfläche gewandert.

Nach 12 h migrierten $50,6 (\pm 13,2)$ GLEPP1 überexprimierende Zellen im Vergleich zu $35,4 (\pm 16,0)$ Kontrollzellen auf die Wundfläche. Damit migrierten signifikant mehr GLEPP1 überexprimierende Zellen als Kontrollzellen ($p \leq 0,05$, $n=12$, Repeated Measures

One-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparisons Test (bei Normalverteilung verwendeten wir einen parametrischen Test)) (siehe Abb. 13).

Nach 24 h migrierten 187,5 ($\pm 54,4$) GLEPP1 überexprimierende Zellen auf die freie Fläche, unter den Kontrollzellen waren es nur 106,3 ($\pm 27,6$) Zellen. Es bestätigte sich damit nach 24 h signifikant die stärkere Migration bei GLEPP1 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen ($p \leq 0,01$, $n=12$, Repeated Measures One-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparisons Test). (siehe Abb. 13).

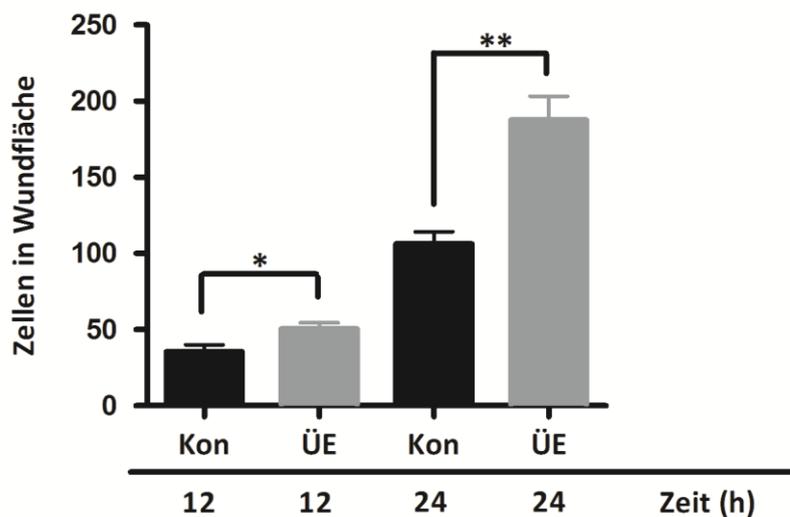


Abb. 13: Statistische Auswertung der Migration von GLEPP1 überexprimierenden Zellen und Kontrollzellen nach 12 und 24h. Repeated Measures One-way ANOVA mit Sidak's Multiple Comparisons Test. GLEPP1 überexprimierende Zellen migrierten jeweils nach 12 und 24 h signifikant mehr als Wildtyp Kontrollzellen ($n=12$; $p \leq 0,05$ nach 12 h und $p \leq 0,01$ nach 24 h). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Kon=Kontrolle, ÜE=Überexpression von GLEPP1.

GLEPP1 Überexpression fördert somit Zellmigration.

Zusammenfassend führt sowohl GLEPP1 Defizienz als auch GLEPP1 Überexpression zu vermehrter Zellmigration.

3.1.2 Immunfluoreszenzen

3.1.2.1 Lokalisation von FAK und Phospho-Tyrosin in Wildtyp Primärpodozyten

Zur Darstellung der Verteilung von *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und Phospho-Tyrosin (P-Y) innerhalb der murinen Wildtyp Primärpodozyten wurden Immunfluoreszenzen angefertigt. Einzelne Aufnahmen von Kern (DAPI), FAK und P-Y wurden im *merge*-Bild über einander gelegt (siehe Abb. 14).

Dabei zeigten sich peripher in den murinen Podozyten strichförmige Färbungen von FAK und phosphoryliertem Tyrosin im Bereich der fokalen Adhäsionen. Im *merge*-Bild kolokalisieren FAK und P-Y (siehe Abb. 14).

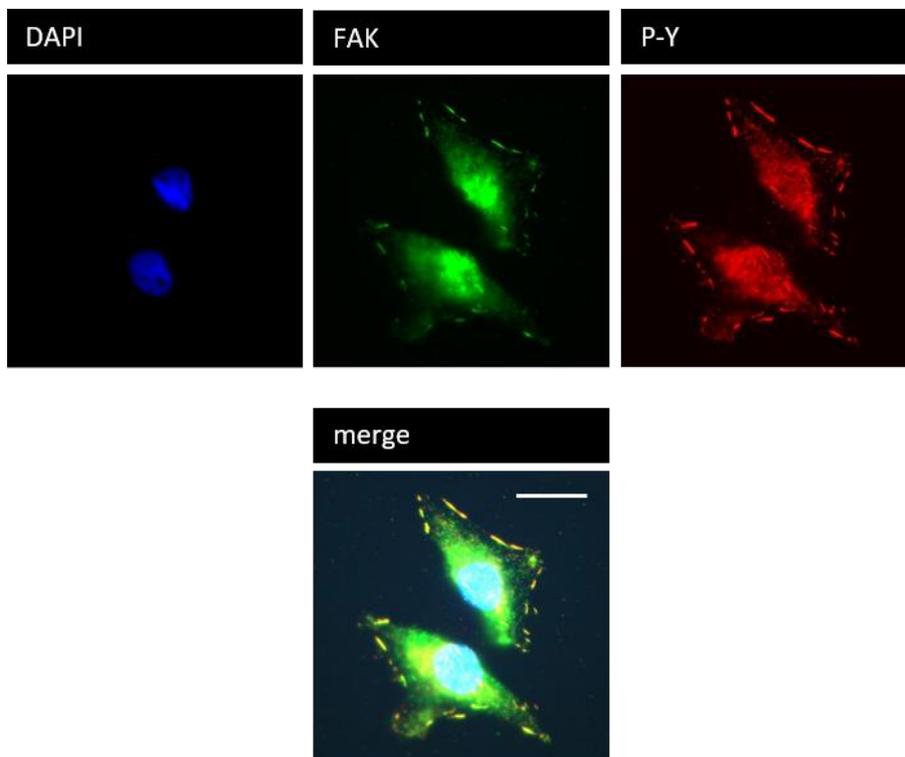


Abb. 14: Immunfluoreszenz von murinen Primärpodozyten. Repräsentative Aufnahmen von murinen Primärpodozyten mit Färbung von Kern (blau, DAPI), FAK (grün) und P-Y (rot). *Merge*-Bild aus den drei obigen Aufnahmen. FAK und P-Y kolokalisieren in Arealen, die den fokalen Adhäsionen entsprechen. 63er Objektiv. *Scale Bar* im *merge*-Bild entspricht 5 μm . DAPI=4',6-Diamidin-2-phenylindol, FAK=*Focal Adhesion Kinase*, P-Y=Phospho-Tyrosin.

3.1.2.2 Einfluss von GLEPP1 auf FAK und Phospho-Tyrosin

Um den Einfluss von GLEPP1 auf die Lokalisation, Ausbildung und Phosphorylierung von fokalen Adhäsionen zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzen mit transfizierten COS-7-Zellen gemacht. Es wurden *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und Phospho-Tyrosin (P-Y) angefärbt.

Für die Versuche wurden slg (*surface immunoglobulin*) als Kontrolle, slg GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) und slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) transfizierte Zellen verwendet. GLEPP1 WPA ist eine Substrat-fangende Mutante von GLEPP1, bei der Mutation handelt es sich um einen Aminosäurenaustausch von Asparaginsäure (normal) gegen Alanin (mutiert). Untersucht wurde die Lokalisation und Anzahl von FAK- und P-Y-positiven Arealen. Im *merge*-Bild konnte die Kolokalisation von FAK und P-Y beurteilt werden (siehe Abb. 15):

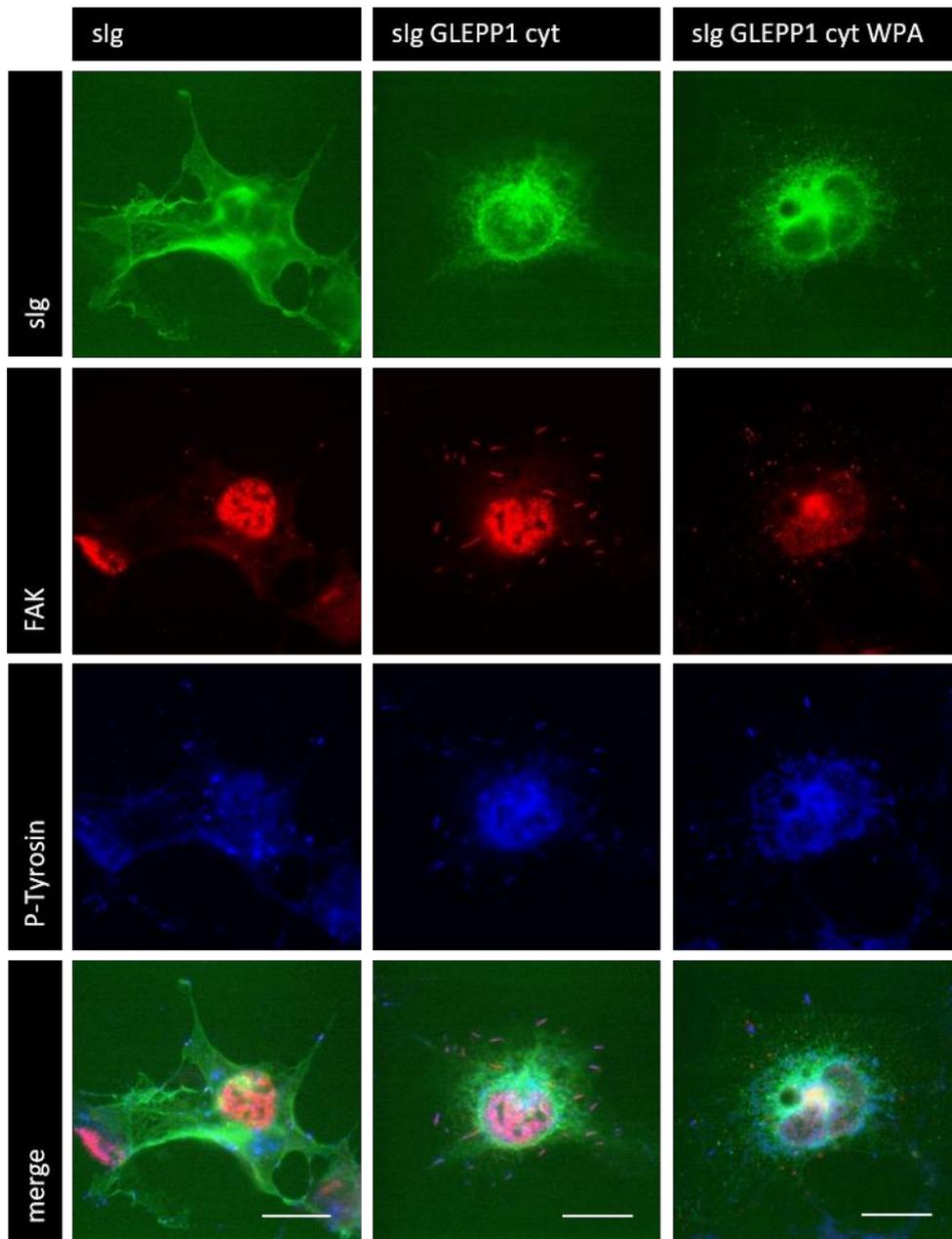


Abb. 15: Immunfluoreszenzen von slg, slg GLEPP1 cyt und slg GLEPP1 cyt WPA transfizierten COS-7 Zellen mit Färbung von slg (*surface immunoglobulin*) (grün), FAK (rot) und P-Tyrosin (blau) und *merge*-Bild aus den drei Färbungen. slg GLEPP1 cyt exprimierende Zellen haben mehr FAK- und P-Tyrosin-positive Areale als slg exprimierende Zellen (Kontrollzellen) oder slg GLEPP1 cyt WPA exprimierende Zellen. Die FAK- und P-Tyrosin-positiven Areale kolokalisieren im *merge*-Bild und formen fokale Adhäsionen. 63er Objektiv. Der *Scale Bar* in den *merge*-Bildern entspricht 5 μm . Ig=Immunoglobulin, FAK=*Focal Adhesion Kinase*, P-Y=Phospho-Tyrosin.

Bei den slg GLEPP1 cyt exprimierenden Zellen zeigte sich eine vermehrte Anzahl strichförmiger Areale von FAK und P-Y, die im *merge*-Bild kolokalisieren. Diese entsprechen den fokalen Adhäsionen.

Bei den slg und auch bei den slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen hingegen gab es deutlich weniger FAK- bzw. P-Y-positive Areale. Die Anzahl der fokalen Adhäsionen war geringer als in den GLEPP1 exprimierenden Zellen.

In der softwaregestützten Auszählung der strichförmigen P-Y-positiven Areale konnte der optische Eindruck bestätigt werden. Es zeigten sich signifikant mehr P-Y-positive Striche in den slg GLEPP1 cyt exprimierenden Zellen (17,1 (\pm 5,9) P-Y-Striche) im Vergleich zu den Kontrollzellen (11,0 (\pm 8,6) P-Y-Striche) (n=24, $p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis-Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test) (siehe Abb. 16).

In slg GLEPP1 cyt exprimierenden Zellen waren signifikant mehr P-Y-Striche (17,1 (\pm 5.9 P-Y-Striche) als bei slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen (5,9 (\pm 4,4) P-Y-Striche) (n=24, $p \leq 0,0001$, Kruskal-Wallis-Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test) (siehe Abb. 16).

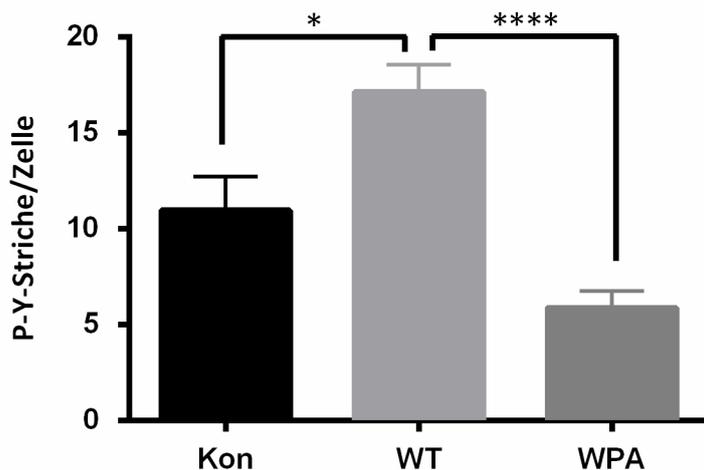


Abb. 16: Statistische Darstellung der Tyrosinphosphorylierung in fokalen Adhäsionen von slg, slg GLEPP1 cyt und slg GLEPP1 cyt WPA transfizierten Zellen. Kruskal-Wallis-Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test. slg GLEPP1 cyt WT exprimierende Zellen besitzen signifikant mehr P-Y-positive Striche und damit fokale Adhäsionen als Kontrollzellen (n=24, $p \leq 0,05$) oder slg GLEPP1 WPA exprimierende Zellen (n=24, $p \leq 0,0001$). Auszählung der strichförmigen Anhäufungen von Phospho-Tyrosin (P-Y Striche) pro Zelle mit Image J. Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. Kon=Kontrolle, WT=Wildtyp, WPA=WPA(Tryptophan-Prolin-Alanin)-Mutante.

Zusammengefasst erhöht GLEPP1 Expression die Anzahl der fokalen Adhäsionen im Vergleich zu Kontrollzellen.

3.1.3 Immunopräzipitationen

3.1.3.1 GLEPP1 steigert die Phosphorylierung von FAK an Y576/577

Um den Hintergrund der erhöhten Anzahl phosphorylierter fokaler Adhäsionen in GLEPP1 exprimierenden Zellen zu erforschen, wurde der Einfluss von GLEPP1 auf die Aktivierung von FAK untersucht.

Die Phosphorylierung von FAK an den Tyrosinen 576/577 (P-Y576/577 FAK) ist entscheidend an der FAK-Aktivierung beteiligt. Deshalb wurde der Einfluss von GLEPP1 Expression auf die Phosphorylierung an Y576/577 FAK mittels Immunopräzipitationen untersucht. Dafür wurden HEK 293T Zellen mit Expression von CD16.7 (Kontrolle), CD16.7 GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) bzw. CD16.7 GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante, der Substrat-fangenden Mutante von GLEPP1)) verglichen (siehe Abb. 17)

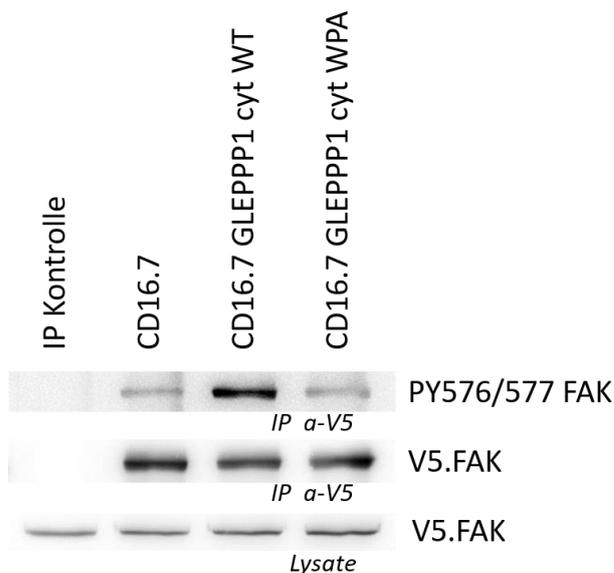


Abb. 17: Repräsentativer Western Blot von der Immunopräzipitation (IP) zur Phosphorylierung von FAK Y576/577 bei CD16.7 (Kontrolle), CD16.7 GLEPP1 cyt bzw. CD16.7 GLEPP1 cyt WPA Expression. GLEPP1 cyt WT exprimierende Zellen zeigten deutlich mehr P-Y576/577 FAK als Kontrollzellen oder GLEPP1 cyt WPA exprimierende Zellen. Durch IP von V5 mit einem V5-Antikörper und Protein G wurde FAK präzipitiert. In der Kontrolle zeigte sich keine IP. Untere und mittlere Reihe: Färbung mit α-V5. Obere Reihe: Färbung mit α-PY576/577. IP=Immunopräzipitation.

Für jede der drei transfizierten Zellgruppen wurde mittels Densitometrie der Quotient aus P-Y576/577 FAK und gesamt FAK gebildet, um die relative Phosphorylierung an Y576/577 FAK zu ermitteln. In Abb. 18 wurde die relative Phosphorylierung an Y576/577 in Bezug auf die Kontrolle dargestellt.

Die CD16.7 GLEPP1 cyt exprimierenden Zellen weisen eine signifikant um 2,85 ($\pm 1,62$) stärkere relative Phosphorylierung an Y576/577 FAK auf als die Kontrolle ($p=0,0015$, $n=6$, Kruskal-Wallis Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test) (siehe Abb. 18).

Zwischen den CD16.7 GLEPP1 cyt Zellen und den CD16.7 GLEPP1 cyt WPA Zellen (ns , $n=6$, Kruskal-Wallis Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test) zeigte sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abb. 18).

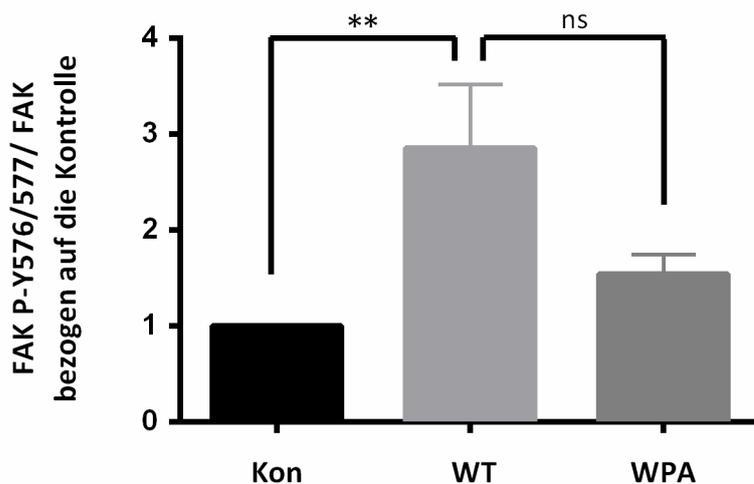


Abb. 18: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y576/577 FAK in CD16.7 GLEPP1 bzw. CD16.7 GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen in Bezug zur Kontrolle (CD16.7 exprimierende Zellen). Kruskal-Wallis Test mit One-way ANOVA und Dunn's Multiple Comparisons Test. Die relative Phosphorylierung entspricht dem Quotienten aus P-Y576/577 FAK zu gesamt FAK. GLEPP1 cyt WT exprimierende Zellen weisen eine signifikant um 2,85 ($\pm 1,62$) höhere relative Phosphorylierung von FAK an Y576/577 auf als die Kontrollzellen ($n=6$, $p= 0,0015$). Zwischen GLEPP1 cyt WT bzw. GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen besteht kein signifikanter Unterschied. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. Kon=Kontrolle, WT=Wildtyp, WPA=WPA-Mutante.

GLEPP1 fördert somit die FAK-Aktivierung durch eine erhöhte Phosphorylierung an FAK-Y576/577.

3.1.3.2 GLEPP1 beeinflusst nicht die Phosphorylierung an FAK Y397

Neben P-Y576/577 FAK hat die Phosphorylierung von FAK am Tyrosin 397 (P-Y397 FAK) als wichtigste Autophosphorylierungsstelle großen Einfluss auf die FAK-Aktivierung. Infolgedessen wurde ebenfalls der Einfluss von GLEPP1 auf die Phosphorylierung an Y397 FAK untersucht. Dies geschah mittels Immunopräzipitation mit slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) und slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) exprimierenden Zellen (siehe Abb. 19).

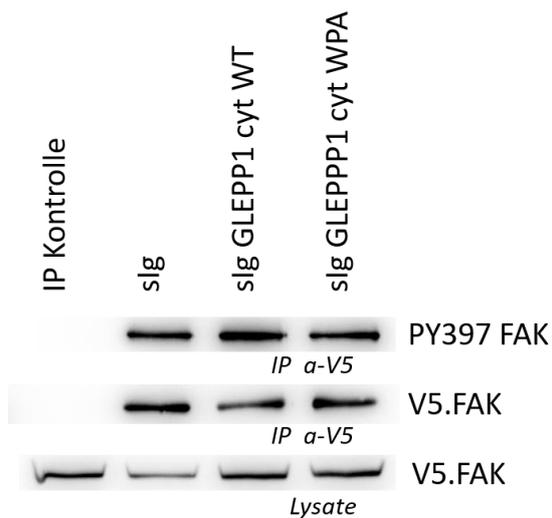


Abb. 19: Repräsentativer Western Blot zur Phosphorylierung von Y397 FAK in slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) bzw. slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) exprimierenden Zellen. Es ist kein Unterschied ersichtlich bezüglich der Phosphorylierung von Y397 FAK bei GLEPP1 oder GLEPP1 WPA Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. In der IP wurde mit V5-Antikörper und Protein G an V5.FAK-Molekülen gezogen. IP-Kontrolle ohne a-V5. Untere und mittlere Reihe: Färbung mit a-V5. Obere Reihe: Färbung mit a-PY397 FAK. IP=Immunopräzipitation.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede bezüglich der relativen Phosphorylierung von Y397 FAK zwischen slg, slg GLEPP1 cyt (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) und slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) exprimierenden Zellen (ns, n=6, Kruskal-Wallis-Test mit One-Way ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test) (siehe Abb. 20).

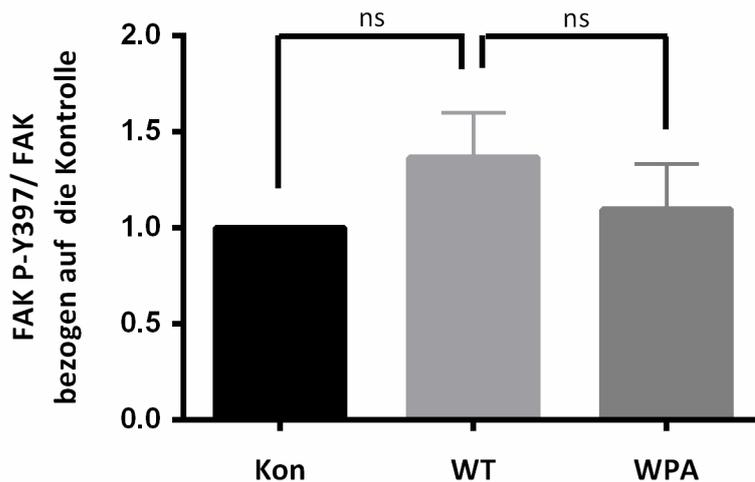


Abb. 20: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y397 FAK in slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen in Bezug zur Kontrolle (slg exprimierende Zellen). Kruskal-Wallis-Test mit One-Way ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test. Die relative Phosphorylierung entspricht dem Quotienten aus PY397 FAK zu gesamt FAK. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 bzw. GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen bezüglich der relativen Phosphorylierung an Y397 FAK (ns, n=6). Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. ns=nicht signifikant, Kon=Kontrolle, WT=Wildtyp, WPA= WPA-Mutante.

GLEPP1 hat also keine Wirkung auf die Aktivierung von FAK über Phosphorylierung an P-Y397 FAK.

3.1.3.3 GLEPP1 beeinflusst nicht die Phosphorylierung an Paxillin Y31

Neben FAK kommt Paxillin bei der Formation fokaler Adhäsionen zentrale Bedeutung zu. Entscheidend für die Funktion von Paxillin ist die Phosphorylierung am Tyrosin 31 (P-Y31 Paxillin). Wie sich GLEPP1 auf die Phosphorylierung von Y31 Paxillin auswirkt, wurde mit Immunopräzipitationen mit slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt

(cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1) und slg GLEPP1 cyt WPA (cytoplasmatischer Anteil von GLEPP1 WPA Mutante) exprimierenden Zellen erforscht (siehe Abb. 21).

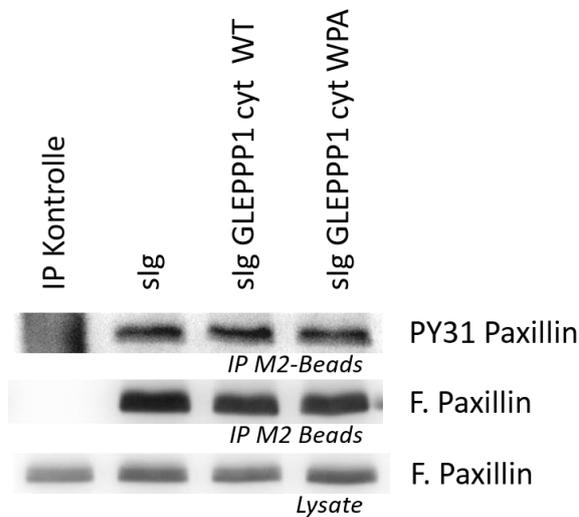


Abb. 21: Repräsentativer Western Blot zur Phosphorylierung von Y31 Paxillin in slg (Kontrolle), slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA überexprimierenden Zellen. Es ist kein Unterschied ersichtlich bezüglich der Phosphorylierung von Y31 Paxillin bei GLEPP1 oder GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen. In der IP wurde mit M2-Beads an F. Paxillin gezogen. IP-Kontrolle mit Protein G. Untere und mittlere Reihe: Färbung mit α -M2. Obere Reihe: Färbung mit α -P-Y31 Paxillin. IP= Immunopräzipitation; F.= *Flag*.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (n=3, Kruskal-Wallis-Test mit One-Way ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test (siehe Abb. 22).

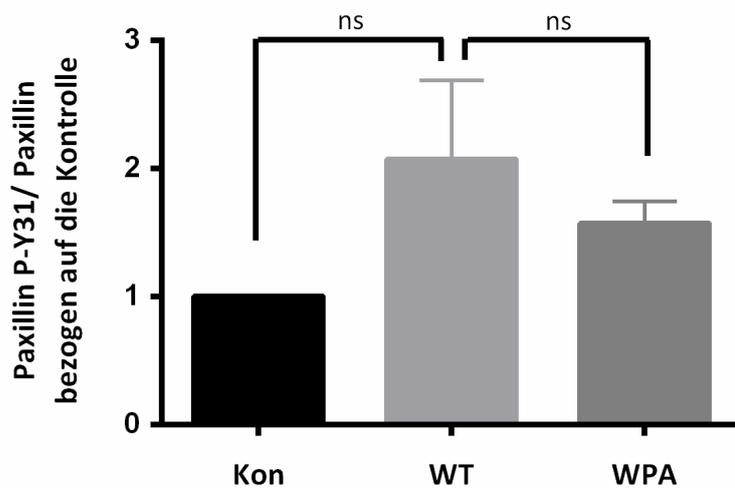


Abb. 22: Statistische Auswertung der relativen Phosphorylierung von Y31 Paxillin in slg GLEPP1 cyt bzw. slg GLEPP1 cyt WPA exprimierenden Zellen im Vergleich zu slg exprimierenden Zellen (Kontrolle). Kruskal-Wallis-Test mit One-Way ANOVA und Dunn's Multiple Comparison Test. Die relative Phosphorylierung entspricht dem Quotienten aus PY31 Paxillin zu gesamt Paxillin. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen GLEPP1 bzw. GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen und den Kontrollzellen bezüglich der relativen Phosphorylierung an Y31 Paxillin (ns, n=3). Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. ns=nicht signifikant, Kon=Kontrolle, WT=Wildtyp, WPA= WPA-Mutante.

Zusammenfassend fördert GLEPP1 Expression signifikant eine FAK-Aktivierung über Phosphorylierung an FAK-Y576/577; in Bezug auf die Phosphorylierung von FAK-Y397 und Paxillin-Y31 konnte kein signifikanter Unterschied bei GLEPP1 Expression nachgewiesen werden.

3.2 Protein 4.10

3.2.1 Der Einfluss von Protein 4.10 Expression auf die Zellmigration in humanen Podozyten

Um den Einfluss von Protein 4.10 auf die Migration von Podozyten zu untersuchen, wurden Migrationsassays mit stabil transduzierten humanen Podozyten durchgeführt (siehe Abb. 23).

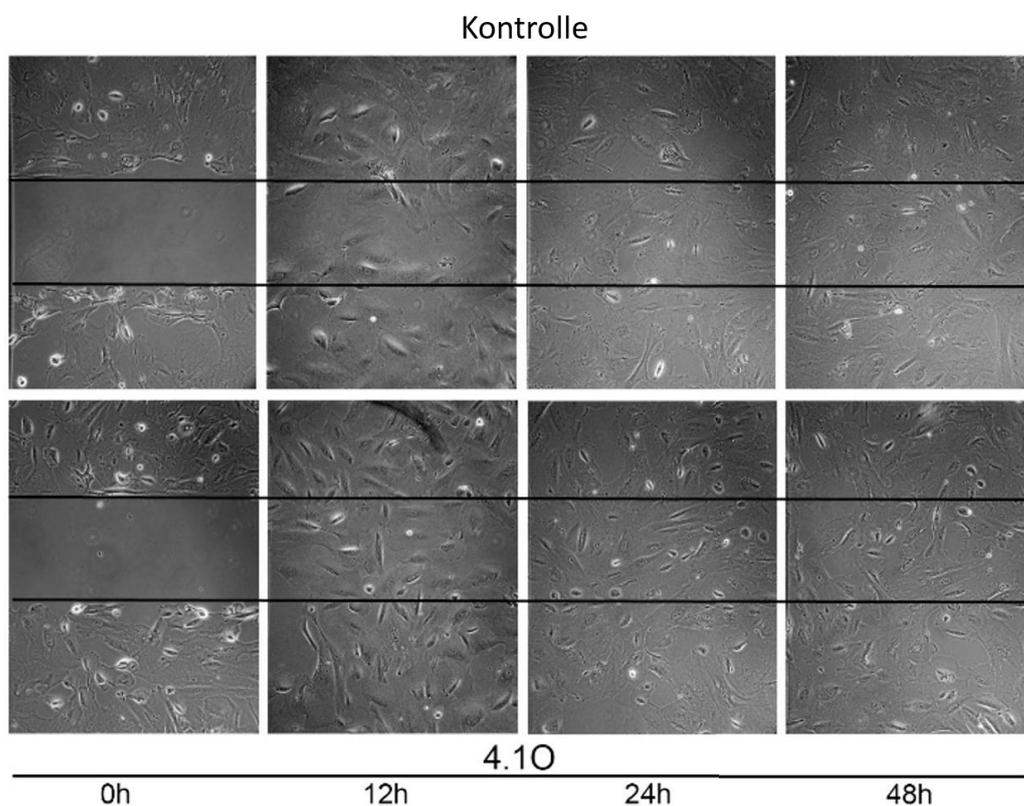


Abb. 23: Repräsentativer Migrationsassay mit stabil transduzierten humanen Podozyten: 4.10 vs. Kontrolle (GFP). Fotografien nach 0, 12, 24 und 48 h. Nach 12, 24 und 48 h sind deutlich mehr 4.10 exprimierende Zellen als Kontrollzellen auf die Wundfläche gewandert.

Die Zellen wurden nach oben beschriebenen Bedingungen kultiviert (siehe 2.2.4), in je gleicher Anzahl im Zwischenwand-Well ausgesät und der Migrationsassay erst nach

Ausdifferenzierung der humanen Podozyten gestartet. Je nach 12, 24 und 48 h wurden die Zellen ausgezählt.

Nach 12 h migrierten 19,3 ($\pm 1,6$) 4.1O exprimierende Zellen auf die Wundfläche vs. 13,4 ($\pm 1,2$) Kontrollzellen ($p=0,0058$, $n=14$, Two-tailed T-Test). Nach 24 h waren 26,4 ($\pm 1,9$) 4.1O exprimierende Zellen auf die freie Fläche migriert, von den Kontrollzellen waren es 20,6 ($\pm 1,3$) Zellen ($p=0,0197$, $n=14$, Two-tailed T-Test). Nach 48 h migrierten 30,6 ($\pm 1,7$) 4.1O exprimierende Zellen auf die Wundfläche bei 23,4 ($\pm 0,9$) Kontrollzellen ($p=0,0015$, $n=14$, Two-tailed T-Test) (siehe Abb. 24).

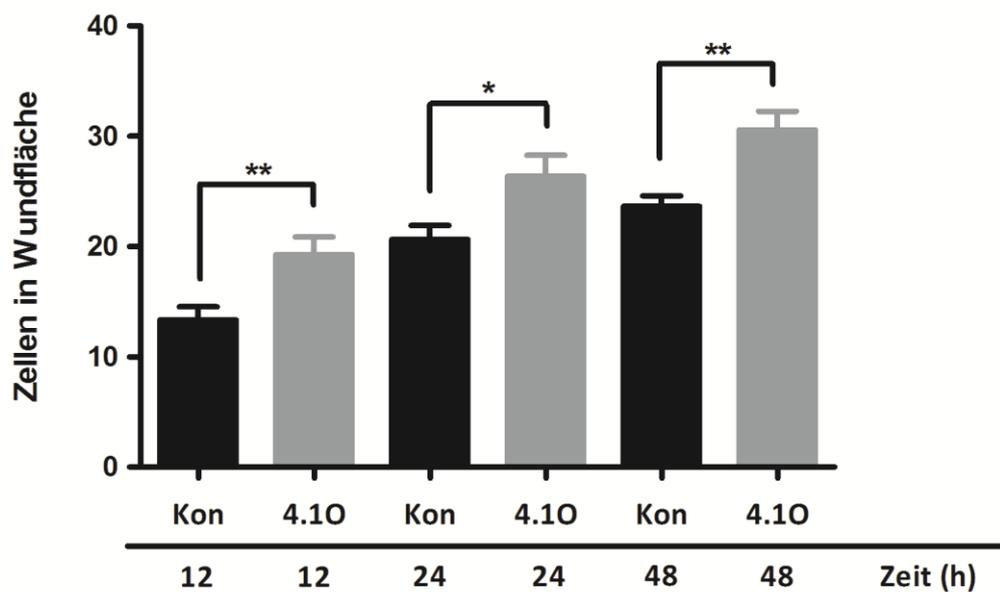


Abb. 24: Statistische Auswertung der Migration von stabil transduzierten humanen Podozyten: 4.1O vs. Kontrolle mit GFP. Two-tailed T-Test. Nach 12 h migrierten signifikant mehr Zellen mit 4.1O Expression als Kontrollzellen ($p=0,0058$, $n=14$), ebenso nach 24h ($p=0,0197$, $n=14$) und nach 48h ($p=0,0015$, $n=14$). Darstellung der Daten als Mittelwerte \pm SEM. ns=nicht-signifikant, WT=Wildtyp, Kon=Kontrolle.

4.1O Expression fördert somit signifikant die Zellmigration.

4 Diskussion

Vor wenigen Jahren gab es zwei genetische Untersuchungen, die zeigten, dass Mutationen podozytärer Proteine (GLEPP1 und Protein 4.1O) zu proteinurischen Erkrankungen führen bzw. prädisponieren. Beide Proteine stehen in Zusammenhang mit dem Zytoskelett des Podozyten. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von GLEPP1 und Protein 4.1O auf Zellmigration zu untersuchen und im Fall von GLEPP1 die intrazelluläre Signalkaskade zu verfolgen.

Folgende Ergebnisse konnten gezeigt werden:

- Sowohl GLEPP1 Defizienz als auch GLEPP1 Überexpression fördert Zellmigration
- GLEPP1 Expression fördert die Ausbildung von fokalen Adhäsionen mit FAK und Tyrosinphosphorylierung
- GLEPP1 Expression stimuliert Phosphorylierung an FAK-Y576/577
- 4.1O Expression fördert Zellmigration

In genetischen Analysen wurden Genmutationen bzw. Kandidatengene identifiziert, die für Proteinen kodieren, die mit dem podozytären Zytoskelett assoziiert sind (Wharram, Goyal et al. 2000). Zu dieser Gruppe gehört GLEPP1 als Protein Tyrosinphosphatase an der apikalen Zellmembran des Podozyten und ebenso 4.1O, ein Adapterprotein zur Verankerung von Aktinfilamenten (Thomas, Wharram et al. 1994, Hoover and Bryant 2000). Defekte Proteine, die für das podozytäre Zytoskelett und die Zellform verantwortlich sind, insbesondere in den Fußfortsätzen, führen zu bedeutenden Veränderungen der Struktur und Funktion des glomerulären Filters (Wharram, Goyal et al. 2000). Das Ergebnis dieser Veränderungen ist eine erhöhte Durchlässigkeit des glomerulären Filters, die sich im äußersten Fall als nephrotisches Syndrom mit Proteinverlust in den Urin äußert (Wharram, Goyal et al. 2000). Eine gestörte GLEPP1 Expression kann Ursache für das idiopathische nephrotische Syndrom sein; eine fehlerhafte 4.1O Expression kann für diabetische Nephropathie anfällig machen. Sowohl das idiopathische nephrotische Syndrom als auch die diabetische Nephropathie führen häufig zu einer terminalen Niereninsuffizienz (Krolewski, Eggers et al. 1996, Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Funktion der beiden podozytären Proteine GLEPP1 und Protein 4.1O für das Zytoskelett und die Zellmigration zu erforschen.

GLEPP1 und Proteinurie

Der Ausgangspunkt war, dass bei der Untersuchung von Familien mit autosomal rezessivem nephrotischem Syndrom zwei kosanguine Familien mit Basenaustauschmutationen im GLEPP1 kodierenden PTPRO-Gen auffielen (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Bei den betroffenen Familien war die fehlerhafte bzw. fehlende Expression von GLEPP1 mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) und *Minimal Change Disease* (MCD) assoziiert (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

In Familie A waren beide Kinder an Steroid resistentem Nephrotischem Syndrom (SRNS) erkrankt, mit 9 bzw. 5 Jahren (bei histologischer Untersuchung: MCD); in Familie B waren drei der vier Kinder erkrankt, mit 14, 11 (bei histologischer Untersuchung: FSGS) bzw. 9 Jahren. Das älteste Geschwisterkind in Familie B zeigte den ausgeprägtesten Verlauf ohne Remission nach Cyclophosphamid-, Methylprednisolonpuls- und Cyclosporin A-Therapie. Die renale Funktion der Patientin verschlechterte sich zunehmend, sie entwickelte sie eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz. Mit 18 Jahren erhielt sie eine Lebendnierentransplantation und blieb zum Ende des Beobachtungszeitraumes rezidivfrei (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011).

Wharram et al. untersuchten zunächst den spontanen Phänotyp von GLEPP1 Defizienz in 4-6 Wochen alten C57BL/6 Mäusen; sie führte nicht zu embryonaler oder neonataler Letalität (Wharram, Goyal et al. 2000). Niere und Glomerulum waren auf lichtmikroskopischer Ebene normal (Wharram, Goyal et al. 2000).

Auf *scanning and transmission electron microscopy* Level jedoch zeigten die Podozyten der GLEPP1 ^{-/-} Mäuse Auffälligkeiten im Bereich des Zytoskeletts: die Breite der Schlitzmembran war nicht verändert, aber die GLEPP1 ^{-/-} Podozyten hatten kürzere und breitere Fußfortsätze als die normalen fingerartigen Fußfortsätze in Wildtyp-Podozyten (Wharram, Goyal et al. 2000). Insgesamt erhielten die Podozyten der GLEPP1 ^{-/-} Mäuse eine mehr amöboide Form, während Wildtyp-Podozyten octopoid aussehen (Wharram, Goyal et al. 2000). Zusätzlich zeigte sich eine aberrante

Verteilung des Intermediärfilamentproteins Vimentin (Wharram, Goyal et al. 2000). GLEPP1 Defizienz führt also *in vivo* zu Veränderungen des spezifischen Zytoskeletts des Podozyten.

Durch die strukturellen Veränderungen der podozytären Fußfortsätze bei den GLEPP1 -/- Mäusen kam es zu einer Reduktion der Filtrationsfläche von ca. 25 % und entsprechend zu einem reduzierten glomerulären Nephriengehalt (Wharram, Goyal et al. 2000). Im Schädigungsmodell hatten die GLEPP1 -/- Mäuse nach Uninephrektomie eine um 25-50 % geringere glomeruläre Filtrationsrate im Vergleich zu Wildtyp Mäusen und eine Tendenz zur Hypertension (Wharram, Goyal et al. 2000). Wharram et al. detektierten interessanterweise allerdings keinen Anstieg der Urin-Albuminexkretion bei den 4-6 Wochen alten C57BL/6 GLEPP1 -/- Mäusen (Wharram, Goyal et al. 2000).

Die renale Funktion kann jedoch vom genetischem Hintergrund der Versuchstiere abhängig sein. Die von Wharram et al untersuchten C57BL/6 Mäuse sind häufig resistent gegenüber Proteinurie (Ishola, van der Giezen et al. 2006). Zusätzlich dazu interessierten wir uns für einen Untersuchungszeitpunkt in mittlerem adulten Alter der Mäuse. Aus diesen beiden Gründen entschieden wir uns für eine erneute Studie zur Proteinurie bei GLEPP1 -/- Mäusen: in unserem Fall mit 6 und 10 Monate alten 129P3J Mäusen statt den bei Wharram et al. verwendeten 4-6 Wochen alten C57BL/6 Mäusen. Laura Lennartz und Christian Weigel aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten 6 und 10 Monate alte 129P3J GLEPP1 -/- Mäuse und entdeckten bei ihnen tatsächlich eine Proteinurie.

Bei anderem genetischen Hintergrund (129P3J statt C57BL/6) und höherem Alter (6 und 10 Monate statt 4-6 Wochen) konnte somit entgegen der Ergebnisse von Wharram et al. eine Proteinurie bei GLEPP1 -/- Mäusen nachgewiesen werden.

GLEPP1 scheint nicht die interzelluläre Junktion zwischen den Fußfortsätzen direkt zu beeinflussen, sondern die Morphologie der podozytären Fußfortsätze zu koordinieren, wahrscheinlich durch Regulation der zytoskelettalen Architektur (Wharram, Goyal et al. 2000).

Die Auslöschung der Fußfortsätze und der somit veränderte Podozytenphänotyp bei einem Patienten mit GLEPP1 Mutation ähnelt den Anomalien in GLEPP1 -/- Mäusen (Wharram, Goyal et al. 2000, Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Der pathologische Phänotyp ist beim Menschen jedoch viel ausgeprägter als bei der Maus: Während die Fußfortsätze bei der GLEPP1 -/- Maus verkürzt und verbreitert sind (Wharram, Goyal et al. 2000), zeigt sich bei Menschen mit GLEPP1 Mutation eine generalisierte Fusion der Fußfortsätze und eine über weite Strecken ausgedünnte glomeruläre Basalmembran (Ozaltin, Ibsirlioglu et al. 2011). Dazu tritt die Erkrankung beim Menschen früher (Kindesalter) als bei der Maus (adultes Alter) auf. Die Ursache für den früheren Erkrankungsbeginn und die ausgeprägtere Histopathologie beim Menschen könnte sein, dass der Mensch den GLEPP1 Mangel weniger gut durch andere Phosphatasen kompensieren kann.

Auf molekularbiologischer Ebene wiesen Charba et al. in isolierten Glomeruli aus gesunden Kaninchen und Ratten nach, dass Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne von GLEPP1, darunter ein Phosphatasehemmer, zu einer Erhöhung der glomerulären Albuminpermeabilität führen (Charba, Wiggins et al. 2009). Der von Charba et al. registrierte Anstieg der Albuminpermeabilität in isolierten Glomeruli nach Anti-GLEPP1-Inkubation stimmt mit unserem Ergebnis der Proteinurie bei 6 bzw. 10 Monate alten 129P3J GLEPP1 -/- Mäusen überein.

Der These einer Proteinurie infolge von GLEPP1 Defizienz entspricht die in dieser Arbeit festgestellte erhöhte Zellmigration bei GLEPP1 -/- murinen Primärpodozyten. Zum einen könnte die vermehrte Zellmotilität bei GLEPP1 Defizienz zu einer gestörten Fußfortsatzarchitektur führen. Zum anderen könnte Hypermotilität bei GLEPP1 Defizienz in einer Ablösung von Podozyten münden. Beides könnte für eine erhöhte Durchlässigkeit des glomerulären Filters mit Proteinurie bei GLEPP1 Defizienz verantwortlich sein.

Unklar ist bisher die ebenfalls in dieser Arbeit ermittelte gesteigerte Zellmigration bei GLEPP1 Überexpression. Eine Möglichkeit wäre, dass sowohl ein GLEPP1 Mangel als

auch ein GLEPP1 Überschuss zu verstärkter Zellmigration und einhergehender Proteinurie führen. Dies wäre dann ähnlich wie bei α -Actinin 4, einem anderen podozytären zytoskelettalen Protein – sowohl der *Knockout* als auch die Überexpression in Mäusen führen zur Retraktion der Fußfortsätze und Proteinurie (Kos, Le et al. 2003, Michaud, Lemieux et al. 2003, Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Möglicherweise ist also eine balancierte GLEPP1 Expression notwendig.

Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass erhöhte Motilität gewissermaßen auch protektiv sein kann und GLEPP1 seine nephroprotektive Wirkung auch durch Stimulation von Zellmigration entwickelt. Eine Folge von podozytärer Motilität ist die Reinigung des subpodozytären Raumes zwischen Podozytenunterseite und der glomerulären Basalmembran, was für die Filtrierleistung wichtig ist.

Ohne Zweifel ist das Modell mit den GLEPP1 defizienten murinen Primärpodozyten tragfähiger als System der Überexpression in COS-7 Zellen: Möglicherweise lassen sich die Migrationseigenschaften von COS-7 Zellen nicht auf die von Podozyten übertragen. Außerdem ist das System der Überexpression artifizierter als der *Knockout*. Somit ist dem Ergebnis der gesteigerten Zellmigration bei GLEPP1 Defizienz mehr Bedeutung zuzuschreiben als dem der Hypermotilität bei Überexpression von GLEPP1.

In BAC1.2F5 (*colony stimulating factor (CSF)-1* bzw. *granulocyte-macrophage-CSF* abhängige murine) Makrophagen löst Defizienz und Überexpression von GLEPP1 gegenteilige Effekte aus; GLEPP1 Defizienz bei Makrophagen senkt entgegen der Ergebnisse mit murinen Primärpodozyten die Zellmotilität; GLEPP1 Überexpression bei Makrophagen steigert in Einklang mit den Ergebnissen mit COS-7 Zellen die Motilität (Gobert, van den Eijnden et al. 2009).

Wei et al. finden, dass sich gesteigerte Motilität von *in vitro* Podozyten in die Dynamik der Fußfortsätze *in vivo* übertragen lässt und veränderte Fußfortsatzdynamik in Auslöschung der Fußfortsätze und Proteinurie münden kann (Wei, Moller et al. 2008).

GLEPP1 ist eine membranständige Tyrosinphosphatase an der apikalen Zellmembran des Podozyten – fokale Adhäsionen liegen an der basalen Zellseite des Podozyten an der GBM. Trotz dieser unterschiedlichen Lokalisationen scheint GLEPP1 jedoch

Zellmigration und damit den Turnover von fokalen Adhäsionen zu beeinflussen. Konkordant dazu lokalisierten Kerjaschki und Wiggins GLEPP1 im *Immunogold Labeling* überwiegend apikal in der podozytären Membran, aber auch in der Nähe der Schlitzmembran (persönlich kommuniziert).

Diese Arbeit zeigt, dass die GLEPP1 exprimierenden COS-7 Zellen signifikant mehr fokale Adhäsionen mit *Focal Adhesion Kinase* (FAK) und Tyrosinphosphorylierung aufweisen als die Kontrollzellen oder die GLEPP1 WPA exprimierenden Zellen. Expression von GLEPP1 scheint also direkte Auswirkung auf die Rekrutierung und Aktivierung von FAK in fokalen Adhäsionen zu haben und die Tyrosinphosphorylierung in den fokalen Adhäsionen zu steigern. Dabei ist die katalytische Funktion von GLEPP1 als Phosphatase entscheidend, denn Expression einer Substrat-fangenden Mutante von GLEPP1, GLEPP1 WPA, führt im Vergleich zu weniger FAK und Tyrosinphosphorylierung in fokalen Adhäsionen.

FAK ist ein Schlüsselregulator der directionalen Zellmigration (Tomar and Schlaepfer 2009). Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von FAK wird mit Ausnahme von der Haupt-Autophosphorylierungsstelle FAK-Y397 über die Kinase Src vermittelt. (Calalb, Polte et al. 1995). Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Src wiederum über Dephosphorylierung durch GLEPP1 aktiviert wird: Dephosphorylierung an Src-Y527 durch GLEPP1 führt zu Autophosphorylierung an Src-Y416 und somit zu maximaler Aktivierung von Src.

So ergab sich folgende Hypothese: GLEPP1 scheint über Dephosphorylierung und Aktivierung von Src und konsekutive Phosphorylierung und Aktivierung von FAK auf den Prozess der Zellmigration Einfluss zu nehmen.

FAK -/- Fibroblasten-ähnlichen Zellen zeigen eine reduzierte Zellmotilität mit nahezu halbiertes Durchschnittsgeschwindigkeit, bedingt durch einen fehlenden Turnover von fokalen Adhäsionen (Ilic, Furuta et al. 1995). FAK reguliert also den Umsatz und Abbau der fokalen Adhäsionen (Tomar and Schlaepfer 2009).

Die vorliegende Arbeit weist auf eine mögliche indirekte Aktivierung von FAK in den fokalen Adhäsionen durch GLEPP1 hin: die Aktivität der FAK korreliert

bekanntermaßen direkt mit ihrem Phosphorylierungsstatus und in den Immunfluoreszenzen dieser Arbeit wurde im Vergleich zu der Kontrolle und der GLEPP1 WPA Expression bei GLEPP1 Wildtyp Expression mehr FAK und Tyrosinphosphorylierung lokalisiert in fokalen Adhäsionen dargestellt.

Im Widerspruch zur Theorie einer nephroprotektiven Wirkung von GLEPP1 über Aktivierung von FAK steht folgende Studie von Togowa et al.: Im Mausmodell der transienten Proteinurie führte Lipopolysaccharid (LPS)-induzierte *glomerular injury* zur Aktivierung von podozytärem FAK, gefolgt von der Auslöschung der Fußfortsätze und Proteinurie (Ma, Togawa et al. 2010). Sowohl Podozyten-spezifische Deletion von FAK als auch pharmakologische Inaktivierung von FAK hoben die Auslöschung der Fußfortsätze und die Proteinurie auf (Ma, Togawa et al. 2010). Die Wildtyp Podozyten wiesen nach LPS-Stimulation eine Steigerung der Zellmigration auf, während Podozyten ohne FAK-Expression eine signifikante Abnahme der Migration im *wound-healing assay* zeigten (Ma, Togawa et al. 2010). In der genannten Studie konnte der durch die FAK-Aktivierung erhöhte Umsatz von fokalen Adhäsionen mit gesteigerter Zellmigration somit für die Fußfortsatzauslöschung und Proteinurie verantwortlich sein (Ma, Togawa et al. 2010).

Fehlen von GLEPP1 löst klinisch bewiesen ein nephrotisches Syndrom aus, daher muss GLEPP1 in einer Form nephroprotektiv sein. Diese Arbeit zeigt erstens, dass GLEPP1 *Knockout* Podozyten einen promigratorischen Phänotyp aufweisen - Hypermotilität des Podozyten kann zu einer Proteinurie führen.

Zweitens wurde nachgewiesen, dass GLEPP1 intrazellulär eine vermehrte Aktivierung von FAK im Bereich fokaler Adhäsionen bewirkt und die Phosphorylierung an FAK-Y576/577 stimuliert. GLEPP1 Expression hat aber scheinbar keinen Einfluss auf Phosphorylierung an FAK-Y397 oder Paxillin-Y31.

FAK-Y576/577 liegen in der *kinase activation loop* von FAK (Mitra, Hanson et al. 2005). FAK-Y576 ist eine Hauptphosphorylierungsstelle von FAK *in vivo*, FAK-Y577 ist eine zusätzliche Phosphorylierungsstelle *in vivo* (Calalb, Polte et al. 1995). Die Phosphorylierung und damit Aktivierung von FAK ist signifikant in Gegenwart der

Kinase Src erhöht (*c-Src in vitro* und *v-Src in vivo*) (Calalb, Polte et al. 1995). Src-vermittelte Trans-Phosphorylierung von FAK-Y576/577 führt zu maximaler katalytischer Aktivierung von FAK (Mitra, Hanson et al. 2005).

In den Immunopräzipitationen dieser Arbeit bestätigt sich die Hypothese, dass GLEPP1 - vermutlich über die Dephosphorylierung und konsekutive Aktivierung der Kinase Src - die Phosphorylierung an FAK-576/577 und somit Aktivierung von FAK fördert.

FAK-Src Signale fördern Turnover von Adhäsionen und somit Zellmigration (Webb, Donais et al. 2004).

FAK-Y397 ist die Haupt-Autophosphorylierungsstelle in FAK (Schaller, Hildebrand et al. 1994). Autophosphorylierung an FAK-Y397 wird durch extrazelluläre Ligandenbindung und anschließendes Integrin-Clustering induziert (Calalb, Polte et al. 1995).

Zugleich ist phosphoryliertes FAK-Y397 Bindungsstelle für *Src-homology 2* (SH2)-haltige Proteine, wie z. B. Src (Schaller, Hildebrand et al. 1994). Phosphorylierung an FAK-Y397 ermöglicht Src somit, an FAK zu binden (Webb, Donais et al. 2004), es bildet sich der FAK-Src-Komplex. Dadurch wird die Src-vermittelte Phosphorylierung von FAK unter anderem an FAK-Y576/577 erleichtert, mit dem Ergebnis kompletter FAK-Aktivierung (Tomar and Schlaepfer 2009).

In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Einfluss von GLEPP1 auf die Phosphorylierung von FAK-Y397 bei GLEPP1 Expression festgestellt werden. Anders als P-Y576/577 FAK scheint somit die Phosphorylierung von Y397 FAK unabhängig von GLEPP1 mutmaßlich über Integrin-vermittelte Autophosphorylierung abzulaufen.

GLEPP1 ist eine Kandidaten Proteintyrosinphosphatase für Paxillin (Schaller 2001). In BAC1.2F5 Makrophagen mit GLEPP1 Expression ist die Paxillin Tyrosinphosphorylierung signifikant vermindert (Pixley, Lee et al. 2001). Dort reguliert GLEPP1 die Bildung fokaler Adhäsionen durch Dephosphorylierung von Paxillin in den hintersten Bereichen der Zelle (*dorsal ruffles*), dadurch reduziert sich die Menge von phosphoryliertem Paxillin, die für den Einbau in fokale Komplexe zur Verfügung stehen (Pixley, Lee et al. 2001).

Paxillin-Y31 und -Y118 Phosphorylierung wird stimuliert durch Zelladhäsion und Wachstumsfaktoren (Brown and Turner 2004). Die Hauptkonsequenz von Paxillin Phosphorylierung ist die Generation funktioneller SH2-Bindedomänen, welche als induzierbare, regulierbare Proteinbindedomänen arbeiten (Brown and Turner 2004). PY31 Paxillin bindet das Adapterprotein Crk, die Src inaktivierende Tyrosinkinase Csk und die p85 Untereinheit von PI3K (Phosphatidylinositoltriphosphat Kinase) und kann so Migration stimulieren (Petit, Boyer et al. 2000, Brown and Turner 2004).

In dieser Arbeit konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Phosphorylierung an Paxillin-Y31 bei GLEPP1 Expression in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden.

Protein 4.1O und Proteinurie

Auf der Suche nach Kandidatengenen für diabetische Nephropathie bei Typ 1 Diabetes, stellte man im Rahmen eines genomweiten Scans 2009 eine Assoziation mit dem FRMD3 (*4.1 protein ezrin, radixin, moesin domain containing 3*) Locus fest (Pezzolesi, Poznik et al. 2009). Das Risiko, eine diabetische Nephropathie zu entwickeln, war für einen kaukasischen Typ 1 Diabetiker mit einem *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) auf Chromosom 9q bei dem FRMD3 Gen um 1,45 erhöht (Odds Ratio=1,45) (Pezzolesi, Poznik et al. 2009). Der genaue Locus war das FRMD3 Gen auf Chromosom 9q.21.32 (Pezzolesi, Poznik et al. 2009, Buffon, Sortica et al. 2015). In der Metaanalyse mit europäischen Typ 1 Diabetikern von Mooyaart et. al. wurde der gleiche SNP (rs1888747) ebenfalls mit diabetischer Nephropathie assoziiert (Mooyaart, Valk et al. 2011).

Williams et al. konnten 2011 wiederum keine Assoziation zwischen FRMD3 Polymorphismen und diabetischer Nephropathie bei Typ 1 Diabetikern feststellen (Williams, Salem et al. 2012); Park et al. wiederum wiesen 2012 einen Zusammenhang nach (Park, Kim et al. 2013).

Die Folgestudie von Pezolesi et al. mit kaukasischen Typ 2 Diabetikern 2013 ergab ebenfalls eine Assoziation zwischen dem rs1888747 SNP im FRMD3 Gen (Chromosom

9q.21.32) und fortgeschrittener diabetischer Nephropathie mit Proteinurie und terminalem Nierenversagen (Pezzolesi, Jeong et al. 2013).

Maeda et al. analysierten polymorphe Varianten des FRMD3 Gens in Typ 2 Diabetikern japanischer Herkunft. Sie stellten bei ihrem Kollektiv keine Assoziation zwischen einem SNP im FRMD3 Gen und diabetischer Nephropathie fest (Maeda, Araki et al. 2010, Buffon, Sortica et al. 2015).

FRMD3 kodiert das Protein 4.1O (Buffon, Sortica et al. 2015). Die molekulare Funktion von Protein 4.1O ist unbekannt (Ni, Ji et al. 2003, Pezzolesi, Poznik et al. 2009).

Bei Untersuchungen im Zebrafisch zeigte sich, dass das homologe FERM-Protein für Protein 4.1 (*mosaic eyes*) in Podozyten essentiell für die Bildung und Erhaltung der Schlitzmembran und die Aufrechthaltung der glomerulären Filtrationsbarriere ist (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005). *Mosaic eyes* *-/-* Zebrafischembryonen zeigten ähnlich wie die Nephrin oder Podocin *-/-* Tiere ein nephrotisches Syndrom mit ausgeprägtem perikardialem Ödem (Kramer-Zucker, Wiessner et al. 2005).

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten erstmals, dass das Protein 4.1O (sowie 4.1G, 4.1B und 4.1N) im humanen Podozyten exprimiert ist und mit Proteinen der glomerulären Schlitzmembran (u.a. Nephrin) interagiert. Die strukturelle Integrität der Schlitzmembran Junktion ist abhängig von ihrer Verankerung am podozytären Zytoskelett. Es liegt nahe, dass 4.1O als Mitglied der 4.1 Proteinfamilie die Zellmembran mit dem Zytoskelett verbindet (Chishti, Kim et al. 1998). Fußfortsatzauslöschung beruht auf Störungen im Aktinnetzwerk des Zytoskeletts im Podozyten (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Ziel dieser Arbeit war es deshalb herauszufinden, inwieweit Protein 4.1O Expression Einfluss auf Zellmigration hat.

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass eine Expression von 4.1O die Migration von humanen Podozyten fördert.

4.1O gehört zur Familie der 4.1 Proteine, die Adapterproteine zwischen Aktinzytoskelett und verschiedenen Transmembranproteinen darstellen (Ramez, Blot-Chabaud et al. 2003). Sie sind häufig in Zell-Zell-Junktionen lokalisiert und formen multimolekulare Komplexe mit Transmembran- und Membran-assoziierten Proteinen,

die sowohl für die strukturelle Stabilität als auch für die vom Zellkontakt ausgehende Signaltransduktion wichtig ist (Hoover and Bryant 2000). Im Fall von Podozyten entsprechen die Schlitzmembrankomplexe diesen Zell-Zell-Junktionen: Eigene Untersuchungen konnten die Interaktion von 4.1O mit Schlitzmembranmolekülen nachweisen. Diese Arbeit zeigt, dass Expression von 4.1O in humanen Podozyten Zellmigration fördert.

Aus den humanen und im Zebrafisch gewonnenen Daten würde man eher von nephroprotektiver Funktion von Protein 4.1O ausgehen. Überexpression von 4.1O führt in dieser Arbeit jedoch zu einem promigratorischen Zelltyp - Hypermotilität des Podozyten wird klassischerweise mit Proteinurie verbunden. Es könnte nun sein, dass, oder dass sich sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Protein 4.1O negativ auswirkt, eine gewisse Zellplastizität auch protektiv sein kann oder sich die Methode der Überexpression nicht eignet.

Das mit 4.1O verwandte Protein 4.1R ist ebenfalls an der Regulation von Zellmigration beteiligt: in humanen 4.1R *Knockout* ECV304 (*endothelial cell of vessel 304*) Zellen fehlen Lamellipodien (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Ausschaltung von 4.1R in den nichterythrozytären Zellen verursacht sowohl Störung von zielloser Zellmotilität als auch von direktonaler Migration (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). Dieses Ergebnis von Ruiz-Saenz et al. ist konkordant zu unseren Ergebnissen: *Knockout* von Protein 4.1R in ECV304 Zellen führt zu reduzierter Zellmigration, Expression von 4.1O in humanen Podozyten führt zu gesteigerter Zellmigration.

4.1R ist essentiell für die Zellmigration in ECV304 Zellen. In den Wildtyp ECV304 Zellen sammelt sich 4.1R im *leading edge* an, vermittelt die polarisierte Akkumulation von Aktin, die Formation von peripheren *ruffles* und erweiterten Lamellipodien und die Rekrutierung von IQGAP1 (*IQ motif containing GTPase activating protein*) (Ruiz-Saenz, Kremer et al. 2011). IQGAP1 ist ein Effektor der *small Rho-family GTPases* Rac und Cdc42 (Noritake, Watanabe et al. 2005).

Die Rolle von Zellmigration in Bezug auf Proteinurie

Zellmigration affektiert alle morphogenetischen Prozesse in der Zelle und trägt zu zahlreichen Erkrankungen bei, inklusive Malignomen und chronischer Inflammation (Parsons, Horwitz et al. 2010).

Podozytäre Fußfortsätze sind hoch dynamische Strukturen, die auf durchgehend wechselnde hydrostatische Drücke und andere Filtrationsanforderungen reagieren (Asanuma, Yanagida-Asanuma et al. 2007). Im Unterschied zu den zytoskelettalen Proteinen des Zellkörpers und der Hauptfortsätze sind die Fußfortsätze mit einem Mikrofilament-basierten kontraktilen Apparat aus Aktin, Myosin II, α -Actinin, Talin und Vinculin ausgestattet (Drenckhahn and Franke 1988). Die Funktion von Podozyten basiert größtenteils auf ihrer spezialisierten Zellarchitektur, insbesondere auf dem Erhalt der normalen Fußfortsatzstruktur (Faul, Asanuma et al. 2007).

Welsh et al. schreiben dem normalen, gesunden Podozyten eine limitierte, physiologische Motilität zu (Welsh and Saleem 2012). Sie stellten die These auf, dass es beim nephrotischen Syndrom durch Veränderungen der zytoskelettalen Dynamik zu Änderungen der Migrationseigenschaften kommt (Welsh and Saleem 2012). Aktivierung von RhoA zum Beispiel könne zu verminderten Migrationseigenschaften, reduzierter Kontraktilität und möglicherweise FSGS führen. Integrinaktivierung oder Aktivierung von Proteasen wie Cathepsin L zum Beispiel soll dagegen zu gesteigerten Migrationseigenschaften, Auslöschung von Fußfortsätzen und möglicherweise MCN und PAN führen (Welsh and Saleem 2012).

Eine kontrollierte, konstante Bewegung der Fußfortsätze entlang der GBM könnte die Funktion haben, den glomerulären Filter zu reinigen, damit er effektiv arbeiten kann (Welsh and Saleem 2012). 50-65% der glomerulären Filtrationsbarriere wird vom subpodozytären Raum bedeckt; durch die Motilität des Podozyten könnte dieser Labyrinth-artige Raum an der Unterseite seines Zellkörpers und seiner Zellfortsätze von Filtrat gereinigt werden (Salmon, Toma et al. 2007, Welsh and Saleem 2012).

Reguläre Perioden von glomerulärer Kontraktion-Relaxation werden tatsächlich beobachtet, mit dem Ergebnis von Filtrationsoszillationen (SNGFR, *single nephron GFR*) (Peti-Peterdi and Sipos 2010). So ergab sich über den neu entdeckten subpodozytären

Raum die Möglichkeit eines temporären *Backwash* Mechanismus im glomerulären Filter (Peti-Peterdi and Sipos 2010).

Peti-Peterdi et al. untersuchten einzelne Podozyten im Glomerulum in Echtzeit mittels *Multiphoton Excitation Fluorescence Microscopy*. Sie beurteilten die wenigen, sich im normalen, unbehandelten Glomerulum viel bewegenden Podozyten als geschädigt. Im Modell der PAN induzierten FSGS stellten sie eine fünf- bis zehnfach erhöhte Permeabilität der glomerulären Filtrationsbarriere um einen geschädigten, sich ablösenden Podozyten fest (Peti-Peterdi and Sipos 2010). Gesteigerte Motilität kann also Ausdruck einer Schädigung des Podozyten sein und bis hin zur Ablösung oder zum Zelltod des Podozyten und einer Proteinurie führen (Mundel and Reiser 2010).

Die Migrationseigenschaften des Podozyten involvieren den kontraktile Apparat in seinen Fußfortsätzen und haben großen Einfluss auf die Permeabilität des glomerulären Filters (Lewko, Waszkiewicz et al. 2015). Dieser Zusammenhang zwischen podozytärer Motilität und Proteinurie spielt auch in der Therapie proteinurischer Erkrankungen eine Rolle, wie möglicherweise bei Glukokortikoiden. Für den antiproteinurischen Effekt von Glukokortikoiden könnte die Unterbindung von cGMP (cyclisches Guanosinmonophosphat) Bildung verantwortlich sein - cGMP steigert die podozytäre Motilität (Lewko, Waszkiewicz et al. 2015).

In den letzten Jahren zeigten sich dazu neue therapeutische Ansätze, wie Proteinurie durch Hemmung von podozytärer Migration reduziert werden könnte. Sie werden jedoch kontrovers diskutiert. Zu diesen Ansätzen gehört zum Beispiel die Blockade des Urokinaserezeptors oder auch die direkte Inhibition von Cdc42 oder Rac1 Signaling.

Wei et. al erforschten die Blockade des Urokinaserezeptors und damit die Inhibition von $\alpha_5\beta_3$ Integrin vermittelten promigratorischen Cdc42 und Rac1 Signalkaskaden in Mäusen (Wei, Moller et al. 2008). Ob es dadurch zu verminderter Motilität und Senkung von Proteinurie kommen kann, ist jedoch sehr umstritten.

Eine weitere Möglichkeit zur Vorbeugung von Proteinurie könnte die direkte Inhibition von Cdc42 oder Rac1 Signaling sein (Mundel and Reiser 2010). Inhibition von Cdc42

Signaling mit FP₄-Mito kann die Formation aberranter Filopodia verhindern und schützt in Mäusen vor Lipopolysaccharid-induzierter Proteinurie (Yanagida-Asanuma, Asanuma et al. 2007). Inhibition von Rac1 Signaling mit dem spezifischen Rac-Inhibitor NSC23766 oder noch effektiver mit Eplerenon, einem selektiven Antagonisten am Mineralokortikoidrezeptor, kann Proteinurie reduzieren (Shibata, Nagase et al. 2008). So kam es bei Patienten mit chronischer renaler Erkrankung mit bereits bestehender ACE (*Angiotensin Converting Enzyme*) Inhibition nach Zusatz von Spironolacton zur Reduktion der Proteinurie (Chrysostomou and Becker 2001). Ob dies jedoch wirklich eine Folge der Rac Inhibition ist und nicht auf andere Effekte der Mineralkortikoidrezeptorblockade zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden.

Selbstkritik

Nicht alle Versuche ließen sich mit Podozyten durchführen. Es gibt bisher kein Zellkulturmodell für den glomerulären Filter. Die Schlitzmembranmoleküle wurden in den primären Podozyten nicht exprimiert, deshalb musste bei einem Teil der Versuche dieser Arbeit auf HEK293T oder COS-7 Zellen zurückgegriffen werden.

Die Experimente wurden größtenteils mit GLEPP1 cyt, dem cytosolischen Teil von GLEPP1, durchgeführt, nicht mit dem *full length* Protein (Ausnahme: Migrationsassays mit GLEPP1 *full length Knockout*). Versuche mit GLEPP1 cyt werden den extrazellulären Einflüssen auf GLEPP1 nicht gerecht. Die Rezeptorfunktion von GLEPP1 ist bisher wenig erforscht, deshalb wäre es interessant gewesen, nicht nur isoliert die katalytische Funktion der (zytosolischen) Tyrosinphosphatase zu untersuchen, sondern auch die extrazelluläre Steuerung von GLEPP1 über ihren Rezeptor miteinzubeziehen. Bei den in dieser Arbeit genutzten Methoden war dies jedoch meist nicht möglich und es musste weitgehend GLEPP1 cyt verwendet werden.

Für die Darstellung der fokalen Adhäsionen bei GLEPP1 Expression in COS-7 Zellen mittels Immunfluoreszenz wurden in der Arbeit Fotografien erstellt. Es handelt sich jedoch um einen dynamischen Prozess, deshalb wäre zusätzliches *live cell imaging* von Interesse.

Bei den Versuchen dieser Arbeit handelt es sich ausschließlich um Zellkulturexperimente. Die biologische Relevanz muss noch *in vivo* bestätigt werden.

Antwort (Take Home Message)

In den klinischen Studien zeigte sich, dass sowohl GLEPP1 als auch Protein 4.10 im Podozyten nephroprotektive Funktion haben. Bezüglich der Motilität von Podozyten wird klassischerweise Hypermotilität mit Proteinurie verbunden. Damit kongruent sind in dieser Arbeit die Ergebnisse der gesteigerten Zellmigration bei *Knockout* von GLEPP1. Im Widerspruch dazu steht die Hypermotilität bei GLEPP1 und auch Protein 4.10 Expression. Warum kommt es bei Expression dieser beiden nephroprotektiven Proteine zu bisher mit Proteinurie assoziierter gesteigerter Zellmigration? Die Ursache dafür könnte ein teilweise protektiver Effekt von podozytärer Motilität durch Reinigung des subpodozytären Raumes sein. Eine andere Möglichkeit wäre ungeeignete Methodik.

Intrazelluläre Funktion von GLEPP1 ist die Förderung der Ausbildung von fokalen Adhäsionen und die Aktivierung von FAK durch vermehrte Phosphorylierung an der Y576/577-FAK.

Ausblick

10% der Erwachsenen und fast alle Kinder, die eine renale Ersatztherapie benötigen, haben vererbte Nierenerkrankungen. Hereditäre Nierenerkrankungen zählen zur fünfthäufigsten Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz (nach Diabetes, arterieller Hypertension, Glomerulonephritis und Pyelonephritis (Devuyst, Knoers et al. 2014).

Diese Arbeit zeigt, dass GLEPP1 Defizienz, GLEPP1 Expression und 4.10 Expression die Zellmigration fördern. GLEPP1 Expression könnte Zellmigration Src-vermittelt über Tyrosinphosphorylierung an Y576/577 FAK stimulieren. Die Signale bei GLEPP1 Expression scheinen dagegen weniger Paxillin-vermittelt zu sein. Der Hauptaktivierungsweg von Paxillin als zentralem Adapterprotein in der fokalen Adhäsion des Podozyten ist Gegenstand weiterer Forschung.

Ebenso ist die Signalkaskade bei GLEPP1 Defizienz bisher noch unbekannt. Sie wäre besonders interessant, da es bei den klinischen Fällen zu Mutation im GLEPP1 kodierenden Gen kam. Aus selbigem Grund wären Versuche zur Zellmigration von Protein 4.10 defizienten Zellen spannend.

Weiterhin muss der Ligand von GLEPP1 noch entdeckt werden. Als Rezeptor Tyrosinphosphatase an der apikalen Membran des podozytären Fußfortsatzes könnte GLEPP1 möglicherweise Signale vom Filtrat in der Bowman-Kapsel an intrazelluläre Regulatoren des Zytoskeletts und der Zellmigration im Podozyten weiterleiten.

Nicht zuletzt steht noch die Frage aus, inwieweit erhöhte Zellmigration wie klassischerweise behauptet mit Pathogenität und Proteinurie oder mit wie neuerdings gedacht teilweise protektiven Effekten verbunden werden kann. Zur Klärung dieser Frage bedarf es zumindest eines validen Modells in der Zellkultur. Letzten Endes geben uns Ergebnisse aus der Zellkultur allerdings nur Hinweise – für eine endgültige Antwort sind *in vivo* Versuche unbedingt notwendig.

Der Podozyt ist eine der hauptverantwortlichen Zellen für die Aufrechterhaltung des glomerulären Filters (Wharram, Goyal et al. 2000). Podozytäre Dysfunktion, abgebildet durch die Auslöschung der Fußfortsätze und Proteinurie ist oft der Ausgangspunkt für progressive Nierenerkrankung (Wei, Moller et al. 2008).

Proteinurie wie beim idiopathischen nephrotischen Syndrom oder der diabetischen Nephropathie ist Marker für ein schlechteres Outcome und einen schnelleren Fortschritt der renalen Insuffizienz (Zandi-Nejad, Eddy et al. 2004). In der Prävention von chronischer renaler Insuffizienz durch hereditäre proteinurische Erkrankungen ist man durch die Entdeckung der genauen Mutationen schon einen großen Schritt vorangekommen. Nun wäre es wünschenswert, die Auswirkungen des Fehlens der podozytären zytoskelettalen Proteine weiter zu verstehen, um Therapien zu entwickeln, die speziell auf die Pathologien eingehen.

5 Literaturverzeichnis

(1978). "Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children." Kidney Int **13**(2): 159-165.

(1981). "The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. A report of the International Study of Kidney Disease in Children." J Pediatr **98**(4): 561-564.

Alexandrova, A. Y., K. Arnold, S. Schaub, J. M. Vasiliev, J. J. Meister, A. D. Bershadsky and A. B. Verkhovsky (2008). "Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow." PLoS One **3**(9): e3234.

Asanuma, K., E. Yanagida-Asanuma, M. Takagi, F. Kodama and Y. Tomino (2007). "The role of podocytes in proteinuria." Nephrology (Carlton) **12 Suppl 3**: S15-20.

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

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

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

Brown, M. C., K. A. West and C. E. Turner (2002). "Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway." Mol Biol Cell **13**(5): 1550-1565.

Buffon, M. P., D. A. Sortica, F. Gerchman, D. Crispim and L. H. Canani (2015). "FRMD3 gene: its role in diabetic kidney disease. A narrative review." Diabetol Metab Syndr **7**: 118.

Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls and C. Turner (1988). "Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton." Annu Rev Cell Biol **4**: 487-525.

Burridge, K., C. E. Turner and L. H. Romer (1992). "Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly." J Cell Biol **119**(4): 893-903.

Calalb, M. B., T. R. Polte and S. K. Hanks (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Mol Cell Biol **15**(2): 954-963.

Chang, F., C. A. Lemmon, D. Park and L. H. Romer (2007). "FAK potentiates Rac1 activation and localization to matrix adhesion sites: a role for betaPIX." Mol Biol Cell **18**(1): 253-264.

Charba, D. S., R. C. Wiggins, M. Goyal, B. L. Wharram, J. E. Wiggins, E. T. McCarthy, R. Sharma, M. Sharma and V. J. Savin (2009). "Antibodies to protein tyrosine phosphatase

receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb))." Am J Physiol Renal Physiol **297**(1): F138-144.

Chishti, A. H., A. C. Kim, S. M. Marfatia, M. Lutchman, M. Hanspal, H. Jindal, S. C. Liu, P. S. Low, G. A. Rouleau, N. Mohandas, J. A. Chasis, J. G. Conboy, P. Gascard, Y. Takakuwa, S. C. Huang, E. J. Benz, Jr., A. Bretscher, R. G. Fehon, J. F. Gusella, V. Ramesh, F. Solomon, V. T. Marchesi, S. Tsukita, S. Tsukita, K. B. Hoover and et al. (1998). "The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane." Trends Biochem Sci **23**(8): 281-282.

Chrysostomou, A. and G. Becker (2001). "Spironolactone in addition to ACE inhibition to reduce proteinuria in patients with chronic renal disease." N Engl J Med **345**(12): 925-926.

Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge (1996). "Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions." J Cell Biol **133**(6): 1403-1415.

Cortes, P., M. Mendez, B. L. Riser, C. J. Guerin, A. Rodriguez-Barbero, C. Hassett and J. Yee (2000). "F-actin fiber distribution in glomerular cells: structural and functional implications." Kidney Int **58**(6): 2452-2461.

Devuyst, O., N. V. Knoers, G. Remuzzi and F. Schaefer (2014). "Rare inherited kidney diseases: challenges, opportunities, and perspectives." Lancet **383**(9931): 1844-1859.

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

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.

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

Feller, S. M., G. Posern, J. Voss, C. Kardinal, D. Sakkab, J. Zheng and B. S. Knudsen (1998). "Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins." J Cell Physiol **177**(4): 535-552.

Finne, K., H. Vethe, T. Skogstrand, S. Leh, T. D. Dahl, O. Tenstad, F. S. Berven, R. K. Reed and B. E. Vikse (2014). "Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded glomeruli suggests depletion of glomerular filtration barrier proteins in two-kidney, one-clip hypertensive rats." Nephrol Dial Transplant **29**(12): 2217-2227.

Geiger, B., J. P. Spatz and A. D. Bershadsky (2009). "Environmental sensing through focal adhesions." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 21-33.

Girault, J. A., G. Labesse, J. P. Mornon and I. Callebaut (1999). "The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains." Trends Biochem Sci **24**(2): 54-57.

Gobert, R. P., M. van den Eijnden, C. Szyndralewicz, C. Jorand-Lebrun, D. Swinnen, L. Chen, C. Gillieron, F. Pixley, P. Juillard, P. Gerber, C. Johnson-Leger, S. Halazy, M. Camps, A. Bombrun, M. Shipp, P. A. Vitte, V. Ardisson, C. Ferrandi, D. Perrin, C. Rommel and R. Hooft van Huijsduijnen (2009). "GLEPP1/protein-tyrosine phosphatase phi inhibitors block chemotaxis in vitro and in vivo and improve murine ulcerative colitis." J Biol Chem **284**(17): 11385-11395.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.

Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA." Virology **52**(2): 456-467.

Gupton, S. L. and C. M. Waterman-Storer (2006). "Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration." Cell **125**(7): 1361-1374.

Hagel, M., E. L. George, A. Kim, R. Tamimi, S. L. Opitz, C. E. Turner, A. Imamoto and S. M. Thomas (2002). "The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling." Mol Cell Biol **22**(3): 901-915.

Hoover, K. B. and P. J. Bryant (2000). "The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **12**(2): 229-234.

Ilic, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada and T. Yamamoto (1995). "Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice." Nature **377**(6549): 539-544.

Ishola, D. A., Jr., D. M. van der Giezen, B. Hahnel, R. Goldschmeding, W. Kriz, H. A. Koomans and J. A. Joles (2006). "In mice, proteinuria and renal inflammatory responses to albumin overload are strain-dependent." Nephrol Dial Transplant **21**(3): 591-597.

Jefferson, J. A., C. E. Alpers and S. J. Shankland (2011). "Podocyte biology for the bedside." Am J Kidney Dis **58**(5): 835-845.

Jensen, A. M. and M. Westerfield (2004). "Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation." Curr Biol **14**(8): 711-717.

Kerjaschki, D. (2001). "Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis." J Clin Invest **108**(11): 1583-1587.

Knudsen, B. S., S. M. Feller and H. Hanafusa (1994). "Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk." J Biol Chem **269**(52): 32781-32787.

Kos, C. H., T. C. Le, S. Sinha, J. M. Henderson, S. H. Kim, H. Sugimoto, R. Kalluri, R. E. Gerszten and M. R. Pollak (2003). "Mice deficient in alpha-actinin-4 have severe glomerular disease." J Clin Invest **111**(11): 1683-1690.

Koukouritaki, S. B., A. Tamizuddin and E. A. Lianos (1998). "Enhanced expression of the cytoskeletal-associated protein, paxillin, in experimental nephrotic syndrome." J Invest Med **46**(6): 284-289.

Kramer-Zucker, A. G., S. Wiessner, A. M. Jensen and I. A. Drummond (2005). "Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephhrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes." Dev Biol **285**(2): 316-329.

Kreidberg, J. A., M. J. Donovan, S. L. Goldstein, H. Rennke, K. Shepherd, R. C. Jones and R. Jaenisch (1996). "Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis." Development **122**(11): 3537-3547.

Kriz, W. (2002). "Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease." Microsc Res Tech **57**(4): 189-195.

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

Larsen, M., M. L. Tremblay and K. M. Yamada (2003). "Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 700-711.

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.

Lewko, B., A. Waszkiewicz, A. Maryn, M. Golos, E. Latawiec, A. Daca, J. M. Witkowski, S. Angielski and J. Stepinski (2015). "Dexamethasone-dependent modulation of cyclic GMP synthesis in podocytes." Mol Cell Biochem **409**(1-2): 243-253.

Lin, Y. C., M. Boone, L. Meuris, I. Lemmens, N. Van Roy, A. Soete, J. Reumers, M. Moisse, S. Plaisance, R. Drmanac, J. Chen, F. Speleman, D. Lambrechts, Y. Van de Peer, J. Tavernier and N. Callewaert (2014). "Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations." Nat Commun **5**: 4767.

Lv, Z., M. Hu, X. Ren, M. Fan, J. Zhen, L. Chen, J. Lin, N. Ding, Q. Wang and R. Wang (2016). "Fyn Mediates High Glucose-Induced Actin Cytoskeleton Reorganization of Podocytes via Promoting ROCK Activation In Vitro." J Diabetes Res **2016**: 5671803.

Ma, H., A. Togawa, K. Soda, J. Zhang, S. Lee, M. Ma, Z. Yu, T. Ardito, J. Czyzyk, L. Diggs, D. Joly, S. Hatakeyama, E. Kawahara, L. Holzman, J. L. Guan and S. Ishibe (2010). "Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement." J Am Soc Nephrol **21**(7): 1145-1156.

Maeda, S., S. Araki, T. Babazono, M. Toyoda, T. Umezono, K. Kawai, M. Imanishi, T. Uzu, H. Watada, D. Suzuki, A. Kashiwagi, Y. Iwamoto, K. Kaku, R. Kawamori and Y. Nakamura (2010). "Replication study for the association between four Loci identified by a genome-wide association study on European American subjects with type 1 diabetes and susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes." Diabetes **59**(8): 2075-2079.

Martin, K. H., S. A. Boerner and J. T. Parsons (2002). "Regulation of focal adhesion targeting and inhibitory functions of the FAK related protein FRNK using a novel estrogen receptor "switch"." Cell Motil Cytoskeleton **51**(2): 76-88.

Martini, S., V. Nair, S. R. Patel, F. Eichinger, R. G. Nelson, E. J. Weil, M. G. Pezzolesi, A. S. Krolewski, A. Randolph, B. J. Keller, T. Werner and M. Kretzler (2013). "From single nucleotide polymorphism to transcriptional mechanism: a model for FRMD3 in diabetic nephropathy." Diabetes **62**(7): 2605-2612.

Michaud, J. L., L. I. Lemieux, M. Dube, B. C. Vanderhyden, S. J. Robertson and C. R. Kennedy (2003). "Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4." J Am Soc Nephrol **14**(5): 1200-1211.

Mitra, S. K., D. A. Hanson and D. D. Schlaepfer (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 56-68.

Mooyaart, A. L., E. J. Valk, L. A. van Es, J. A. Bruijn, E. de Heer, B. I. Freedman, O. M. Dekkers and H. J. Baelde (2011). "Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis." Diabetologia **54**(3): 544-553.

Motiwala, T., H. Kutay, K. Ghoshal, S. Bai, H. Seimiya, T. Tsuruo, S. Suster, C. Morrison and S. T. Jacob (2004). "Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13844-13849.

Mundel, P. and J. Reiser (2010). "Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte?" Kidney Int **77**(7): 571-580.

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

Noritake, J., T. Watanabe, K. Sato, S. Wang and K. Kaibuchi (2005). "IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration." J Cell Sci **118**(Pt 10): 2085-2092.

Olton, D. Y., J. M. Close, C. S. Sfeir and P. N. Kumta (2011). "Intracellular trafficking pathways involved in the gene transfer of nano-structured calcium phosphate-DNA particles." *Biomaterials* **32**(30): 7662-7670.

Owen, J. D., P. J. Ruest, D. W. Fry and S. K. Hanks (1999). "Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2." *Mol Cell Biol* **19**(7): 4806-4818.

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

Park, H., H. J. Kim, S. Lee, Y. J. Yoo, Y. S. Ju, J. E. Lee, S. I. Cho, J. Sung, J. I. Kim and J. S. Seo (2013). "A family-based association study after genome-wide linkage analysis identified two genetic loci for renal function in a Mongolian population." *Kidney Int* **83**(2): 285-292.

Parsons, J. T. (2003). "Focal adhesion kinase: the first ten years." *J Cell Sci* **116**(Pt 8): 1409-1416.

Parsons, J. T., A. R. Horwitz and M. A. Schwartz (2010). "Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension." *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(9): 633-643.

Patrakka, J. and K. Tryggvason (2010). "Molecular make-up of the glomerular filtration barrier." *Biochem Biophys Res Commun* **396**(1): 164-169.

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

Peti-Peterdi, J. and A. Sipos (2010). "A high-powered view of the filtration barrier." *J Am Soc Nephrol* **21**(11): 1835-1841.

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

Pezzolesi, M. G., J. Jeong, A. M. Smiles, J. Skupien, J. C. Mychaleckyj, S. S. Rich, J. H. Warram and A. S. Krolewski (2013). "Family-based association analysis confirms the role of the chromosome 9q21.32 locus in the susceptibility of diabetic nephropathy." *PLoS One* **8**(3): e60301.

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

Pixley, F. J., P. S. Lee, J. S. Condeelis and E. R. Stanley (2001). "Protein tyrosine phosphatase phi regulates paxillin tyrosine phosphorylation and mediates colony-stimulating factor 1-induced morphological changes in macrophages." *Mol Cell Biol* **21**(5): 1795-1809.

Pollard, T. D. and G. G. Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments." *Cell* **112**(4): 453-465.

Ramez, M., M. Blot-Chabaud, F. Cluzeaud, S. Chanan, M. Patterson, L. D. Walensky, S. Marfatia, A. J. Baines, J. A. Chasis, J. G. Conboy, N. Mohandas and P. Gascard (2003).

"Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron." *Kidney Int* **63**(4): 1321-1337.

Rio, D. C., S. G. Clark and R. Tjian (1985). "A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction." *Science* **227**(4682): 23-28.

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

Saleem, M. A., M. J. O'Hare, J. Reiser, R. J. Coward, C. D. Inward, T. Farren, C. Y. Xing, L. Ni, P. W. Mathieson and P. Mundel (2002). "A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression." *J Am Soc Nephrol* **13**(3): 630-638.

Salmon, A. H., I. Toma, A. Sipos, P. R. Muston, S. J. Harper, D. O. Bates, C. R. Neal and J. Peti-Peterdi (2007). "Evidence for restriction of fluid and solute movement across the glomerular capillary wall by the subpodocyte space." *Am J Physiol Renal Physiol* **293**(6): F1777-1786.

Schaller, M. D. (2001). "Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein." *Oncogene* **20**(44): 6459-6472.

Schaller, M. D. (2010). "Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions." *J Cell Sci* **123**(Pt 7): 1007-1013.

Schaller, M. D., J. D. Hildebrand and J. T. Parsons (1999). "Complex formation with focal adhesion kinase: A mechanism to regulate activity and subcellular localization of Src kinases." *Mol Biol Cell* **10**(10): 3489-3505.

Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines and J. T. Parsons (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." *Mol Cell Biol* **14**(3): 1680-1688.

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

Schischmanoff, P. O., R. Winardi, D. E. Discher, M. K. Parra, S. E. Bicknese, H. E. Witkowska, J. G. Conboy and N. Mohandas (1995). "Defining of the minimal domain of protein 4.1 involved in spectrin-actin binding." *J Biol Chem* **270**(36): 21243-21250.

Schlaepfer, D. D., S. K. Mitra and D. Ilic (2004). "Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase." *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3): 77-102.

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

Shibata, S., M. Nagase, S. Yoshida, W. Kawarazaki, H. Kurihara, H. Tanaka, J. Miyoshi, Y. Takai and T. Fujita (2008). "Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease." *Nat Med* **14**(12): 1370-1376.

Small, J. V., T. Stradal, E. Vignall and K. Rottner (2002). "The lamellipodium: where motility begins." *Trends Cell Biol* **12**(3): 112-120.

Stepanek, L., A. W. Stoker, E. Stoeckli and J. L. Bixby (2005). "Receptor tyrosine phosphatases guide vertebrate motor axons during development." *J Neurosci* **25**(15): 3813-3823.

Takakuwa, Y. (2000). "Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells." Int J Hematol **72**(3): 298-309.

Tanaka, T., R. Yamaguchi, H. Sabe, K. Sekiguchi and J. M. Healy (1996). "Paxillin association in vitro with integrin cytoplasmic domain peptides." FEBS Lett **399**(1-2): 53-58.

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

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

Toblli, J. E., P. Bevione, F. Di Gennaro, L. Madalena, G. Cao and M. Angerosa (2012). "Understanding the mechanisms of proteinuria: therapeutic implications." Int J Nephrol **2012**: 546039.

Tomar, A. and D. D. Schlaepfer (2009). "Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility." Curr Opin Cell Biol **21**(5): 676-683.

Tonks, N. K. (2006). "Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(11): 833-846.

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

Webb, D. J., K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons and A. F. Horwitz (2004). "FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly." Nat Cell Biol **6**(2): 154-161.

Wej, C., C. C. Moller, M. M. Altintas, J. Li, K. Schwarz, S. Zacchigna, L. Xie, A. Henger, H. Schmid, M. P. Rastaldi, P. Cowan, M. Kretzler, R. Parrilla, M. Bendayan, V. Gupta, B. Nikolic, R. Kalluri, P. Carmeliet, P. Mundel and J. Reiser (2008). "Modification of kidney barrier function by the urokinase receptor." Nat Med **14**(1): 55-63.

Welsh, G. I. and M. A. Saleem (2012). "The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease." Nat Rev Nephrol **8**(1): 14-21.

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

Williams, W. W., R. M. Salem, A. J. McKnight, N. Sandholm, C. Forsblom, A. Taylor, C. Guiducci, J. B. McAteer, G. J. McKay, T. Isakova, E. P. Brennan, D. M. Sadlier, C. Palmer, J. Soderlund, E. Fagerholm, V. Harjutsalo, R. Lithovius, D. Gordin, K. Hietala, J. Kyto, M. Parkkonen, M. Rosengard-Barlund, L. Thorn, A. Syreeni, N. Tolonen, M. Saraheimo, J. Waden, J. Pitkaniemi, C. Sarti, J. Tuomilehto, K. Tryggvason, A. M. Osterholm, B. He, S. Bain, F. Martin, C. Godson, J. N. Hirschhorn, A. P. Maxwell, P. H. Groop and J. C. Florez (2012). "Association testing of previously reported variants in a large case-control meta-analysis of diabetic nephropathy." Diabetes **61**(8): 2187-2194.

Yanagida-Asanuma, E., K. Asanuma, K. Kim, M. Donnelly, H. Young Choi, J. Hyung Chang, S. Suetsugu, Y. Tomino, T. Takenawa, C. Faul and P. Mundel (2007). "Synaptopodin protects against proteinuria by disrupting Cdc42:IRSp53:Mena signaling complexes in kidney podocytes." Am J Pathol **171**(2): 415-427.

Zaidel-Bar, R., R. Milo, Z. Kam and B. Geiger (2007). "A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions." J Cell Sci **120**(Pt 1): 137-148.

Zandi-Nejad, K., A. A. Eddy, R. J. Glassock and B. M. Brenner (2004). "Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease?" Kidney Int Suppl(92): S76-89.

Zuo, Y., H. C. Yang, S. A. Potthoff, B. Najafian, V. Kon, L. J. Ma and A. B. Fogo (2012). "Protective effects of PPARgamma agonist in acute nephrotic syndrome." Nephrol Dial Transplant **27**(1): 174-181.

6 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. L. C. Rump für die Möglichkeit, meine wissenschaftliche Arbeit in einem Labor mit hochqualifizierten Wissenschaftlern und äußerst spannenden Forschungsthemen absolvieren zu dürfen.

Ein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. med. L. Sellin und Frau Dr. med. E. Königshausen für die ausgezeichnete Betreuung, die Ideen und motivierenden Worte. Ihre stetige Ansprechbarkeit und geistigen Anregungen halfen mir sehr, mich weiterzuentwickeln.

Frau B. Duvnjak, Frau C. Schwandt und Frau N. Kuhr möchte ich sehr für ihre Unterstützung bei Fragen der Labortechnik und Versuche danken.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitdoktoranden und Kollegen, dafür, dass ich die Zeit im Labor mit so viel Spaß und freudigen Erinnerungen verbinde, insbesondere A. Tepe, M. Thieme, A. Uyaner, C. Frosch, R. Haase und Herrn Dr. med. S. A. Potthoff.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte für ihre Unterstützung, den Rückhalt und ihr Verständnis aus vollem Herzen danken.