

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

# **EphB2 und ephrinB1 vermittelte Repulsion in humanen Podozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von Julius Johannes Nikolaus Hoffacker  
2021

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

gez.: Julius Hoffacker  
Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker  
Erstgutachter: Prof. Dr. Lorenz Sellin  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Abdurrahman Sagir

*In Gedenken an den Mann, der durch Tugend und Aufopferung ein Leben in  
Zufriedenheit und Wohlstand für seine Um- und Nachwelt geschaffen hat.*

*09.12.1927 - 04.02.2007*

# I. Zusammenfassung deutsch

Eph-Rezeptoren sind die größte Klasse der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (Kullander und Klein 2002). Sie spielen vor allem in neuronalen Zellen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Zellnetzwerken, der Ausbildung von Zellgrenzen sowie der Kommunikation von Zellen. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Eph-Rezeptoren und ephrinen für die Physiologie und Pathophysiologie der Niere und insbesondere des glomerulären Filters besser zu verstehen.

Wir konnten mittels *Western-Blot*-Untersuchungen belegen, dass die Eph-Rezeptoren EphA1-A3, EphB1-B3 sowie die Liganden ephrinA1, A2 und B1 im humanen Podozyten exprimiert werden. Ebenso konnte bereits zuvor von Wnuk et al. belegt werden, dass EphB4 im Glomerulum von Ratten eine entscheidende, protektive Rolle bei der Thy1.1-Nephritis spielt, welche ein Modell für die mesangioproliferative Glomerulonephritis ist (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). Zudem konnte der Ligand ephrinB1 immunelektronenmikroskopisch in direkter Nähe der podozytären Schlitzmembran nachgewiesen werden (Hashimoto, Karasawa et al. 2007).

Wir konnten zeigen, dass sich bei der Interaktion von Podozyten, welche EphB2 und ephrinB1 auf Ihrer Zellmembran tragen, die Zellen nach initialer Bindung im Sinne einer Zellrepulsion abstoßen. Bei fehlender, intrazellulärer EphB2-Domäne bleibt diese Repulsion aus, da die für die Signalkaskade notwendigen Proteinabschnitte des Eph-Rezeptors fehlen. Diese Ergebnisse decken sich mit den von Noren und Pasquale beschriebenen Zellinteraktionsmustern in hippokampalen Zellen (Noren und Pasquale 2004).

Weitergehend ist von großem Interesse, inwieweit EphB2 und ephrinB1 mit wichtigen Strukturproteinen der Podozyten und vor allem Nephrin interagieren.

Fukusumi et al. konnten zeigen, dass der Eph-Ligand ephrinB1 mit Nephrin über die extrazellulären Immunglobulindomänen interagiert (Fukusumi, Zhang et al. 2018). Sowohl ephrinB1 als auch Nephrin werden im Rahmen dieser Bindung phosphoryliert (Fukusumi, Zhang et al. 2018). Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass EphB2 Nephrin ebenfalls bindet und phosphoryliert. Dies impliziert EphB2 vermittelte, protektive Effekte auf den glomerulären Filter, da Nephrinphosphorylierung als essenziell für die adäquate Podozytenfunktion und die Rekonstitution nach zellulärer Schädigung anzusehen ist (New, Martin et al. 2016). In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie belegt werden, dass die gleichzeitige Expression von Nephrin und EphB2 in cos7-Zellen zu einer Umverteilung von EphB2 führt. Bei alleiniger EphB2-Expression findet sich ein homogenes Verteilungsmuster, wohingegen bei Co-Expression mit Nephrin ein eher vesikuläres Verteilungsmuster zu beobachten ist. Diese Ergebnisse implizieren eine etwaige Nephrin vermittelte Endozytose des EphB2-Rezeptors nach Nephrinbindung. Diese Endozytose würde das zuvor beschriebene Zellverhalten von Podozyten nach EphB2/ephrinB1-Bindung modifizieren, da es zu keiner Eph/ephrin-Bindung an der Zelloberfläche mehr kommen kann. Inwieweit EphB2 durch Interaktion mit Nephrin wirklich endozytiert wird, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

## II. Zusammenfassung englisch

Eph receptors represent the largest class in the family of receptor tyrosine kinases (Kullander und Klein 2002). Their effects are well understood in neuronal cells where they have huge impact on cell migration, cell positioning and the building of cell boundaries and networks. It was our goal to improve the understanding of Ephs and ephrins in the physiology and pathophysiology of the kidney.

We could show via Western-Blot that the Eph receptors A1-A3, B1-B3 and their ligands ephrinA1, A2 and B1 are expressed in human podocytes.

Wnuk et al. could show before that EphB4 is expressed in the glomeruli of rats. It plays an important and protective role in the pathophysiology of the Thy1.1 nephritis which is a model for the mesangioproliferative glomerulonephritis (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012).

Furthermore, ephrinB1 could be detected at the glomerular slit diaphragm via immuno electron microscopy (Hashimoto, Karasawa et al. 2007).

We could show that podocytes which express EphB2 and ephrinB1 on their cell surface repulse each other after an initial binding. This repulsion depends on the cytoplasmatic part of EphB2. This could be shown as the missing of the cytoplasmatic part of EphB2 with its tyrosine kinase domain results in an adhesion of the cells. These results coincide with the findings in hippocampal cells (Noren und Pasquale 2004).

Furthermore, the understanding of interactions between EphB2, ephrinB1 and nephrin as a fundamental structure protein of the podocytes is essential.

EphrinB1 interacts with nephrin and binds its extracellular immunoglobulin domain. Due to this interaction nephrin and ephrinB1 are phosphorylated (Fukusumi, Zhang et al. 2018).

Our group could show that EphB2 binds nephrin as well. The binding leads to nephrin phosphorylation. This implicates protective effects of EphB2 and ephrinB1 as nephrin phosphorylation is a fundamental process in normal podocyte function and recovery from stress (New, Martin et al. 2016).

In addition, we could show via immunofluorescence microscopy that colocalization of EphB2 and nephrin leads to an altered distribution of EphB2 in cos7 cells. In absence of nephrin EphB2 is distributed homogenously in the cells whereas it shows a more vesicular appearance while co-expressed with nephrin. This may implicate a nephrin induced endocytosis of EphB2. This endocytosis may affect the repulsion of EphB2 and ephrinB1 expressing cells because they can only bind when they are anchored in the cell surface. If binding to nephrin really leads to endocytosis of EphB2 needs to undergo further examination.

### III. Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                                                       |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| °C         | Grad Celsius                                                                          |
| Abb.       | Abbildung                                                                             |
| ADP        | Adenosindiphosphat                                                                    |
| ANA        | <i>anti-nephrin-antibody</i>                                                          |
| Arp 2/3    | <i>Actin related proteins Arp 2 and Arp 3 complex</i>                                 |
| ATP        | Adenosintriphosphat                                                                   |
| CD         | <i>cluster of differentiation</i> Protein                                             |
| CD2AP      | <i>CD2 associated protein</i>                                                         |
| Cdc42      | <i>cell division control protein 42 homologue</i>                                     |
| CFP        | <i>cyan fluorescing protein</i>                                                       |
| CHAPS      | 3-(3-Cholamidpropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat                                 |
| CKD        | <i>chronic kidney disease</i>                                                         |
| cm         | Zentimeter                                                                            |
| cos7       | <i>CV1 in origin, carrying SV 40 Zellen</i>                                           |
| DMEM       | <i>Dulbecco's modified Eagle serum</i>                                                |
| DMSO       | Dimethylsulfoxid                                                                      |
| DNA        | <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure                                |
| E.coli     | <i>Escherichia coli</i>                                                               |
| EDTA       | Ethylendiamintetraacetylsäure                                                         |
| Eph        | <i>erythropoietin producing hepatocellular cell line receptor</i>                     |
| Fc         | <i>fragment crystallisable</i>                                                        |
| GBM        | glomeruläre Basalmembran                                                              |
| GDP        | Guanosindiphosphat                                                                    |
| GTP        | Guanosintriphosphat                                                                   |
| HEK293T    | <i>human embryonal kidney Zellen</i>                                                  |
| HEPES      | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazyl)ethansulfonsäure                                    |
| hPodos     | humane Podozyten                                                                      |
| HRP        | <i>horseradish peroxidase</i>                                                         |
| IgG        | Immunglobulin der Klasse G                                                            |
| JNK        | <i>c-Jun N-terminal kinase</i>                                                        |
| kDa        | Kilodalton                                                                            |
| l          | Liter                                                                                 |
| m          | Meter                                                                                 |
| MEM        | <i>modified Eagle serum</i>                                                           |
| ml         | Milliliter                                                                            |
| mm         | Millimeter                                                                            |
| mM         | Millimolar                                                                            |
| nl         | Nanoliter                                                                             |
| nm         | Nanometer                                                                             |
| NPV-BHG712 | spezifischer EphB4-Antagonist                                                         |
| PBS        | <i>phosphate buffered saline</i>                                                      |
| PCR        | <i>polymerase chain reaction</i>                                                      |
| PDZ        | Post-synaptic-density-protein 95-, Discs-large-homolog- und Zonula occludens 1-Domäne |
| PMSF       | Phenylmethansulfonylfluorid                                                           |
| Rac1       | <i>Ras related C3 botulinum toxin substrate 1</i>                                     |
| RFP        | <i>red fluorescing protein</i>                                                        |
| Rho        | <i>Ras homologue 1</i>                                                                |
| RNA        | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure                                            |
| rpm        | <i>rounds per minute</i>                                                              |
| RPMI       | Roswell Park Memorial Institute                                                       |
| SAM        | <i>sterile alpha motif</i>                                                            |
| SDS-PAGE   | <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i>                       |
| SV40       | Simian-Virus 40                                                                       |
| TEMED      | Tetramethylethylendiamin                                                              |
| Thy1       | CD90= <i>cluster of differentiation 90 Protein</i>                                    |
| YFP        | <i>yellow fluorescing protein</i>                                                     |
| ZO-1       | <i>Zonula-occludens 1 Protein</i>                                                     |
| ΔC         | Proteinvariante mit fehlendem (Δ) zytoplasmatischen (C) Anteil                        |
| μl         | Mikroliter                                                                            |
| μm         | Mikrometer                                                                            |

## IV. Inhaltsverzeichnis

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung.....                                                                | 1  |
| 1.1 Proteinurische Nierenerkrankungen.....                                        | 1  |
| 1.2 Der glomeruläre Filter .....                                                  | 1  |
| 1.2.1 Die podozytäre Schlitzmembran .....                                         | 2  |
| 1.2.2 Nephrin .....                                                               | 3  |
| 1.3 Eph-Rezeptoren und ephrine .....                                              | 4  |
| 1.3.1 Allgemeines.....                                                            | 4  |
| 1.3.2 Molekularer Aufbau von Eph-Rezeptoren.....                                  | 5  |
| 1.3.3 Signaltransduktion und Eph-ephrin vermittelte Zelladhäsion und -repulsion.. | 6  |
| 1.4 Eph-Rezeptoren und ephrine in der Niere.....                                  | 8  |
| 1.5 Fragestellung der Arbeit.....                                                 | 10 |
| 2. Materialien .....                                                              | 11 |
| 2.1 Zellen .....                                                                  | 11 |
| 2.2 Plasmide.....                                                                 | 11 |
| 2.3 Antikörper.....                                                               | 12 |
| 2.4 Geräte .....                                                                  | 13 |
| 2.5 Verbrauchsmaterialien.....                                                    | 16 |
| 2.6 Reagenzien.....                                                               | 17 |
| 2.7 Nährmedien, Zusätze und Reagenzien für Zellkultur.....                        | 18 |
| 2.8 SDS-PAGE und Western-Blot.....                                                | 19 |
| 2.9 Immunpräzipitation.....                                                       | 21 |
| 2.10 Agarosegelelektrophorese .....                                               | 21 |
| 2.11 DNA-Restriktion und DNA-Klonierung.....                                      | 22 |
| 2.12 Transformation, Mini- und Maxikulturen, Maxipreparation.....                 | 22 |
| 2.13 PCR und reverse Transkription .....                                          | 23 |
| 2.14 Immunfluoreszenz.....                                                        | 23 |
| 2.15 Glomeruläre Lysate .....                                                     | 23 |
| 2.16 RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA .....                                | 24 |
| 2.17 Computerprogramme.....                                                       | 24 |
| 3. Methoden .....                                                                 | 25 |
| 3.1 Zellkultur .....                                                              | 25 |
| 3.1.1 Kultivierung von HEK293T- und cos7-Zellen .....                             | 25 |
| 3.1.2 Transfektion von HEK293T-Zellen.....                                        | 26 |
| 3.1.3 Lipofektion von cos7-Zellen .....                                           | 26 |
| 3.1.4 Kultivierung humaner Podozyten.....                                         | 26 |
| 3.1.5 Ausdifferenzierung humaner Podozyten.....                                   | 27 |
| 3.1.6 RNA-Isolierung aus humanen Podozyten.....                                   | 27 |
| 3.1.7 Erzeugung stabil transduzierter humaner Podozyten und cos7-Zellen.....      | 28 |
| 3.1.8 Ganzzelllysate mit 2x Laemmli.....                                          | 30 |
| 3.1.9 Einfrieren von Zellen .....                                                 | 30 |
| 3.1.10 Auftauen von Zellen.....                                                   | 31 |
| 3.2 Proteine.....                                                                 | 31 |
| 3.2.1 SDS-PAGE und Western-Blot.....                                              | 31 |
| 3.2.2 Immunpräzipitation .....                                                    | 32 |
| 3.3 DNA .....                                                                     | 33 |
| 3.3.1 Agarosegelelektrophorese .....                                              | 33 |
| 3.3.2 Enzymatischer DNA-Verdau.....                                               | 33 |
| 3.3.3 Transformation .....                                                        | 34 |

|                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.4 Mini- und Maxikulturen.....                                                                                                 | 34 |
| 3.3.5 Maxipreparation .....                                                                                                       | 35 |
| 3.3.6 Photometrische Konzentrationsmessung.....                                                                                   | 35 |
| 3.3.7 DNA-Klonierung.....                                                                                                         | 35 |
| 3.3.8 Umschreibung von RNA in cDNA.....                                                                                           | 35 |
| 3.3.9 PCR.....                                                                                                                    | 36 |
| 3.4 Immunfluoreszenz.....                                                                                                         | 37 |
| 3.4.1 Erstellung der Immunfluoreszenzpräparate.....                                                                               | 37 |
| 3.4.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung .....                                                                                       | 38 |
| 3.5 <i>Live Cell Imaging</i> .....                                                                                                | 38 |
| 3.5.1 Einzelne liegende, in Differenzierung befindliche Podozyten in Co-Kultur .....                                              | 39 |
| 3.5.2 Ausdifferenzierte, konfluente Podozyten in Co-Kultur.....                                                                   | 39 |
| 3.5.3 Mikroskopie, Bild- und Videobearbeitung .....                                                                               | 40 |
| 3.6 Mäuse .....                                                                                                                   | 41 |
| 3.6.1 Lyse muriner Glomeruli.....                                                                                                 | 41 |
| 3.6.2 RNA-Isolierung aus murinen Glomeruli .....                                                                                  | 41 |
| 4. Ergebnisse .....                                                                                                               | 42 |
| 4.1 Proteinexpression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in humanen Podozyten ....                                                   | 42 |
| 4.2 <i>Live Cell Imaging</i> .....                                                                                                | 43 |
| 4.2.1 In Ausdifferenzierung befindliche Podozyten .....                                                                           | 44 |
| 4.2.2 Ausdifferenzierte Podozyten.....                                                                                            | 47 |
| 4.3 Zelluläres Verteilungsmuster von EphB2 in Abhängigkeit zur Co-Expression mit Neph rin .....                                   | 50 |
| 5. Diskussion.....                                                                                                                | 51 |
| 5.1 Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in humanen Podozyten .....                                                         | 51 |
| 5.2 EphB2/ephrinB1-Interaktion und ihr Einfluss auf Repulsion und Adhäsion von Podozyten .....                                    | 52 |
| 5.2.1 Implikationen für die Physiologie.....                                                                                      | 52 |
| 5.2.2 Implikation für die Pathophysiologie/proteinurische Nierenerkrankungen .....                                                | 54 |
| 5.3 Beeinflussung des Verteilungsmusters von EphB2 durch Neph rin .....                                                           | 55 |
| 5.4 Rolle der EphB2-Tyrosinkinasedomäne für die Adhäsion und Repulsion von Podozyten sowie für den Podozyten im Allgemeinen ..... | 55 |
| 5.5 Potentielle Targets der EphB-Rezeptortyrosinkinasen am glomerulären Filter ....                                               | 56 |
| 5.6 Stärken und Schwächen der Arbeit sowie Ausblick.....                                                                          | 57 |
| 6. Quellenverzeichnis.....                                                                                                        | 58 |
| Danksagung .....                                                                                                                  | 1  |

# 1. Einleitung

## 1.1 Proteinurische Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen (*chronic kidney disease*, CKD) sind aufgrund ihrer hohen Prävalenz sowie der vielen, vor allem kardiovaskulären Komorbiditäten wie Herzinfarkt und Schlaganfall ein weitreichendes, medizinisches und gesundheitsökonomisches Problem (Levey, Andreoli et al. 2007). Die Prävalenz von chronischen Nierenerkrankungen in der adulten Bevölkerung wird weltweit auf 10 bis 15 % geschätzt (Bruck, Stel et al. 2016, Girndt, Trocchi et al. 2016). In Industrienationen wie Deutschland werden CKD meist durch Diabetes und arterielle Hypertonie ausgelöst (Frei und Schober-Halstenberg 1999). Daneben sind vor allem primäre Nierenerkrankungen wie Glomerulonephritiden als ursächlich für die Entstehung chronischer Niereninsuffizienz zu nennen (Frei und Schober-Halstenberg 1999). CKD verlaufen in den Frühstadien klinisch inapparent (Currie und Delles 2013). Zeichen der chronischen Nierenschädigung ist ein Anstieg der laborchemischen Retentionsparameter Kreatinin und Cystatin C sowie harnpflichtiger Substanzen wie Harnstoff und Harnsäure. Der Anstieg des klinisch am häufigsten verwendeten Parameters zur Einschätzung der Nierenfunktion, Kreatinin, unterliegt einem blinden Bereich, so dass die CKD in diesem Bereich unentdeckt bleiben kann (Currie und Delles 2013). Häufig liegt in den Frühphasen der CKD eine Proteinurie bzw. Albuminurie vor, der eine zentrale Rolle in der Früherkennung der CKD zukommt (Currie und Delles 2013). Zudem ist die Proteinurie ein wichtiger prognostischer Marker für den Fortgang der Erkrankung selbst und für etwaig entstehende kardiovaskuläre Folgeerkrankungen. Das bedeutet, dass das Ausmaß der Proteinurie mit einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion sowie mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse wie Herzinfarkt und Schlaganfall stark assoziiert ist (Nitsch, Grams et al. 2013, Ou, Chen et al. 2016). Das Verständnis sowie die Therapie der Proteinurie sind demnach zentrale Aspekte experimenteller und klinischer Forschung.

## 1.2 Der glomeruläre Filter

Zwei der wichtigsten Funktionen der Niere sind die Reinigung des Blutes von harnpflichtigen Substanzen sowie die Ausscheidung von Flüssigkeit zur Volumenregulation. Gleichzeitig soll jedoch ein Verlust von körpereigenen Zellen und Proteinen verhindert werden. Hierfür ist eine regelrechte Filtration des Blutes am glomerulären Filter entscheidend. Die Harnproduktion erfolgt in den Nephronen, den funktionellen Untereinheiten der Niere. Pro Niere gibt es etwa eine Millionen Nephrone. Sie bestehen aus den Glomeruli und dem Tubulussystem. Die Glomeruli sind Gefäßkonvolute. Sie werden vom Vas afferens, dem aus der Nierenarterie gespeisten, zuführenden Blutgefäß, mit Blut versorgt. Hier wird das Blut dann durch den glomerulären Filter in die so genannte Bowman-Kapsel abgepresst. Das so entstandene Filtrat wird als Primärharn bezeichnet. An die Bowman-Kapsel schließt das komplexe Tubulussystem an.

Am Tag werden etwa 180 l Primärharn durch Filtration aus dem Blut produziert. Dieser ist physiologischer Weise fast komplett eiweißfrei. Durch Rückresorption und Sekretion wird die Zusammensetzung des Primärharns nun im Tubulussystem verändert.

Insgesamt resultiert dies in einer starken Konzentration des Harns, sodass letztendlich nur etwa ein bis zwei Liter Sekundärharn am Tag ausgeschieden werden.

Der glomeruläre Filter befindet sich zwischen den blutführenden Kapillarknäueln der Glomeruli sowie der Bowman-Kapsel. Hier finden sich drei Strukturen, die den glomerulären Filter bilden: das gefensterte Endothel der Kapillaren, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die darauf sitzenden Podozyten.

Das Gefäßendothel der Glomeruli besitzt Poren von 70-100 nm Größe (Tryggvason, Patrakka et al. 2006). An der luminalen Seite des Endothels findet sich eine Glykokalyxschicht aus negativ geladenen Sialoproteinen sowie Proteoglykanen (Tryggvason 1999).

Die GBM ist eine 300-350 nm dicke Schicht aus extrazellulärer Matrix. Hauptbestandteil ist hier das Glykoprotein Kollagen Typ IV, aus welchem ein dichtes Geflecht zur mechanischen Stabilisierung entsteht, an das weitere Proteine zur Vernetzung der Komponenten des glomerulären Filters andocken (Hudson, Reeders et al. 1993).

Podozyten werden als viszerale Blatt der Bowman-Kapsel bezeichnet und sind zur Harnseite des glomerulären Filters hin ausgerichtet. Am basalen Pol liegen die Podozyten der GBM auf, mit welcher sie durch Adhäsionsmoleküle wie Dystroglykan und Integrine verbunden sind (Kerjaschki 2001). Der apikale Pol reicht in das Lumen der Bowman-Kapsel hinein und hat Kontakt mit dem Harn (Kerjaschki 2001). Hier findet sich eine Glykokalyxschicht mit negativ geladenen Glykoproteinen wie vor allem Podocalyxin (Kerjaschki 2001).

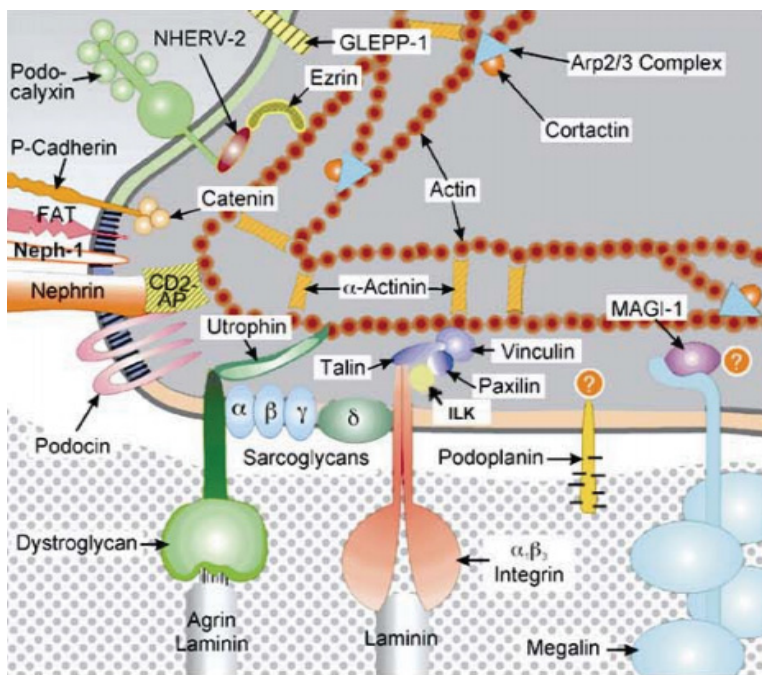
Vom Zellsoma der Podozyten gehen die namensgebenden Fußfortsätze ab (griechisch *πους*, *ποδος* = Fuß). Diese umwinden das Glomerulum in Form von Primär- und sich daraus verzweigenden Sekundärfortsätzen. Diese umschlingen die glomerulären Kapillarschlingen (Pavenstadt 1998). Zwischen den Enden der Sekundärfortsätze spannt sich die so genannte Schlitzmembran auf, welche die Fortsätze mehrerer Podozyten miteinander verbindet. Die Hauptfunktion des glomerulären Filters ist die Größen- sowie Ladungsselektion der Stoffe, welche in den Primärharn gelangen. Durch Verankerung der Podozyten untereinander an der Schlitzmembran entstehen im physiologischen Zustand Poren von etwa 30-40 nm Größe, welche geringfügig kleiner als das Markerprotein Albumin (etwa 60 kD) sind, sodass ein Übertritt von Albumin oder größeren Proteinen sowie von Blutzellen in den Primärharn nicht möglich ist (Rodewald und Karnovsky 1974). Die negativen Ladungseigenschaften aller drei Bestandteile des glomerulären Filters sorgen für eine Elektronendichte, sodass nur geringe Mengen an negativ geladenen Teilchen in den Primärharn gelangen können (Daniels, Deen et al. 1993, Drumond und Deen 1994).

### **1.2.1 Die podozytäre Schlitzmembran**

Bereits 1974 wurde die Schlitzmembran anhand transmissionselektronenmikroskopischer Untersuchungen von Rodewald et al. als reißverschlussartige (*zipper-like*) Anordnung von Strukturproteinen beschrieben (Rodewald und Karnovsky 1974). Diese verbindet wie oben beschrieben die podozytären Sekundärfortsätze und sorgt im Wesentlichen für die Größenselektivität des glomerulären Filters.

Nach der schrittweisen Identifizierung schlitzmembranärer Strukturproteine hat sich mittlerweile ein detailliertes Verständnis über die schlitzmembranäre Morphologie ergeben. Aufgrund des Vorkommens von ZO-1 (*Zonula occludens-1*), des transmembranären P-Cadherin sowie von  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Catenin gilt sie als modifizierte *Adherens junction* (Reiser, Kriz et al. 2000). Hierbei findet die Verankerung der P-Cadherin-Catenin-Komplexe über ZO-1 an das Aktinzytoskelett statt (Itoh, Nagafuchi et

al. 1997). Neben P-Cadherin finden sich noch weitere transmembranäre Proteine in der Schlitzmembran. Zu nennen sind das Cadherin ähnliche Protein FAT (Inoue, Yaoita et al. 2001) sowie Nephrin (Kestila, Lenkkeri et al. 1998) und das ihm ähnliche NEPH1 (Donoviel, Freed et al. 2001). Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten gehen miteinander in homophile Bindung und bilden so das Grundgerüst der Schlitzmembran (Tryggvason 1999). Das transmembranäre Nephrin bindet an das ebenfalls membranständige Podocin und wird über das CD2-assoziierte Protein (CD2AP) mit dem zytoskelettalen F-Actin verbunden (Schwarz, Simons et al. 2001). Nephrin wurde 1999 von Tryggvason als das Rückgrat der Schlitzmembran beschrieben (Tryggvason 1999). Dieses Modell hat bis heute Gültigkeit, auch wenn in den letzten Jahren immer mehr Strukturkomponenten der Schlitzmembran mittels Positionsklonierung identifiziert wurden.



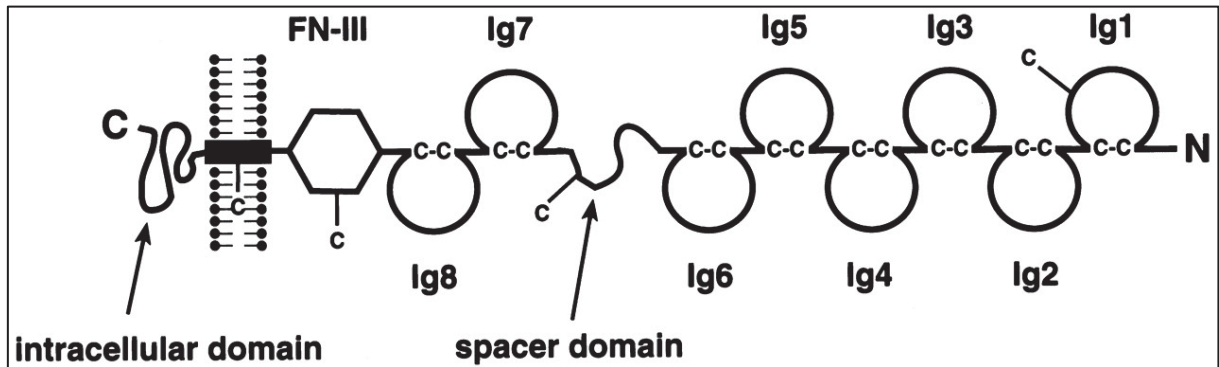
**Abb.1 Vereinfachte Darstellung der podozytären Strukturproteine** Die Verankerung des Podozyten an der GBM erfolgt vor allem über Dystroglycan sowie Integrine. Die transmembranären Proteine Nephrin, NEPH1, FAT sowie P-Cadherin bilden das Grundgerüst der Schlitzmembran. Nephrin bindet Podocin. Der Nephrin-Podocin-Komplex wird über CD2AP an Aktin gebunden. Verändert nach Kerjaschki (Kerjaschki 2001)

### 1.2.2 Nephrin

Nephrin gehört zur Proteinsuperfamilie der Immunglobuline und wird renal in Podozyten sowie in  $\beta$ -Zellen des Pankreas und einigen zerebralen Arealen exprimiert (Putaalaa, Soininen et al. 2001). Es handelt sich um ein transmembranäres Protein mit einer Größe von 180 kDa. Nephrin verfügt über einen N-terminalen, extrazellulären Teil, in welchem sich eine Fibronectin-Typ III-Domäne sowie acht Immunglobulindomänen finden (Tryggvason 1999). Nephrin bildet über homophile Dimere das Rückgrat der podozytären Schlitzmembran, indem membranständige Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten über die extrazellulären Immunglobulinmotive interagieren (Khoshnoodi, Sigmundsson et al. 2003). Außerdem wurde auch eine Heterodimerbildung mit NEPH1 im Bereich der Schlitzmembran beschrieben (Gerke, Huber et al. 2003).

Intrazellulär besitzt Nephrin neun Tyrosindomänen, an welchen Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden können (Holzman, St John et al. 1999).

Nephrin wird durch das NPHS-1 Gen kodiert, das 1998 durch Kestila et al. identifiziert wurde. Beim kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ ist das NPHS1-Gen mutiert (Kestila, Lenkkeri et al. 1998). Patienten mit dieser Mutation zeigen bereits *in utero* eine massive Proteinurie. Die Erkrankung führt zum Nierenversagen nach Geburt und verläuft unbehandelt letal (Huttunen 1976). Somit konnte gezeigt werden, dass die adäquate Funktion und Struktur von Nephrin essenziell für eine physiologische Nierenfunktion ist.



**Abb. 2 Schematische Darstellung des Nephrinmoleküls** mit extrazellulärer, transmembranärer und intrazellulärer Domäne. Der extrazelluläre, N-terminale Bereich ist charakterisiert durch insgesamt acht Immunglobulinmotive (Ig1-8) sowie eine Fibronektin-TypIII-Domäne (FN-III). Intrazellulär befinden sich am C-terminalen Ende Tyrosinreste als mögliche Phosphorylierungsstellen. Modifiziert nach Tryggvason (Tryggvason 1999)

### 1.3 Eph-Rezeptoren und ephrine

### 1.3.1 Allgemeines

Kommunikation von Zellen ist eine essenzielle Aufgabe des Organismus, um sich zu entwickeln und auf wechselnde Stimuli der Umwelt reagieren zu können. Rezeptortyrosinkinasen sind ein wichtiger Teil dieser zellulären Kommunikation und ermöglichen die Übermittlung von Informationen bei externer Aktivierung nach intrazellulär.

Eph-Rezeptoren repräsentieren die größte Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (Kullander und Klein 2002). Sie wurden erstmals 1987 in einer Leberzelllinie („*erythropoietin-producing hepatocellular cell line*“) isoliert. Hieraus resultierte die Namensgebung der neu entdeckten Rezeptoren (Hirai, Maru et al. 1987). Die Liganden der Eph-Rezeptoren werden ephrine genannt. Wie ihre Rezeptoren sind auch die ephrine membranständige Proteine. Die Eph-Rezeptoren werden in die zwei Klassen A und B unterteilt. Diese Einteilung basiert auf ihrem Bindungsverhalten zu Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) tragenden ephrinen der Klasse A bzw. transmembranären ephrinen der Klasse B mit zytoplasmatischem Anteil (Kullander und Klein 2002). Insgesamt unterscheidet man zehn Typen der Klasse A (EphA1-A10) und sechs Typen der Klasse B (EphB1-B6). Beim Menschen ist bislang die Expression von EphA9 und EphB5 nicht nachgewiesen worden. Alle anderen Eph-Rezeptoren kommen im menschlichen Organismus vor (Kullander und Klein 2002). Die Bindung von Eph-Rezeptoren und ephrinen innerhalb der Klassen erfolgt promiskuitiv. EphA4 kann auch ephrine der Klasse B binden (Kullander und Klein 2002). EphrinA5 aktiviert neben EphA-Rezeptoren auch EphB2 (Himanen, Chumley et al. 2004).

Die Effekte, die durch die Interaktion von Eph-Rezeptoren und ephrinen vermittelt werden, basieren zumeist auf einer Repulsion (Abstoßung) bzw. Adhäsion (Anhaftung) von Zellen (Klein 2012). Dies wird vor allem durch Interaktion von Eph-Rezeptoren und

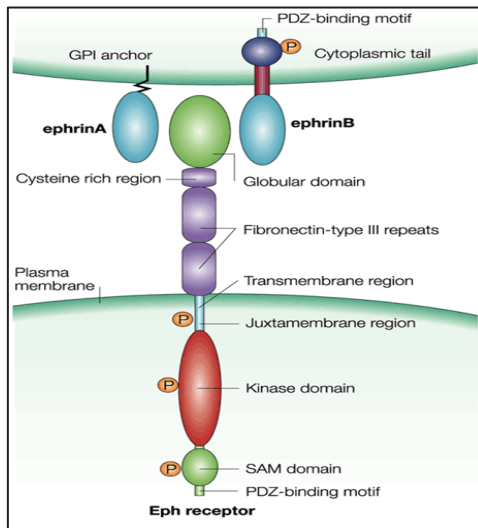
ephrinen mit dem Zytoskelett und somit ausgelöster Zellkontraktilität ermöglicht. Bekannt ist die zentrale Rolle des Eph/ephrin-Signalwegs bei der Entstehung der retinalen Karte (Klein 2012). Durch Zellrepulsion wird hierbei das zielgerichtete Axonwachstum, die *Axonguidance*, initiiert und die korrekte Positionierung am Ende des neuronalen Entstehungsprozesses vermittelt (Klein 2012). In ähnlicher Weise spielt EphA4 bei der Entstehung des kortikospinalen Trakts, einer Verbindung zwischen Großhirn und Rückenmark, eine zentrale Rolle (Klein 2012). Während der Entstehung des zerebralen Kortex wird durch Eph/ephrin-Signalwege die Zellmigration ausgelöst und gesteuert. Grenzen zwischen unterschiedlichen funktionellen Zellpopulationen werden durch Eph/ephrin-Aktivität ausgebildet und aufrechterhalten (Cramer und Miko 2016). Während der Angiogenese ist vor allem die Interaktion von EphB4 und ephrinB2 gut erforscht. Die Interaktion von Rezeptor und Ligand führt sowohl durch Zellrepulsion zur Ausbildung von Blutgefäßen als auch im weiteren Verlauf zur Entstehung einer Hierarchie der Blutgefäße durch Verschmelzung von Kapillaren (Mosch, Reissenweber et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass Eph-Rezeptoren und ephrine in vielen Krebszellen hochreguliert sind und somit zur gesteigerten Zellproliferation und -migration führen (Mosch, Reissenweber et al. 2010). Im gesunden, adulten Gewebe ist die Expression von Eph-Rezeptoren hingegen in der Regel herunterreguliert und wird nur bei reaktiven Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung gesteigert (Janes, Adikari et al. 2008).

Eph-Rezeptoren werden bezugnehmend auf 1.2.1 an *Adherens Junctions* exprimiert (Buchert, Schneider et al. 1999). Eine Überexpression von EphA2 konnte mit einer Destabilisierung der *Adherens Junction* in humanen Mammazellen in Verbindung gebracht werden (Fang, Ireton et al. 2008).

### 1.3.2 Molekularer Aufbau von Eph-Rezeptoren

Sowohl Eph-Rezeptoren als auch ephrine sind membranständige Proteine. Eph-Rezeptoren sind transmembranäre Proteine mit extrazellulärer, transmembranärer und intrazellulärer Domäne. Extrazellulär verfügen sie über eine immunglobulinähnliche Domäne, an welcher die Ligandenbindung stattfindet. Es schließen sich eine cysteinreiche Domäne als potenzielle Bindungsstelle zu weiteren, membranständigen Proteinen sowie zwei Fibronectin-TypIII-*Repeats* an (Kullander und Klein 2002). Intrazellulär besitzen Eph-Rezeptoren eine juxtramembranäre Domäne mit Phosphorylierungsstellen, eine große Tyrosinkinasedomäne, ein *sterile alpha-motif* (SAM) sowie eine *Post-synaptic-density-protein 95*-, *Discs-large-homolog*- und *Zonula occludens 1*-Domäne (PDZ-Domäne). Über das SAM kann eine Oligomerisierung von Eph-Rezeptoren stattfinden. Die PDZ-Domäne ist eine potenzielle Bindungsstelle für weitere intrazelluläre Proteine (Kullander und Klein 2002).

Während ephrine der Klasse A mittels eines GPI-Ankers an der Zellmembran verankert sind, durchspannen die ephrine der Klasse B die Zellmembran und verfügen über eine intrazelluläre Domäne, sind also auch transmembranäre Proteine (Kullander und Klein 2002). Extrazellulär findet sich die Bindungsstelle für die Eph-Rezeptoren (Rezeptor bindende Domäne). Ephrine der Klasse B besitzen zudem einen intrazellulären Anteil, welcher Tyrosinreste als potenzielle Phosphorylierungsstellen sowie eine PDZ-Motiv aufweist (Kullander und Klein 2002).



**Abb. 3 Molekularer Aufbau von Eph-Rezeptoren und ephrinen** ephrinA mit extrazellulärer Domäne sowie dem mit der Zellmembran verknüpfenden GPI-Anker, ephrinB mit extrazellulärer und intrazellulärer Domäne. Hier findet sich ein PDZ-Motiv sowie Phosphorylierungsstellen. Modifiziert nach Klein et al. (Kullander und Klein 2002)

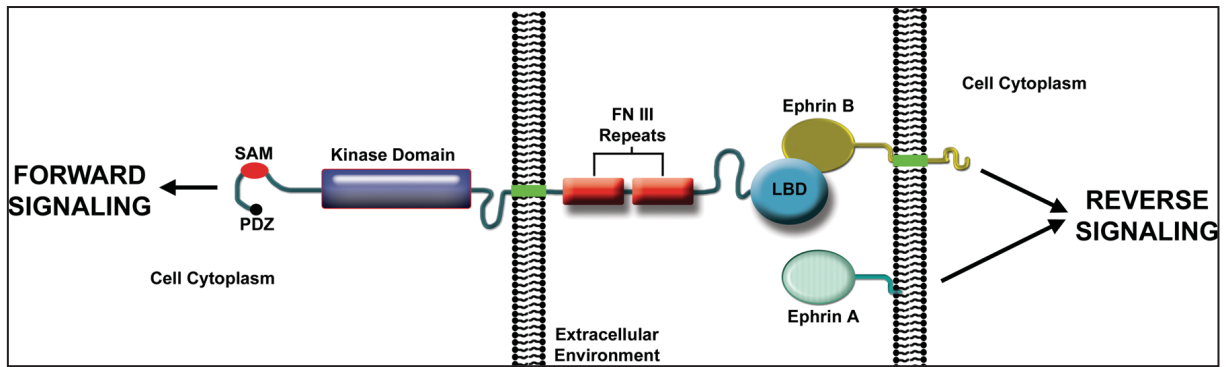
### 1.3.3 Signaltransduktion und Eph-ephrin vermittelte Zelladhäsion und -repulsion

EphB-Rezeptoren und ephrine gehen miteinander in Bindung, während sie in der Zellmembran benachbarter Zellen verankert sind (Pasquale 2008). Die Bindung erfolgt vornehmlich an der aminoterminalen, ephrin bindenden Domäne der Eph-Rezeptoren (Noren und Pasquale 2004). Hier existieren neben der Hauptbindungsstelle zwei weitere Domänen, die ephrine mit niedrigerer Affinität binden können. Weitere Bindungsstellen für ephrine finden sich in der Cystein-reichen Domäne sowie der Fibronectin-TypIII-Domäne (Pasquale 2008). Im inaktiven Zustand wird die intrazelluläre Tyrosinkinasedomäne der Eph-Rezeptoren vor allem durch Interaktionen mit der juxtamembranären Region autoinhibiert. Bindet nun ein ephrin an den Eph-Rezeptor wird durch Autophosphorylierung des Rezeptors diese inhibierende Wirkung aufgehoben. Bindungsstellen für Proteine der nachgeschalteten Signalkaskade werden freigegeben. Durch Phosphorylierung dieser Proteine wird dann die Signaltransduktion eingeleitet (Noren und Pasquale 2004). Es konnte gezeigt werden, dass für eine wirkungsvolle Phosphorylierung und Zellantwort ein so genanntes *Clustering*, also eine Oligomerisierung von Eph-Rezeptoren und ephrinen notwendig ist. So zeigt sich erst bei Tetramerisierung von Rezeptoren und Liganden eine merkbare Phosphorylierung und somit eine effektvolle Signaltransduktion (Janes, Nievergall et al. 2012). Im inaktiven, nicht ligandengebundenen Zustand liegen Eph-Rezeptoren verteilt über die Zellmembran verteilt vor. Durch Ligandenbindung kommt es zur Bildung von Oligomeren, welche eine Verstärkung der autophosphorylierenden Prozesse nach sich zieht und so die zelluläre Antwort verstärkt (Janes, Nievergall et al. 2012). Die Bindung von Eph-Rezeptoren und ephrinen zu *Clustern* erfolgt vor allem an den cysteinreichen Domänen, den Fibronectin-TypIII-Repeats sowie den PDZ-Domänen (Noren und Pasquale 2004). Eine Besonderheit des Eph-ephrin-Signalweges ist das so genannte bidirektionale *Signaling* (Pasquale 2008). Das bedeutet, dass nach Rezeptoraktivierung neben der Signalübermittlung in die Rezeptor-tragende Zelle (*forward signaling*) auch eine Aktivierung der Signaltransduktion in der Liganden-tragenden Zelle erfolgt (*reverse signaling*). Die Signaltransduktion in die ephrin-tragende Zelle wird hierbei durch die intrazellulären Phosphorylierungsstellen der ephrine der Klasse B vermittelt. Bei

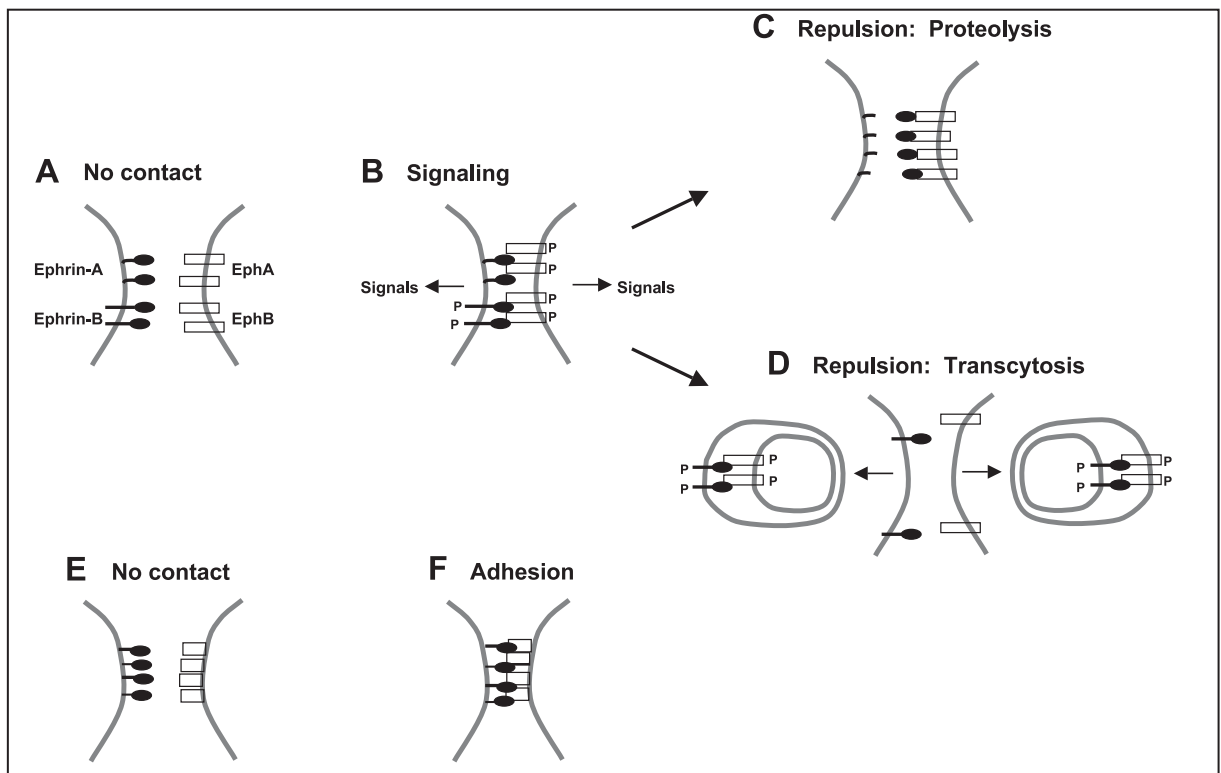
ephrinen der Klasse A geschieht dies über Interaktion mit weiteren membranständigen Proteinen (Pasquale 2008).

Im Weiteren sollen vor allem die durch Eph/ephrin-Interaktion vermittelten Effekte auf das Zytoskelett und die dadurch ausgelöste Repulsion (Abstoßung) bzw. Adhäsion (Anhaftung) zwischen Eph- und ephrin-tragender Zelle eingegangen werden. Nach der Bindung von Eph-Rezeptor und ephrin erfolgt durch oben beschriebene Prozesse eine Phosphorylierung von Rezeptor und Ligand. Währenddessen befinden sich die Zellen in Kontakt und sind adhären. Nach Signaltransduktion kommt es zu einer Repulsion der Zellen (Noren und Pasquale 2004). Während die Bindung von Eph und ephrin bei EphB/ephrinB-Interaktion durch Endozytose des Rezeptor-Liganden-Komplexes in beide Zellen (so genannte Transzytose) beendet wird und es somit zur Abstoßung der Zellen kommt, wird bei EphA/ephrinA-Interaktion die Rezeptor-Ligand-Bindung durch Aktivität von Metalloproteasen beendet (siehe Abb. 5). Bei fehlenden intrazellulären Domänen von Eph-Rezeptor und ephrin bleibt die Repulsion der Zellen aus, was durch die fehlende Phosphorylierung an der Tyrosinkinasedomäne der Eph-Rezeptoren und den Phosphorylierungsstellen der B-ephrine bedingt ist (Noren und Pasquale 2004). Dies gilt beispielsweise für EphB2/ephrinB1. Bei anderem Rezeptor-Liganden-Besatz kann auch regelhaft eine Adhäsion vermittelt werden (Noren und Pasquale 2004).

Das verbindende Glied zwischen Eph-Rezeptoren und zytoskelettalen Proteinen wie Aktin und Myosin sind GTP-asen (GTP = Guanosintriphosphat). GTP-asen sind Proteine, welche im GDP (Guanosindiphosphat) gebundenen Zustand inaktiv und im GTP gebundenen Zustand aktiviert sind. In Bezug auf Eph/ephrin vermittelte Prozesse spielen vor allem GTP-asen der Rho-Familie eine entscheidende Rolle. Sie sind Regulatoren Aktin vermittelter Kontraktilität und Dynamik von Zellen. Die drei bekanntesten GTP-asen der Rho-Familie sind Rho (*Ras homologue 1*), Rac1 (*Ras related C3 botulinum toxin substrate 1*) sowie Cdc-42 (*cell division control protein 42 homologue*) (Noren und Pasquale 2004). Die Aktivierung dieser GTP-asen erfolgt über Guaninnukleotidaustauschfaktoren, welche GDP durch GTP ersetzen. Vertreter dieser Austauschfaktoren sind Intersektin und Kalirin. Intersektin bindet an EphB2 auch im nicht aktivierten Zustand und wird durch dieses aktiviert. Cdc-42 wird daraufhin aktiviert und stellt über den Aktinpolymerisierungskomplex Arp 2/3 (*actin related proteins Arp2 and Arp3 complex*) eine direkte Verbindung zum Aktinzytoskelett her. So wird letztlich das Wachstum des Dendriten bzw. des Axon im neuronalen Entstehungsprozess ausgelöst. Durch Interaktion von ephrinB1 mit EphB2 wird Kalirin in direkter Umgebung der entstandenen Eph-Cluster rekrutiert. EphrinB1 vermittelte EphB2-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von Kalirin und setzt so die Signalkaskade mittels Rac1-Aktivität in Gang (Noren und Pasquale 2004). Diese Interaktion von EphB2 und ephrinB1 ist im Hippocampus nachgewiesen worden. Ähnliche Effekte wurden durch Interaktion von Eph-Rezeptoren mit G-Proteinen beschrieben. Diese besitzen eine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Die  $\alpha$ -Einheit besitzt GTP-ase-Aktivität und wird durch Austausch von GDP mit GTP aktiviert. Neben Aktivierung von GTP-asen durch Eph-Rezeptoren konnte auch eine Aktivierung des Rho-Signalwegs durch ephrinB1 nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Eph-vermittelten Prozessen führt die Aktivierung von GTP-asen durch ephrin jedoch zumeist zu Zelladhäsion (Pasquale 2008).



**Abb. 4 Bidirektionales Signaling bei Interaktion von Eph-Rezeptoren und ephrinen** Nach Rezeptor-Liganden-Bindung an den extrazellulären Proteindomänen kommt es neben einer Signalübermittlung in die Eph-tragende Zelle (*forward Signaling*) zudem zu einer Signaltransduktion in der ephrin-tragenden Zelle (*reverse Signaling*). Modifiziert nach Pasquale (Pasquale 2008)



**Abb. 5 Zellinteraktion bei Bindung von Eph-Rezeptor an ephrin** Eph/ephrin-vermittelte Repulsion von Zellen aufgrund von Proteolyse bei A-ephrinen (C) bzw. Transzytose bei B-ephrinen (D), ausbleibende Repulsion bei fehlenden zytoplasmatischen Anteilen der Proteine (E,F). Modifiziert nach Noren und Pasquale (Noren und Pasquale 2004)

#### 1.4 Eph-Rezeptoren und ephrine in der Niere

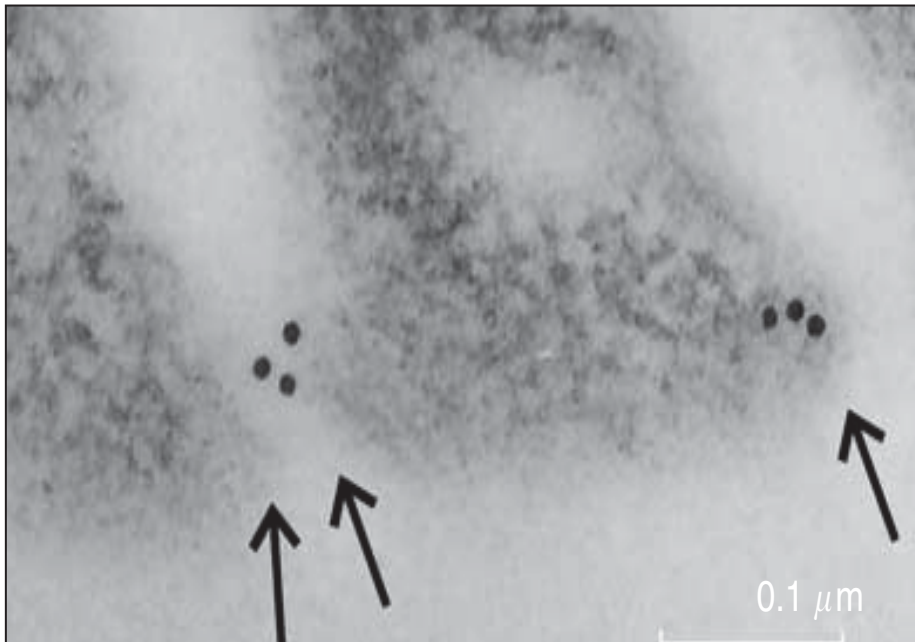
Bisher existieren wenige Arbeiten, welche sich mit dem Einfluss von Eph-Rezeptoren und ephrinen auf die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse in der Niere beschäftigen.

Nach renaler Ischämie konnte eine tubuläre Hochregulierung von EphA2 im Rahmen der Reperfusion belegt werden (Baldwin, Chen et al. 2006).

Im Glomerulum konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor EphB4 im Rahmen der reaktiven Prozesse bei der Thy 1.1-Nephritis (Thy 1 = CD90, *cluster of differentiation 90*)

eine zentrale Rolle spielt (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). Die Thy1.1-Nephritis ist ein Modell für eine mesangioproliferative Glomerulonephritis. Hierbei kommt es durch Mesangiolyse sowie durch Zytokin vermittelte, glomeruläre Inflammation rasch zur Proteinurie und Nierenschädigung (Wan, Sun et al. 2007). EphB4 sowie seine ephrin-Liganden (vor allem ephrinB2) werden in den Glomeruli gesunder Ratten exprimiert. Nach Induktion der Nephritis zeigt sich eine Hochregulation der Expression von EphB4 und seiner ephrin-Liganden. An Tag neun nach Beginn der Erkrankung kommt es neben der Phosphorylierung der ephrine zudem zu einer massiven Phosphorylierung von EphB4 (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). Die ephrin-Liganden zeigen eine Bindung zum schlitzmembranären Protein Podocin sowohl im gesunden als auch im nephritischen Zustand. Durch Inhibition des EphB4-Signalwegs mittels NPV-BHG712, einem spezifischen Antagonisten von EphB4, kommt es in den Ratten zu stärkerer Proteinurie, ausbleibender Angiogenese und mesangialer Rekonstitution sowie zu Podozytenschäden (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012).

Hashimoto et al. konnten die Expression des Liganden ephrinB1 in unmittelbarer Nähe zur Schlitzmembran immunelektronenmikroskopisch nachweisen (Hashimoto, Karasawa et al. 2007). EphrinB1 zeigte sich hier in direkter Umgebung der schlitzmembranären Markerproteine Nephrin und CD2AP (Immunfluoreszenzmikroskopie, s. Abb. 6). Weiterführend konnte die gleiche Arbeitsgruppe zeigen, dass der Knock-Out von ephrinB1 in Podozyten-*Effacement* (Strukturverlust), Proteinurie sowie in Umverteilung der schlitzmembranären Proteine Nephrin und ZO-1 mündet. Es konnte so impliziert werden, dass ephrinB1 wichtig für die korrekte Positionierung schlitzmembranärer Proteine ist (Fukusumi, Zhang et al. 2018). Weiterführend konnte belegt werden, dass ephrinB1 an Nephrin bindet (Immunpräzipitation). Diese Bindung fand an den extrazellulären Proteindomänen und insbesondere an der Immunglobulindomäne acht (Ig8) von Nephrin statt. Durch extrazelluläre Stimulation von Nephrin durch einen spezifischen Nephrinantikörper kam es zur so genannten ANA (*anti-nephrin-antibody*) induzierten Nephropathie. Die Behandlung mit diesem Antikörper führte zur Phosphorylierung von Nephrin und auch von Nephrin bindendem ephrinB1. EphrinB1-Phosphorylierung bedingte die Phosphorylierung von *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), was in einer gesteigerten Zellmotilität mündete. Während sich im physiologischen Zustand eine deutliche Co-Lokalisation von ephrinB1 und Nephrin zeigte, lagen die Proteine bei ANA induzierter Nephropathie dissoziiert über der Zelloberfläche vor. Letztlich konnte so gezeigt werden, dass ephrinB1 eine Rolle in der Pathogenese podozytärer Schädigung spielt (Fukusumi, Zhang et al. 2018). Unsere Arbeitsgruppe konnte mittels PCR-Untersuchungen belegen, dass EphB1-B3 sowie ephrinB1-B3 in humanen Podozyten exprimiert werden. Zudem wurde von uns gezeigt, dass Nephrin und EphB2 aneinander binden und dass Nephrin durch EphB2 phosphoryliert wird.



**Abb. 6 Nachweis von ephrinB1 in unmittelbarer Nähe der Schlitzmembran** Immunelektronenmikroskopische Darstellung von  $\alpha$ -ephrinB1 (Ziege) gebundenen Goldpartikeln an der schlitzmembranären Podozytendomäne (Pfeile). Modifiziert nach Hashimoto et al. (Hashimoto, Karasawa et al. 2007)

### 1.5 Fragestellung der Arbeit

Aufgrund der Expression des Liganden ephrinB1 an der glomerulären Schlitzmembran (Hashimoto, Karasawa et al. 2007) sowie der Expression von EphB4-Rezeptoren in Podozyten (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012) sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst die Expression von EphA- und EphB-Rezeptoren sowie den Liganden ephrinA1, A2 und B1 in humanen Podozyten sowie murinen Glomeruli geklärt werden.

Die Interaktion von EphB2-Rezeptoren und ephrinB1 führt in neuronalen Zellen zur Zellrepulsion (Noren und Pasquale 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich EphB2-Rezeptor tragende Podozyten in Kokultur mit ephrinB1-tragenden Podozyten verhalten. Diese Fragestellung sollte anhand von sich in Differenzierung befindlichen Podozyten sowie von ausdifferenzierten Podozyten mit Hilfe von *Live Cell Imaging* untersucht werden.

Wie in der Einleitung beschrieben sind EphB-Rezeptoren und ephrinB-Liganden transmembranäre Proteine mit einem essenziellen zytoplasmatischen Anteil (Kullander und Klein 2002). Nach Untersuchung der EphB2- und ephrinB1-Wildtyp-tragenden Podozyten in Kokultur sollte im Folgenden die Rolle der intrazellulären Domänen von EphB2 und ephrinB1 für die Zell-Zell Interaktion von Podozyten untersucht werden. Diese Untersuchungen sollten mit Mutanten von EphB2 und ephrinB1 ohne zytoplasmatischen Anteil durchgeführt werden.

In Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das Schlitzmembranprotein Nephrin mit EphB2-Rezeptoren interagiert und von diesen phosphoryliert wird. Nach Untersuchung der Zell-Zell Interaktion von EphB2 und ephrinB1 tragenden Podozyten sollte mittels Immunfluoreszenz die zelluläre Lokalisation von EphB2 bei Co-Expression mit Nephrin untersucht werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Zellen

- HEK293T (*human embryonal kidney*) Zellen: Menschliche Nierenzellen mit transformierten Anteilen von Adenovirus 5 (Shein und Enders 1962)
- Cos7-Zellen: SV-40 (Simian-Virus 40) immortalisierte renale Fibroblasten aus grünen Meerkatzen (Jensen, Girardi et al. 1964)
- Humane Podozyten AB 8/13 II (zur Verfügung gestellt von M. Salem, Bristol, UK): Immortalisierte Podozyten mit hitzesensitivem Promotor (Saleem, O'Hare et al. 2002)

### 2.2 Plasmide

|                                                                                                                      |                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| cdm-Plasmide<br>cdm8<br>cdm.sIg<br>cdm.sIg.Nephrin.cyt<br>cdm.Nephrin.WT                                             | Ampicillin und Tetracyclin-Resistenz                                                                                                          |
| pcDNA-Plasmide<br><br>pcDNA V5. $\beta$ -arrestin 2<br>pcDNA V5. Podocin<br>pcDNA V5. EphB1<br>pcDNA V5. EphB2       | Ampicillinresistenz,<br>Life Technologies, Darmstadt (D)                                                                                      |
| pjK-Plasmide<br><br>pjK12 EphB2 YFP<br>pjK18 EphB2 $\Delta$ C YFP<br>pjK30 ephrinB1 CFP<br>pjK32 ephrinB1 $\Delta$ C | pcDNA-Vektoren, Ampicillinresistenz<br>zur Verfügung gestellt von R. Klein, Max-Planck-Institut<br>(Martinsried) (Zimmer, Palmer et al. 2003) |
| prKJ-Plasmide<br>prKJ EphB2 YFP<br>prKJ EphB2 $\Delta$ C YFP                                                         | pcDNA-Vektoren, Ampicillinresistenz                                                                                                           |

|                        |                                                                                                                                               |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pQCXIP-Plasmide        | CloneTech, Saint-Germain-en-Laye (F),<br>retroviraler Vektor zur Transduktion von Zellen,<br>Ampicillinresistenz, Selektionsmarker: Puromycin |
| pQCXIP EphB2 YFP       |                                                                                                                                               |
| pQCXIP EphB2 ΔC YFP    |                                                                                                                                               |
| pQCXIP ephrinB1 CFP    |                                                                                                                                               |
| pQCXIP ephrinB1 ΔC CFP |                                                                                                                                               |
| pHIT 60                | Vektor, kodierend für virale Partikel zum <i>Packaging</i><br>von DNA bei viraler Transduktion (Soneoka, Cannon et<br>al. 1995)               |
| pHIT-G                 | Vektor, kodierend für virale Partikel zum <i>Packaging</i><br>von DNA bei viraler Transduktion (Fouchier, Meyer et<br>al. 1997)               |

## 2.3 Antikörper

Antikörper für Western-Blot wurden gelöst in Proteinwaschpuffer (2.9).

Antikörper für Immunfluoreszenz wurden gelöst in 4 % BSA in PBS.

| Antikörper                    | Eigenschaften                                                           | Verdünnung   | Hersteller                                          |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------|
| $\alpha$ -mouse               | <i>polyclonal<br/>goat IgG<br/>conjugated with HRP</i>                  | WB: 1:10.000 | Dako<br>(Hamburg, D)                                |
| $\alpha$ -mouse 633           | <i>polyclonal<br/>goat IgG<br/>conjugated with<br/>AlexaFluor 633</i>   | IF: 1:1000   | Invitrogen by<br>LifeTechnologies<br>(Darmstadt, D) |
| $\alpha$ -goat                | <i>polyclonal<br/>rabbit IgG<br/>conjugated with HRP</i>                | WB: 1:7.500  | Dako<br>(Hamburg, D)                                |
| $\alpha$ -guinea pig          | <i>polyclonal<br/>donkey IgG<br/>conjugated with HRP</i>                | WB: 1:20.000 | Merck-Millipore<br>(Darmstadt, D)                   |
| $\alpha$ -guinea pig TexasRed | <i>polyclonal<br/>goat IgG<br/>conjugated with<br/>TexasRed</i>         | IF: 1:500    | Jackson Immo<br>Research<br>(Suffolk, UK)           |
| $\alpha$ -guinea pig 647      | <i>polyclonal<br/>donkey IgG<br/>conjugated with<br/>AlexaFluor 647</i> | IF: 1:500    | Jackson Immo<br>Research<br>(Suffolk, UK)           |
| $\alpha$ -rabbit              | <i>polyclonal<br/>goat IgG<br/>conjugated with HRP</i>                  | WB: 1:20.000 | Santa Cruz<br>Biotechnology<br>(Heidelberg, D)      |

|                               |                                                       |                        |                                                |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------|
| $\alpha$ -rabbit TexasRed     | <i>polyclonal donkey IgG conjugated with TexasRed</i> | IF: 1:500              | Jackson Immo Research (Suffolk, UK)            |
| $\alpha$ -human IgG           | <i>polyclonal sheep IgG conjugated with HRP</i>       | WB: 1:500              | GE Life Science (Solingen, D)                  |
| $\alpha$ -EphA1               | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -EphA2               | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -EphA3               | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -EphB1               | <i>monoclonal mouse IgG</i>                           | WB: 1:500              | Cell Signalling (Cambridge, UK)                |
| $\alpha$ -EphB2               | <i>monoclonal goat IgG</i>                            | WB: 1:500              | RD Systems (Minneapolis, USA)                  |
| $\alpha$ -EphB3               | <i>monoclonal mouse IgG</i>                           | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -ephrinA1            | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -ephrinA2            | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | WB: 1:200              | Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)       |
| $\alpha$ -ephrinB1            | <i>monoclonal goat IgG</i>                            | WB: 1:500              | RD Systems (Minneapolis, USA)                  |
| $\alpha$ -V5                  | <i>monoclonal mouse IgG</i>                           | WB: 1:5.000            | Invitrogen by Life Technologies (Darmstadt, D) |
| $\alpha$ -V5                  | <i>monoclonal mouse IgG</i>                           | IF: 1:50               | Serotec (Puchheim, D)                          |
| $\alpha$ -nephrin             | <i>monoclonal guinea pig IgG</i>                      | WB: 1:250<br>IF: 1:100 | Progen (Heidelberg, D)                         |
| $\alpha$ -phosphotyrosin 4G10 | <i>monoclonal rabbit IgG</i>                          | IF: 1:50               | Merck-Millipore (Darmstadt, D)                 |

**Tabelle 1** Verwendete Antikörper mit Konzentrationen

## 2.4 Geräte

Bio Photometer

Eppendorf,  
Hamburg (D)

CO<sub>2</sub>-Controller  
für *Live Cell Imaging*

Visitron Systems GmbH,  
Puchheim (D)

F25 Wasserbad mit ME Steuereinheit  
für *Live Cell Imaging*

Julabo, Seelbach (D)

|                                                                                                       |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Fluoreszenzlampe mbq 52 ac-z/31026J                                                                   | LEJ, Jena (D)                          |
| Heraeus™ Brutschrank B12 <i>Function Line</i><br>für Bakterien                                        | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Heraeus™ Brutschrank Hera safe HS 12<br>für Zellen                                                    | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Heraeus™ Brutschrank safe KS 18-1/PE-AC<br>für Zellen                                                 | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| <i>Imager FluorChem FC 2 Multiimage Light<br/>Cabinet Filter Positions</i>                            | Alpha Innotech,<br>Santa Clara (US)    |
| <i>IP-Shaker<br/>Labquake Shaker Rotisserie</i>                                                       | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Kamera <i>Spot Pursuit</i> mit 1,0 x Objektiv                                                         | Visitron Systems GmbH,<br>Puchheim (D) |
| Mikroskop Axiovert 40CFL<br>für Zellkultur                                                            | Zeiss,<br>Oberkochen (D)               |
| Mikroskop Zeiss Axio <i>Observer Z1</i><br>für Fluoreszenzmikroskopie und<br><i>Live Cell Imaging</i> | Visitron Systems GmbH,<br>Puchheim (D) |
| Mikrowelle NN-E202-CB                                                                                 | Panasonic,<br>Kadoma (J)               |
| Mini <i>SubCell</i> GT<br>Kammer für Agarosegelelektrophorese                                         | Bio Rad,<br>München (D)                |
| Mini-Protean Tetra <i>Cell</i><br>SDS-Elektrophoresekammer                                            | Bio Rad,<br>München (D)                |
| Mini-Trans-Blot <i>Cell</i>                                                                           | Bio-Rad,<br>München (D)                |
| MJ Resarch™ PTC-200 <i>Peltier Thermal<br/>Cycler</i>                                                 | Bio Rad,<br>München (D)                |
| Objektiv EC Plan-Neofluar 63x/1m25 Oil                                                                | Zeiss,<br>Oberkochen (D)               |
| Objektiv EC Plan-Neofluar 20x/0,5 Ph2<br>$\infty/0,17$                                                | Zeiss,<br>Oberkochen (D)               |
| Pharmacia™ <i>Electrophoresis Power Supply</i>                                                        | GE Life Science,                       |

|                                                          |                                        |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| EPS 600                                                  | Solingen (D)                           |
| <i>Power Pac Universal</i> für Elektrophorese            | Bio Rad, München (D)                   |
| Pipettierhilfe <i>Easypet</i>                            | Eppendorf,<br>Hamburg (D)              |
| Shaker <i>rocky plattform</i>                            | VWR, Darmstadt (D)                     |
| Shaker IKA HS 260 <i>control</i>                         | IKA, Staufen (D)                       |
| Shaker <i>Minisee-Sawrocker</i> SSM4                     | Stuart, Burlington (US)                |
| Shaker Rocky 3D                                          | Stuart, Burlington (US)                |
| TempControl 37-2 digital<br>für <i>Live Cell Imaging</i> | Visitron Systems GmbH,<br>Puchheim (D) |
| Thermomixer Comfort                                      | Eppendorf,<br>Hamburg (D)              |
| Vortexer REAX <i>control</i>                             | Heidolph,<br>Schwabach (D)             |
| Wärmeschrank Modell 200 D06058                           | Memmert,<br>Schwabach (D)              |
| Wasserbad 1002                                           | GFL, Burgwedel (D)                     |
| Wasserbad WB22                                           | Memmert,<br>Schwabach (D)              |
| Heraeus™ Hera <i>Safe</i> KS18<br>Sicherheitswerkbank    | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Heraeus™ Hera <i>Safe</i> HS12<br>Sicherheitswerkbank    | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Zentrifuge Heraeus™ Multifuge™ 4KR                       | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Zentrifuge Heraeus™ Pico21 <i>centrifuge</i>             | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D) |
| Zentrifuge Modell 5417R                                  | Eppendorf,<br>Hamburg (D)              |
| Zentrifuge Rotixa/RP 4200<br>für Zellkultur              | Hettich,<br>Tuttlingen (D)             |

## 2.5 Verbrauchsmaterialien

|                                                                                                                |                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0,5 ml und 2 ml Safe Lock <i>Tubes</i>                                                                         | Eppendorf, Hamburg (D)                  |
| 1,5 ml Safe Seal Gefäße                                                                                        | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| 15 ml und 50 ml CellStar® <i>Tubes</i>                                                                         | Greiner Bio-One,<br>Frickenhausen (D)   |
| 10cm Schalen<br><i>Cell Culture Dish</i> 100 mm x 20 mm <i>Style treated Polystyren, non-pyrogenic sterile</i> | Corning Life Science,<br>Amsterdam (NL) |
| 6-Well <i>Coster Cell Culture Plate non-pyrogenic, Polystyren</i>                                              | Corning Life Science,<br>Amsterdam (NL) |
| 12-Well <i>Coster Cell Culture Plate non-pyrogenic, Polystyren</i>                                             | Corning Life Science,<br>Amsterdam (NL) |
| Aspirationspipette steril 2ml                                                                                  | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| Biosphere <i>Filter Tips</i> 0,5-20 µl, 2-200 µl und 100-10000 µl                                              | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| Deckgläser 12 mm Durchmesser                                                                                   | VWR, Darmstadt (D)                      |
| Filter mit 0,45 µm Porengröße<br><i>non-pyrogenic, sterile</i>                                                 | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| Nalgene® <i>Cryo Freezing Container</i> -1 °C/h                                                                | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D)  |
| Neubauer <i>Improved Zählkammer</i>                                                                            | Marienfeld,<br>Lauda-Königshofen (D)    |
| Nunc Lab-Tek® <i>Chambered coverglasses</i> 2 Well                                                             | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D)  |
| Nunc® <i>Thermo Cryo Tube Vials</i>                                                                            | Thermo Scientific,<br>Braunschweig (D)  |
| Pipettenspitzen 20, 200 und 1000 µl                                                                            | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| Serologische Pipetten 5, 10 und 25 ml                                                                          | Sarstedt, Nümbecht (D)                  |
| Sterile Pipetten Costar® <i>Stripette</i> 5, 10 und 25 ml                                                      | Corning Life Science,<br>Amsterdam (NL) |

T25-Flaschen: Nunc® EasyFlask  
Nunclon Delta *Surface* 25 cm<sup>2</sup>

Thermo Scientific,  
Braunschweig (D)

T75-Flaschen: Nunc® EasyFlask  
Nunclon Delta *Surface* 75 cm<sup>2</sup>

Thermo Scientific,  
Braunschweig (D)

## 2.6 Reagenzien

ATP (Adenosintriphosphat)

Sigma, Taufkirchen (D)

Bromphenolblau Na-Salt

Serva, Heidelberg (D)

BSA (Bovines Serum Albumin)

VWR, Darmstadt (D)

CHAPS  
(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat)

Sigma, Taufkirchen (D)

*Complete* Mini Proteaseinhibitor Tabletten  
EDTA-free

Roche, Mannheim (D)

D(+)-Glucose

AppliChem, Darmstadt (D)

DTT (Dithiothreitol) 1M

Sigma, Taufkirchen (D)

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

Sigma, Taufkirchen (D)

Ethanol LiChrosolv

Merck-Millipore, Darmstadt (D)

Glycerin

Sigma, Taufkirchen (D)

Glycin

AppliChem, Darmstadt (D)

Isopropanol Rotipuran

Roth, Karlsruhe (D)

KCl (Kaliumchlorid)

Merck-Millipore, Darmstadt (D)

Methanol

AppliChem, Darmstadt (D)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)

Merck-Millipore, Darmstadt (D)

Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> (Natriumorthovanadat)

Sigma, Taufkirchen (D)

Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (Natriumpyrophosphat)

ICN Biomedicals, Ohio (US)

NaCl (Natriumchlorid)

AppliChem, Darmstadt (D)

|                                    |                                |
|------------------------------------|--------------------------------|
| NaF (Natriumfluorid)               | Sigma, Taufkirchen (D)         |
| NaOH (Natriumhydroxid)             | J.T. Baker, Deventer (NL)      |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Sigma, Taufkirchen (D)         |
| Prolabo® Aceton                    | VWR, Darmstadt (D)             |
| SDS                                | Biomol, Hamburg (D)            |
| SDS für Gele                       | GE Life Science, Solingen (D)  |
| TRIS-Base Pufferan                 | Roth, Karlsruhe (D)            |
| TRIS-HCl Trizma -Hydrochlorid      | Sigma, Taufkirchen (D)         |
| Triton x-100 <i>reduced form</i>   | Fluka, Neu-Ulm (D)             |
| Tween 20 Polysorbat 20             | Merck-Millipore, Darmstadt (D) |

## 2.7 Nährmedien, Zusätze und Reagenzien für Zellkultur

|                                                                             |                                  |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| DMEM<br>mit 3,7 g/l NaCl, stabilem Glutamin und<br>4,5 g/l Glucose          | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| DMEM<br>mit 3,7 g/l NaCl, stabilem Glutamin und 1<br>g/l Glucose            | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| RPMI 1640 Medium<br>mit stabilem Glutamin und<br>2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| phenolfreies RPMI 1640 Medium<br>2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub>                 | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| Gibco® Opti-MEM<br>1x Reduced Serum Medium                                  | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| Fetales Kälberserum (FCS)                                                   | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| L-Glutamin 200mM                                                            | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| Gibco® ITS 100x                                                             | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| DMSO Hybri-Max                                                              | Sigma, Taufkirchen (D)           |

|                                                                           |                                  |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Puromycin 10 mg/ml                                                        | InvivoGen, Toulouse (F)          |
| PBS<br>w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup> , <i>low endotoxin</i> | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)                                                | Biochrom AG, Berlin (D)          |
| Invitrogen™ <i>Lipofectamine</i> 2000                                     | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| 0,25 M CaCl <sub>2</sub>                                                  | Sigma, Taufkirchen (D)           |
| HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)             | Sigma, Taufkirchen (D)           |

| 2xHBS (HEPES buffered saline)                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• 274 mM NaCl</li> <li>• 50 mM HEPES</li> <li>• 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> <li>• titriert mit NaOH auf pH 7,05</li> </ul> |

**Tabelle 2 Zusammensetzung von 2xHBS**

## 2.8 SDS-PAGE und Western-Blot

| 2x Laemmli            | 4x Laemmli             |
|-----------------------|------------------------|
| 90 mM Tris HCl pH 6,8 | 160 mM Tris HCl pH 6,8 |
| 126 mM SDS            | 224 mM SDS             |
| 2463 mM Glycerin      | 4378 mM Glycerin       |
| 5,2 mM Bromphenolblau | 4,6 mM Bromphenolblau  |
| 100 mM DTT            | 200 mM DTT             |

**Tabelle 3 Zusammensetzung von 2x und 4x Laemmli Lysispuffer**

|                                                    |                                               |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <i>Prestained Protein Marker<br/>Broad Range</i>   | New England Biolabs,<br>Frankfurt am Main (D) |
| Glasplatten mit 0,75mm <i>Spacer</i><br>8,3x10,1cm | Biostep, Burkhardtsdorf (D)                   |
| Glasplatten<br>7,3x10,1cm                          | Biostep, Burkhardtsdorf (D)                   |
| Mini-Protean <i>Casting Frame</i>                  | Bio-Rad, München (D)                          |
| Mini-Protean <i>Casting Stand</i>                  | Bio-Rad, München (D)                          |

|                                                                                          |                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Mini-Protean <i>Casting Stand Gaskets</i>                                                | Bio-Rad, München (D)        |
| Mini-Protean <i>Combs</i> 0,75 mm                                                        | Bio-Rad, München (D)        |
| Mini Cell Buffer <i>Dams</i>                                                             | Bio-Rad, München (D)        |
| Mini-Protean <i>Tetra Electrode Assembly</i>                                             | Bio-Rad, München (D)        |
| Mini-Protean <i>Gel Releasers</i>                                                        | Bio-Rad, München (D)        |
| Rotiphorese Gel 30<br>(37,5:1) 30% Lösung aus Acrylamid und<br>NN'-Methylenbisacrylamid  | Roth, Karlsruhe (D)         |
| TEMED<br>99% p.a. C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> ; 116,2g/l; Dichte: 0,78 | Biostep, Burkhardtsdorf (D) |
| APS (Aluminiumperoxysulfat)                                                              | Sigma, Taufkirchen (D)      |

| <b>Trenngel (pH 8,8)</b> | <b>Sammelgel (pH 6,9)</b> |
|--------------------------|---------------------------|
| 1570 mM Acrylamid        | 763 mM Acrylamid          |
| 180 mM Tris HCl          | 290 mM Tris HCl           |
| 570 mM Tris Base         | 8 mM Tris Base            |
| 7 mM SDS                 | 7 mM SDS                  |
| 8,6 mM APS               | 10 mM APS                 |
| 2 mM TEMED               | 1,5 mM Temed              |

**Tabelle 4 Zusammensetzung von Trenngel und Sammelgel**

| <b>Laufpuffer:</b>                                        | <b>Transferpuffer</b>                                         | <b>Proteinwaschpuffer</b>                                     |
|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| 23,1 mM Tris Base pH 8,5<br>3,5 mM SDS<br>191,8 mM Glycin | 61,9 mM Tris Base pH 8,5<br>480 mM Glycin<br>4938 mM Methanol | 12,9 mM Tris HCl pH 7,5<br>129 mM NaCl<br>1,1mM Polysorbat 20 |

**Tabelle 5 Zusammensetzung von Lauf-, Transfer-, und Proteinwaschpuffer**

Blocklösung für Western-Blot: 5% BSA in Proteinwaschpuffer

|                                            |                               |
|--------------------------------------------|-------------------------------|
| Mini Trans-Blot <i>Gel Holder Cassette</i> | Bio-Rad, München (D)          |
| Mini Trans-Blot <i>Foam Pads</i>           | Bio-Rad, München (D)          |
| Mini Trans-Blot <i>Central Core</i>        | Bio-Rad, München (D)          |
| Bio-Ice <i>Cooling Unit</i>                | Bio-Rad, München (D)          |
| Whatman Protran®<br>Nitrozellulosemembran  | GE Life Science, Solingen (D) |
| <i>Gel Blot Paper</i>                      | VWR, Darmstadt (D)            |

|                                                                |                        |
|----------------------------------------------------------------|------------------------|
| Luminol                                                        | Fluka, Neu-Ulm (D)     |
| p-Cumarinsäure                                                 | Sigma, Taufkirchen (D) |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Rotipuran Wasserstoffperoxid 30% | Roth, Karlsruhe (D)    |

| ECL-Lösung                           |
|--------------------------------------|
| 224 mM Tris-Base pH 8,5              |
| 862 µM Luminol                       |
| 171 µM p-Cumarinsäure                |
| 2,5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

**Tabelle 6 Zusammensetzung der ECL-Lösung**

## 2.9 Immunpräzipitation

| 1x Triton-Lysispuffer                                  |
|--------------------------------------------------------|
| 17 mM Triton                                           |
| 20 mM Tris pH 7,5                                      |
| 50 mM NaCl                                             |
| 50 mM NaF                                              |
| 15 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>    |
| 0,1 mM EDTA                                            |
| 2 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>                   |
| 0,25 mM PMSF                                           |
| 1 Tablette Complete Mini (Proteaseinhibitor) pro 50 ml |

**Tabelle 7 Zusammensetzung von 1x Triton-Lysispuffer**

|                                                                        |                               |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Protein A Sepharose CL4B<br>in 20 % Ethanol (50:50)                    | GE Life Science, Solingen (D) |
| <i>GammaBind</i> Plus Sepharose (Protein G)<br>in 20 % Ethanol (50:50) | GE Life Science, Solingen (D) |

## 2.10 Agarosegelelektrophorese

|                                           |                                                           |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Agarose Rotigarose NEEO Ultra-Qualität    | Roth, Karlsruhe (D)                                       |
| <i>Low melting</i> 2-Hydroxyethyl Agarose | Sigma, Taufkirchen (D)                                    |
| Ethidiumbromidlösung 0,025%               | Roth, Karlsruhe (D)                                       |
| λ-Marker <i>DNA-BstEII-Digest</i>         | Roche Diagnostics, Mannheim (D),<br>Frankfurt am Main (D) |

| 1x TAE Puffer                                                                              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,8 mM Tris Base pH 8,5<br>0,4 mM Essigsäure<br>10 mM EDTA<br>titriert mit NaOH auf pH 8,8 |

Tabelle 8: Zusammensetzung von 1x TAE Puffer

## 2.11 DNA-Restriktion und DNA-Klonierung

Restriktionsenzyme

Roche Diagnostics, Mannheim (D),  
Frankfurt am Main (D)

10x Restriktionspuffer

Roche Diagnostics, Mannheim (D),  
Frankfurt am Main (D)

## 2.12 Transformation, Mini- und Maxikulturen, Maxipreparation

E. coli MC1061

Life Technologies, Darmstadt (D)

E.coli MC1061 P3

Life Technologies, Darmstadt (D)

Ampicillin-Natrium

Serva, Heidelberg (D)

Tetracyclin-Hydrochlorid

Sigma, Taufkirchen (D)

LB-Broth Base

Sigma, Taufkirchen (D)

Lenox L-Agar

Sigma, Taufkirchen (D)

Plasmid Maxikit

Qiagen, Hilden (D)

LB-Medium: 20 mg/ml LB-Broth Base gelöst in ddH<sub>2</sub>O

LB-Agar: 32 mg/ml Lenox L-Agar  
30 mg/l NaOH  
gelöst in ddH<sub>2</sub>O

LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Medium mit 25 µg/ml Ampicillin und 75 µg/ml Tetracyclin

## 2.13 PCR und reverse Transkription

|                                             |                                  |
|---------------------------------------------|----------------------------------|
| Invitrogen® <i>AccuPrime Taq-Polymerase</i> | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| Invitrogen® 10x <i>AccuPrime</i> Puffer     | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| Primer                                      | MWG-Biotech, Ebersberg (D)       |
| Quantitect <i>Reverse Transcription Kit</i> | Qiagen, Hilden (D)               |

## 2.14 Immunfluoreszenz

|                                                |                                   |
|------------------------------------------------|-----------------------------------|
| ProLong Gold <i>anti fade reagent</i>          | Life Technologies, Darmstadt (D)  |
| ProLong Gold <i>anti fade reagent</i> mit Dapi | Life Technologies, Darmstadt (D)  |
| Objektträger                                   | Marienfeld, Lauda-Königshofen (D) |

Blocklösung für Immunfluoreszenz: 4 % BSA in PBS

Fixierung und Permeabilisierung von Zellen: 10,9 M Aceton, 4,9 M Methanol

## 2.15 Glomeruläre Lysate

|                                                                                        |                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| Invitrogen® <i>Dynabeads Epoxy-M-450</i>                                               | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| Invitrogen® <i>Magnetcatcher</i> DynaMag2<br>( <i>Magnetic Particle Concentrator</i> ) | Life Technologies, Darmstadt (D) |
| <i>Tissue Ruptor</i>                                                                   | Qiagen, Hilden (D)               |

| CHAPS-Lysispuffer                                    |
|------------------------------------------------------|
| 20 mM CHAPS                                          |
| 20 mM Tris pH 7,5                                    |
| 50 mM NaCl                                           |
| 50 mM NaF                                            |
| 15 µM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>  |
| 0,1 mM EDTA pH 8,0                                   |
| 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>                 |
| 0,25 µM PMSF                                         |
| 3 mM ATP                                             |
| 1 Tablette Complete Mini Proteaseinhibitor pro 10 ml |

**Tabelle 9 Zusammensetzung von CHAPS-Lysispuffer**

## 2.16 RNA-Isolierung und Umschreibung in cDNA

|                                            |                        |
|--------------------------------------------|------------------------|
| $\beta$ -Mercaptoethanol                   | Sigma, Taufkirchen (D) |
| <i>RNA Later RNA Stabilization Reagent</i> | Qiagen, Hilden (D)     |
| <i>RNEasy Mini Kit</i>                     | Qiagen, Hilden (D)     |

## 2.17 Computerprogramme

|                                                                |                                        |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| <i>Easy Temp</i>                                               | Julabo, Seelbach (D)                   |
| FluorChem FC2                                                  | Alpha Innotech, Santa Clara, (US)      |
| <i>ImageJ</i><br><i>Image Processing and Analysing in Java</i> | Wayne Rasband, Bethesda (US)           |
| <i>iMovie</i>                                                  | Apple Inc., Cupertino (US)             |
| <i>Incubation Remote Control 2</i>                             | Pecon, Erbach (D)                      |
| <i>Power Point 2011 für Mac OS X</i>                           | Microsoft, Redmont (US)                |
| Excel 2011 für <i>Mac OS X</i>                                 | Microsoft, Redmont (US)                |
| <i>VisiView</i>                                                | Visitron Systems GmbH,<br>Puchheim (D) |
| <i>Word 2011 für Mac OS X</i>                                  | Microsoft, Redmond (US)                |

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellkultur

In der Zellkultur wurden sterile Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Nährmedien verwendet und unter einer Zellbank gearbeitet, um Kontamination der Zellen durch Viren, Bakterien und Pilze zu vermeiden. Die Zelllinien wurden in Zellschalen oder Zellflaschen im Brutschrank kultiviert. Verwendete Medien und spezielle Kultivierungsbedingungen sind Tabelle 10 zu entnehmen.

| <b>Zelllinie</b>                              | <b>Medium</b>             | <b>Zusätze</b>                                                        | <b>Bedingungen</b>                                                                                      |
|-----------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HEK293T                                       | DMEM<br>2,25 g/l Glucose  | 10 % FCS                                                              | 37 °C<br>5 % CO <sub>2</sub>                                                                            |
| HEK293T<br>Transfektion                       | DMEM<br>1 g/l Glucose     | 10 % FCS                                                              | 37 °C<br>5 % CO <sub>2</sub>                                                                            |
| Cos7                                          | DMEM<br>4,5 g/l Glucose   | 10 % FCS                                                              | 37 °C<br>5% CO <sub>2</sub>                                                                             |
| Cos7<br>stabil transduziert                   | DMEM<br>4,5 g/l Glucose   | 10 % FCS<br>0,3 µg/ml Puromycin                                       | 37 °C<br>5 % CO <sub>2</sub>                                                                            |
| hPodos AB 8/13 II                             | RPMI 1640                 | 10 % FCS<br>1 % ITS                                                   | Proliferation:<br>33 °C<br>5 % CO <sub>2</sub><br>Ausdifferenzierung:<br>37,5 °C<br>5 % CO <sub>2</sub> |
| hPodos AB 8/13 II<br>stabil transduziert      | RPMI 1640                 | 10 % FCS<br>1 % ITS<br>0,2 µg/ml Puromycin<br>(nur bei Proliferation) | Proliferation:<br>33 °C<br>5 % CO <sub>2</sub><br>Ausdifferenzierung:<br>37,5 °C<br>5 % CO <sub>2</sub> |
| hPodos AB 8/13 II<br><i>Live Cell Imaging</i> | RPMI 1640<br>(phenolfrei) | 2 mM L-Glutamin<br>1 % ITS                                            |                                                                                                         |

Tabelle 10 Nährmedien mit Zusätzen sowie Kultivierungsbedingungen für Zellen

##### 3.1.1 Kultivierung von HEK293T- und cos7-Zellen

Die Zellen wurden in 10 cm Schalen gehalten und alle zwei bis drei Tage passagiert. So erhielten die Zellen neue Nährstoffe und der Selektionsdruck auf die stabil transduzierten cos7-Zellen konnte durch Zugabe frischen Puromycins aufrechterhalten werden. Zudem wurden die Zellen ausgedünnt, sodass sie nie eine Konfluenz von 70 % überschritten.

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurde gerade soviel Trypsin hinzugegeben, dass der Schalenboden komplett bedeckt wurde. Die Lösung der Zellen erfolgte fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wurde mindestens die doppelte Menge an Nährmedium mit

FCS hinzugegeben. Der Schalenboden wurde mehrfach durch Pipettieren gespült, um noch adhärenente Zellen zu lösen und die Zellen zu vereinzeln. Gemäß des angestrebten Passagierungsverhältnisses wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen und auf neue Schalen überführt. Es wurde ausreichend Nährmedium hinzugegeben. Durch adäquates Schwenken der Schalen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet.

### 3.1.2 Transfektion von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Hierbei bindet die zu transfizierende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die so entstandenen Kristalle werden von den Zellen endozytiert und eine Überexpression der gewünschten Proteine erreicht.

Zwölf Stunden vor Transfektion wurden die Zellen so passagiert (siehe 3.1.1), dass zum Transfektionszeitpunkt alle Zellen einzeln lagen. Pro 10 cm Schale wurden 5 µg Plasmid-DNA in 1,5 ml *Tubes* pipettiert. 500 µl 0,25 M CaCl<sub>2</sub> und 500 µl 2 x HBS (*HEPES buffered saline*) wurden vorsichtig unter Vortexen hinzugegeben. Nach fünfminütiger Inkubation wurde nun die angesetzte Transfektionslösung gleichmäßig auf die Zellen geträufelt. Die Kristallbildung wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zellen wurden sechs bis acht Stunden inkubiert, ehe das Medium mit der Transfektionslösung abgesaugt und frisches Nährmedium hinzugegeben wurde. Nach zwölf Stunden konnten die Zellen für Versuche weiterverarbeitet werden.

### 3.1.3 Lipofektion von cos7-Zellen

Cos7-Zellen wurden mittels Lipofektion transfiziert. Hierbei entstehen mit DNA beladene Liposomen, die leicht mit der Zellmembran fusionieren können und so endozytiert werden.

Die Transfektion erfolgte, um in der Folge Präparate der Zellen zur Mikroskopie anzufertigen. Daher wurden die Zellen zwölf Stunden vor Transfektion in 12-Well Platten auf Deckgläser ausgesät. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion einzeln lagen.

| Lipofektionslösung (Mengenangaben pro Well): |
|----------------------------------------------|
| 0,7 µg DNA                                   |
| 2,1 µl Lipofectamin 2000                     |
| 200 µl Opti-MEM Medium                       |

Tabelle 11 Zusammensetzung der Lipofektionslösung

Die Transfektionslösung (s. Tabelle 11) wurde vorsichtig auf die Zellen gegeben. Das Vorliegen der Liposomen konnte mikroskopisch überprüft werden.

Das Medium mit der Transfektionslösung wurde zwölf Stunden nach Transfektion abgesaugt und frisches Nährmedium hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden konnten die transfizierten Zellen fixiert werden.

### 3.1.4 Kultivierung humaner Podozyten

Für die Experimente wurden humane Podozyten (hPodos) vom Typ AB8/13 II von Prof. M. Saleem aus Bristol verwendet (Saleem, O'Hare et al. 2002).

Diese haben einen temperatursensitiven Promotor. Bei 33 °C proliferieren die Zellen, während bei 37,5 °C die Ausdifferenzierung zu reifen Podozyten stattfindet. Die Kultivierung erfolgte in T25 oder T75 Flaschen.

Zum Erhalt wurden die Podozyten alle zwei bis drei Tage je nach Zelldichte gesplittet. Es wurde eine Zellzahl von 2600 pro cm<sup>2</sup> angestrebt.

Zum Passagieren wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden kurz mit PBS gespült. Anschließend wurde ausreichend Trypsin hinzugegeben, sodass der Flaschenboden vollständig bedeckt war. Die Enzymreaktion mit Trypsin wurde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für fünf Minuten im Inkubator durchgeführt. Danach wurde für die Inaktivierung des Trypsins mindestens die doppelte Menge an Nährmedium hinzugegeben, um die Enzymreaktion zu stoppen. Nach gründlichem Spülen des Flaschenbodens wurde die Zellsuspension in einem Zentrifugationsröhrchen für fünf Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Hierbei wurde das Zellpellet gewonnen und Trypsin konnte abgesaugt werden. Anschließend wurden die Zellen in Nährmedium resuspendiert. Die Menge des Mediums richtete sich hierbei nach dem gewünschten Splitverhältnis. Danach konnten die Zellen auf neue Flaschen verteilt und dort durch Pipettieren vereinzelt werden. Im Inkubator wurde durch systematisches Schwenken der Flaschen eine gleichmäßige Verteilung der Zellen über den Flaschenboden gewährleistet. Die Podozyten wurden bei 33 °C Umgebungstemperatur und 5 % CO<sub>2</sub> zur Proliferation inkubiert.

### **3.1.5 Ausdifferenzierung humaner Podozyten**

Für die Versuche wurden 12 bis 14 Tage ausdifferenzierte humane Podozyten verwendet. Nur im ausdifferenzierten Zustand exprimieren die Podozyten podozytenspezifische Marker. Beim Aussähen zur Differenzierung wurde eine Zelldichte von 2600 Zellen/cm<sup>2</sup> angestrebt.

Nach Ablösen der Zellen und Abzentrifugieren des Trypsins (vgl. 3.1.4) wurde das Zellpellet resuspendiert. Nun wurde die Zellkonzentration der Suspension durch Zählung in einer vorbereiteten Neubauerkammer ermittelt. Die Suspension wurde so verdünnt, dass 25.000 Zellen/μl vorlagen. Anschließend wurden *Wells* von 6-Well Platten mit 1 ml Zellsuspension versehen. Es wurde ausreichend Nährmedium hinzugegeben. Bei stabil transduzierten hPodos wurde hier auf Zugabe von Puromycin verzichtet, um die Ausdifferenzierung nicht zu beeinflussen. Nach gutem Mischen der Platten wurden die Zellen bei 37,5 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bebrütet. Das Nährmedium wurde alle zwei Tage erneuert.

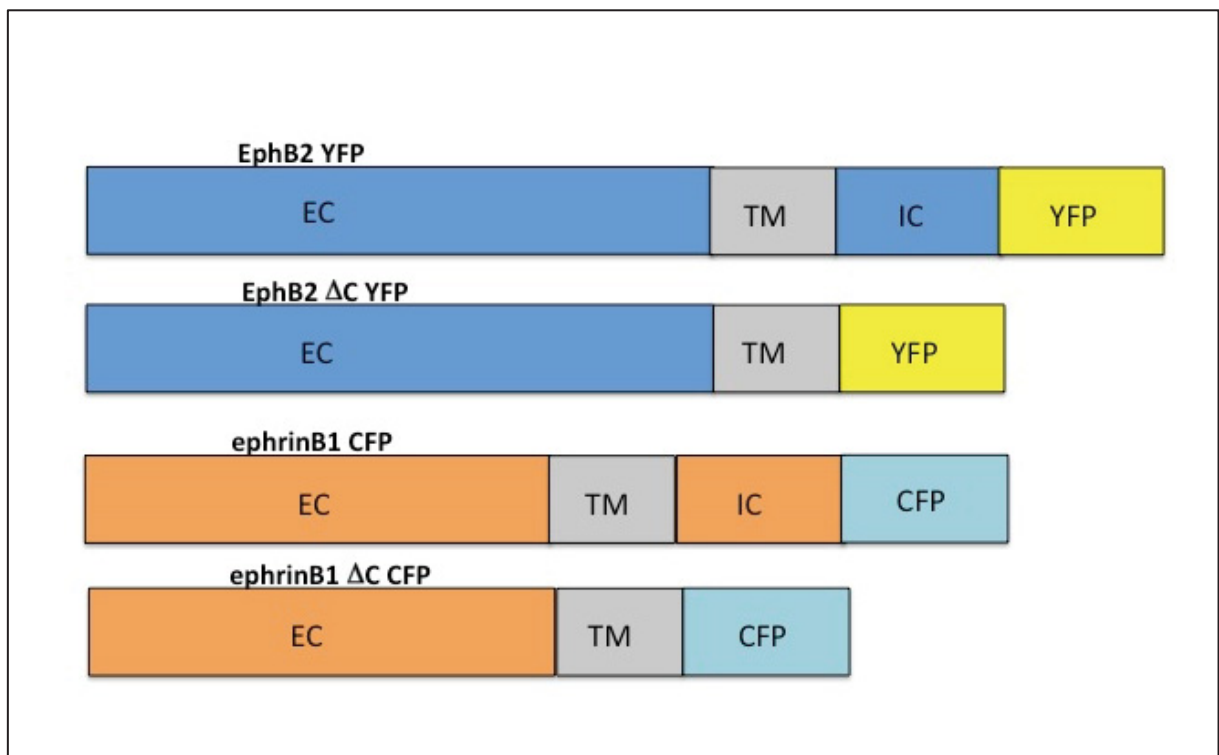
### **3.1.6 RNA-Isolierung aus humanen Podozyten**

Nach Ausdifferenzierung der hPodos vom Typ AB8/13 II (Saleem, O'Hare et al. 2002) wurde die RNA der Zellen isoliert, um sie im Anschluss in cDNA umschreiben (3.3.8) und RNA-Expressionsuntersuchungen mittels PCR (3.3.9) durchführen zu können.

Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des *RNEasy*-Minikits von Qiagen und unter Berücksichtigung der Herstelleranleitung durchgeführt. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Nach Trypsinierung und Abzentrifugation des Trypsins (3.1.4) wurde das Zellpellet in 300-600 μl RLT-Puffer zur Lyse aufgenommen. Die Lysate wurden zur Homogenisierung auf die *Qiashredder*-Säule gegeben und bei 8000 x g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 300-550 μl siebzugprozentigem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf RNA-Säulen überführt und 15 Sekunden bei

800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden 700 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben und wiederum 15 Sekunden bei 21200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert. Die RNA wurde unter selbigen Zentrifugationsbedingungen zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen. Im dritten Waschschriff wurde dann eine Minute bei 8000 x g gewaschen. Zur Elution der RNA wurde die Säule auf ein frisches 1,5 ml-*Tube* gestellt, mit 30-50 µl RNase freiem Wasser versetzt und eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert.

### 3.1.7 Erzeugung stabil transduzierter humaner Podozyten und cos7-Zellen



**Abb. 7: Darstellung der Proteine, mit deren DNA die Podozyten stabil transduziert wurden** YFP: *yellow fluorescent protein*, CFP: *cyan fluorescent protein*, EC: *extracellular domain*, TM: *transmembraneous domain*, IC: *intracellular domain*

Die für die Proteine in Abb. 7 kodierende DNA sollte stabil in humane Podozyten sowie cos7-Zellen eingebracht werden.

Diese befand sich in einem modifizierten pcDNA-Vektor (pjk) und wurden freundlicher Weise von R. Klein (Max-Planck-Institut, Martins-Ried) zur Verfügung gestellt (Zimmer, Palmer et al. 2003).

Zunächst wurde eine PCR (s. 3.3.8) mit den Ausgangsplasmiden durchgeführt, um Schnittstellen für die anschließenden Klonierungen einzubringen. Diese waren auf den verwendeten Primern kodiert. Die jeweiligen Primer sind Tabelle 20 zu entnehmen. Die ephrin-Plasmide wurden mit Schnittstellen für MluI und NotI, die Eph-Plasmide mit Schnittstellen für EcoRV, MluI und SacI versehen.

Es folgten Subklonierungen (3.3.7), deren genauer Ablauf Tabelle 12 zu entnehmen ist.

| Insert                       | Vektor        | Restriktionsenzyme | Produkt               |
|------------------------------|---------------|--------------------|-----------------------|
| PCR Produkt: EphB2 YFP       | pcDNA (pjk12) | Eco RV, Sac I      | prKJ EphB2 YFP        |
| prKJ EphB2YFP                | pQCXIP        | Mlu I, Not I       | pQCXIP EphB2YFP       |
| PCR Produkt: EphB2 ΔC YFP    | pcDNA (pjk12) | Eco RV, Sac I      | prKJ EphB2 ΔC YFP     |
| prKJ EphB2 ΔC YFP            | pQCXIP        | Mlu I, Not I       | pQCXIP EphB2 ΔC YFP   |
| PCR Produkt: ephrinB1 CFP    | pQCXIP        | Mlu I, Not I       | pQCXIP ephrinB1 CFP   |
| PCR Produkt: ephrinB1 ΔC CFP | pQCXIP        | Mlu I, Not I       | pQCXIP ephrinB1ΔC CFP |

**Tabelle 12 Subklonierungsschritte zur Einbringung von DNA in pQCXIP-Vektoren**

Alle PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung durch die Firma MWG auf ihre korrekte Basenfolge überprüft.

Nach Maxipreparation der in Abb. 7 gezeigten Konstrukte im retroviralen Vektor wurden durch Transfektion in HEK293T-Zellen die Retroviren erzeugt.

| <b>Transfektionsgemisch:</b>                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 µg Ziel-DNA                                                                                          |
| 2 µg pHIT-60: Hilfsvektor, gag-pol für Retroviren (Soneoka, Cannon et al. 1995)                        |
| 2 µg pHIT-G: Hilfsvektor, VSV-G-env zur Pseudotypisierung von Retroviren (Fouchier, Meyer et al. 1997) |
| 31 µl CaCl <sub>2</sub>                                                                                |
| 250 µl 2xHBS                                                                                           |
| 5 ml DMEM mit 10% FCS und 1g/l Glucose                                                                 |
| 219 µl ddH <sub>2</sub> O                                                                              |

**Tabelle 13 Transfektionsgemisch zur Erzeugung des viralen Überstandes für die Transduktion**

HEK293T-Zellen wurden in T25 Flaschen ausgesät, wobei jede Flasche 10<sup>6</sup> Zellen enthalten sollte. Das verwendete DMEM enthielt 10 % FCS und 1 g/l Glucose. Etwa 12 Stunden später wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Vier bis sechs Stunden hiernach wurde das Medium abgesaugt und das Transfektionsgemisch (s. Tabelle 13) auf die Zellen pipettiert.

An Tag fünf nach Transfektion hatten nun die HEK293T-Zellen die Retroviren inklusive des viralen Packagings aufgenommen. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 300 × g konnte der Überstand abpipettiert werden, während sich die Zellen am Boden absetzten. Der Überstand wurde durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße gepresst um etwaige Rückstände von Zellbestandteilen zu entfernen. Der so entstandene, aufgereinigte, virale Überstand wurde in *Cryotubes* gegeben und bei -80 °C weggefroren bzw. direkt weiterverwendet.

Für die eigentliche Transduktion wurden undifferenzierte Podozyten bzw. cos7-Zellen in T25 Flaschen ausgesät, wobei die Zellen einzeln, d.h. nicht konfluent lagen. Einen Tag später wurde das Medium entfernt und 1 ml der Viruspartikel auf die Zellen gegeben. Zwei bis vier Stunden hiernach wurden 4 ml Nährmedium hinzugegeben.

Nach zweitägigem Abwarten und mikroskopischer Kontrolle der erfolgreichen Transduktion konnte die Selektion mit Puromycin begonnen werden. Cos7 Zellen wurden mit 0,3 µg/ml, hPodos mit 0,2 µg/ml Puromycin selektioniert.

Bei der weiteren Kultivierung der Zellen wurden diese Konzentrationen beibehalten.

Die Expression der Proteine wurde durch *Western-Blot* (3.2.1) von Zelllysaten (3.1.8) und die Fluoreszenz mikroskopisch kontrolliert.

| Erzeugte Zellpopulationen: |  |
|----------------------------|--|
| • Cos7:                    |  |
| ○ EphB2 YFP                |  |
| ○ EphB2 ΔC YFP             |  |
| ○ ephrinB1 CFP             |  |
| ○ ephrinB1 ΔC CFP          |  |
| • hPodos AB 8/13 II        |  |
| ○ EphB2 YFP                |  |
| ○ EphB2 ΔC YFP             |  |
| ○ ephrinB1 CFP             |  |
| ○ ephrinB1 ΔC CFP          |  |

**Tabelle 14 Erzeugte, stabil transduzierte Zellpopulationen**

### 3.1.8 Ganzzelllysate mit 2x Laemmli

Durch Zelllyse mit 2x Laemmli (s. Tabelle 3) war es möglich, die Proteinexpressionen von Zellen im *Western-Blot* zu untersuchen. Bei Expressionsuntersuchungen an humanen Podozyten wurden die Zellen zuvor ausdifferenziert (3.1.5).

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums und Spülen mit PBS durch Zugabe von 2x Laemmli lysiert und die zellulären Proteine durch das enthaltene DTT linearisiert. DTT spaltet Disulfidbrücken und verhindert deren erneute Bildung, wodurch die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur verlieren. Für 10 cm-Schalen wurden 400 µl, für 6-Well Platten 100 µl 2x Laemmli verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber von Schalenboden gelöst und in 1,5 ml-*Tubes* pipettiert. Nun wurde fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer erhitzt.

### 3.1.9 Einfrieren von Zellen

| Zellen  | Einfriermedium                                    |
|---------|---------------------------------------------------|
| HEK293T | 72 % DMEM<br>8 % FCS<br>20 % DMSO                 |
| Cos7    | 72 % DMEM<br>8 % FCS<br>20 % DMSO                 |
| hPodos  | 64 % RPMI 1640<br>17 % FCS<br>1 % ITS<br>8 % DMSO |

**Tabelle 15 Verwendete Medien zum Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden zunächst passagiert und das verwendete Trypsin abzentrifugiert (3.1.1 bzw. 3.1.4). Bei der Resuspension der Zellen in Einfriermedium (s. Tabelle 15) wurde eine Zellkonzentration von 25.000 Zellen/ml angestrebt. Es wurde jeweils 1 ml Zellsuspension auf *CryoTubes* verteilt. Diese wurden in *Freezing Containern* bei -80 °C eingefroren. Das Isopropanol in der Schale des Containers sorgte für ein langsames und schonendes Herunterkühlen der Zellen (-1 °C/h).

Am nächsten Tag konnten die Zellen bei -170 °C im Stickstofftank aufbewahrt werden.

### 3.1.10 Auftauen von Zellen

Die entsprechenden *CryoTubes* wurden nach Entnahme aus dem Stickstofftank langsam bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde entnommen und in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben. Zusätzlich wurden 5 ml Nährmedium (s. Tabelle 10) hinzugegeben. Es wurde bei 300 × g für fünf Minuten zentrifugiert, um das Einfriermedium zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Nährmedium resuspendiert und in neue Inkubationsflaschen bzw. Schalen gegeben. Anschließend wurde durch adäquates Mischen eine gleichmäßige Zellverteilung über die Oberfläche gewährleistet und die Zellen unter entsprechenden Bedingungen bebrütet (s. Tabelle 10).

## 3.2 Proteine

### 3.2.1 SDS-PAGE und Western-Blot

*SDS-PAGE* und *Western-Blot* ermöglichen die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe und eine permanente Proteinfixierung auf einer Membran.

Die negative Ladung der Proteine führt zu einer Migration zur Anode der Elektrophoresekammer. Größere Proteine wandern hierbei durch größeren Widerstand langsamer als kleinere. Durch Zugabe von SDS im Überschuss werden Proteine linearisiert und mit gleichen negativen Ladungen versehen, sodass eine Auftrennung allein anhand der Größe möglich ist. Elektrophoretisch wird anschließend eine permanente Fixierung der Proteine auf einer Nitrozellulosemembran erreicht. Nach anschließender Inkubation in Antikörperlösungen können die Proteine im *Imager* durch Chemielumineszenz sichtbar gemacht werden.

Zunächst wurden die Gele in Glasplatten mit 0,75 mm-*Spacer* gegossen. Die Acrylamidkonzentration der Gele betrug 10 %. Zunächst wurde das Trenngel zwischen die Glasplatten pipettiert. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4 aufgeführt. Das Acrylamid polymerisierte nach Zugabe von TEMED und APS aus. Nach Gießen des Trenngels wurde sofort mit 100 %- Isopropanol überschichtet. Nach Aushärten des Gels wurde das Isopropanol abgeschüttet, der Zwischenraum der Platten mit destilliertem Wasser gespült und mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde das Sammelgel nach Zugabe von APS und TEMED in die Glasplatten gegossen. Ein Kamm zur Aussparung der Kammern für das Laden der Proben wurde eingebracht. Nach Aushärten des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Glasplatten gründlich gereinigt.

Für die *SDS-PAGE* wurde die Glasplatte mit dem enthaltenen Gel in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und diese adäquat mit Laufpuffer gefüllt.

Die Kammern des Gels wurden gespült und Proben sowie Marker geladen. Als Marker wurde durchgehend *Broad Range Prestained Protein Marker* (New England Biolabs) geladen.

Die Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgte 30 min. bei einer kontinuierlichen Spannung von 70 V. Die pH-Differenz zwischen Sammel- und Trenngel führte zu einer Stapelung der Proteine an der Gelgrenze. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte 90 min. bei einer Stromstärke von 20 mA. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das Gel aus den Glasscheiben entfernt und das Sammelgel abgetragen. Das Gel wurde in Transferpuffer gewaschen. Das Gel wurde nun zusammen mit Schwämmen, *Blotting*-Papier und einer Nitrozellulosemembran in die Blotapparatur eingebracht, wobei Luftblasenbildung so gut wie möglich vermieden wurde. Die

Blotapparatur wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte, gekühlte Blotkammer eingespannt. Das Blotting der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte 90 min. bei einer Stromstärke von 200 mA.

Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran entfernt, mit Proteinwaschpuffer gewaschen und eine Stunde bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C in Blocklösung (5 % bovines Serumalbumin in Phosphat gepufferter Saline) inkubiert. Hierdurch sollten unspezifische Bindungsstellen auf der Membran vor der Antikörperinkubation besetzt werden. Hiernach wurde die Blocklösung abgegossen und die Membran für fünf Minuten in Waschpuffer gewaschen.

Der nun hinzugegebene Primärantikörper richtete sich gegen das zu untersuchende Protein oder einen *Tag*, mit dem das Protein versehen war. Anschließend wurden mit Meerrettichperoxidase versehene Sekundärantikörper hinzugegeben. Eine Ausnahme machte das als Primärantikörper verwendete anti-human IgG, welches bereits mit HRP versehen war und keinen Sekundärantikörper benötigte. Die Sekundärantikörper richteten sich gegen den Fc-Teil des Antikörpers derjenigen Spezies, aus der der Primärantikörper stammte. Die Antikörper inklusive der verwendeten Konzentrationen sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Inkubation in Primär- und Sekundärantikörper wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Sowohl nach Primär- als auch nach Sekundärantikörperinkubation wurde die Membran drei Mal fünf Minuten in Proteinwaschpuffer gewaschen.

Anschließend wurde die Membran in 2 ml ECL-Visualisierungslösung inkubiert. Das enthaltene Luminol reagierte unter Katalyse der Meerrettichperoxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und wurde zur Lichtemission angeregt, welche im *Imager* aufgenommen wurde.

Insgesamt wurde die Lichtemission über eine Belichtungszeit von elf Minuten aufgefangen. Die entstandenen digitalen Bilder wurden nun ausgewertet, wobei der Proteinmarker als Referenz für die Zuordnung der Banden zu Molekulargewichten diente und die damit verbundene Interpretation ermöglichte.

### 3.2.2 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht die Detektion von Protein-Protein-Interaktionen durch Konzentrierung eines Proteins via Antikörperbindung und Koppelung an Sepharose aus einem Zelllysats. Nach *SDS-PAGE* und *Western-Blot* können durch Färbung der Membran gegen zu untersuchende Interaktionspartner qualitative Aussagen über Proteinbindungen getroffen werden.

Zunächst wurden HEK293T-Zellen transient mit der DNA für die zu untersuchenden Proteine transfiziert (3.1.2). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS von den Schalen gelöst und in Falcons überführt. Es wurde fünf Minuten bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert, wobei das Zellpellet absedimentiert wurde und der Überstand abgesaugt werden konnte. Je nach Zellzahl wurden nun 200-500 µl 1x Triton-Lysispuffer hinzugegeben. Das Lysat wurde in 1,5 ml-*Tubes* überführt und die Zellen 15 min. auf Eis lysiert. Der Zelldetritus wurde anschließend für 15 min. bei 20000 x g und 4 °C absedimentiert und das aufgereinigte Zelllysats konnte in neue 1,5 ml-*Tubes* überführt werden. Hier wurden 10 % des Inhalts entfernt, mit einer äquivalenten Menge 2x Laemmli versehen und für fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer gekocht. Das so entstandene Zelllysats konnte später als Kontrolle verwendet werden.

Das restliche Lysat wurde zur eigentlichen Immunpräzipitation mit den spezifischen Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde 30 µl Protein A mit Sepharose hinzugegeben, welches durch Bindung an den Fc-Teil von Säugetier-IgGs die Antikörper

binden konnte. Bei slg-getagten Proteinen wurde direkt 30 µl Protein G mit Sepharose hinzugegeben. Die Inkubation von Antikörpern, Protein A und G erfolgte für 60 min. bei 4 °C auf dem *IP-Shaker*. Die IP wurde mit 1x Triton-Lysispuffer gewaschen, indem zweimal drei Minuten bei 1000 x g und einmal eine Minute bei 20000 x g zentrifugiert wurde. Durch die Zentrifugation setzte sich die Sepharose mit den Antikörper gebundenen Proteinen ab und der Überstand konnte abdekantiert werden. Zur Erstellung der Proben für die SDS-Page wurden 30 µl 2x Laemmli hinzugegeben. Das enthaltene DTT sorgte für eine Linearisierung der Proteine gemäß ihrer Primärstruktur. Die Probe wurde bei 95 °C für fünf Minuten gekocht.

Mit den erzeugten Proben wurden nun eine *SDS-PAGE* (s. 3.2.1) und ein *Western-Blot* (s. 3.2.1) durchgeführt. Die Membran wurde mit Antikörper gegen vermeintliche Interaktionspartner des aufkonzentrierten Proteins inkubiert und anschließend nach Zugabe von ECL-Lösung im Imager entwickelt.

### 3.3 DNA

#### 3.3.1 Agarosegelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt und anschließend sichtbar gemacht werden. Dabei läuft die negativ geladene DNA zur Anode. Größere Fragmente wandern aufgrund des erhöhten Widerstandes langsamer als kleinere. Durch hinzugegebenes Ethidiumbromid konnten die Banden anschließend unter UV-Belichtung im *Imager* sichtbar gemacht und mit der eingebauten Kamera aufgenommen werden.

Die verwendeten Gele enthielten 1,5 % Agarose gelöst in 1x TAE-Puffer. Für die Elektrophorese im Rahmen der DNA-Klonierung wurde 1,5 % *low-melting* Agarose in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Agarose wurde in der Mikrowelle gekocht, bis eine vollständige Lösung erreicht wurde. Anschließend wurden vier Tropfen Ethidiumbromid pro 100 ml hinzugegeben. Die Agarose wurde in die dafür vorgesehene Kammer gegossen und ein Kamm zur Aussparung der Taschen für die Proben eingebracht. Luftblasenbildung wurde vermieden. Nach Aushärten des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel in die Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer, gestellt.

Proben und Marker wurden in die Taschen geladen. Die Elektrophorese wurde für 30 min. bei einer kontinuierlichen Spannung von 90 V durchgeführt. Das Gel wurde in den *Imager* gelegt und mit UV-Licht bestrahlt. Das an die DNA angelagerte Ethidiumbromid konnte nun fluoreszenzoptisch die Banden sichtbar machen.

#### 3.3.2 Enzymatischer DNA-Verdau

| 30 Ansatz für DNA-Verdau |                      |
|--------------------------|----------------------|
| DNA                      | 1 µg                 |
| Restriktionsenzyme       | 0,6 µl je Enzym      |
| Puffer                   | 3 µl 10x Puffer      |
| ddH <sub>2</sub> O       | aufgefüllt auf 30 µl |

Tabelle 16 Ansatz für Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme schneiden DNA an spezifischen Basenpaarsequenzen. Dies kann man sich sowohl für diagnostische Zwecke, etwa als Kontrolle einer Transformation, als auch für DNA-Klonierung zu Nutze machen. Der Enzymverdau wurde bei 37 °C im Thermomixer durchgeführt. Für diagnostische Zwecke wurde eine Stunde, für Klonierungen drei Stunden verdaut. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes ist Tabelle 16 zu entnehmen.

### 3.3.3 Transformation

Bei der Transformation wurde Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien eingebracht, welche die gewünschten Plasmide amplifizierten. Die Plasmide enthielten Antibiotikaresistenzen, sodass durch Antibiotikazugabe nur transformierte Bakterien selektioniert werden konnten. Anschließend wurde die DNA in einer Maxipreparation aufgereinigt. Die Konzentrationen wurden photometrisch gemessen (3.3.7). Durch diagnostischen Enzymverdau (3.3.2) und anschließende Gelelektrophorese (3.3.1) konnte nun die Korrektheit der transformierten und amplifizierten Plasmid-DNA kontrolliert werden.

Tabelle 17 zeigt in den jeweiligen Plasmiden enthaltene Resistenzen und die dafür verwendeten Typen der *E. coli*-Bakterien.

| Vektor | Resistenz              | Bakterien              |
|--------|------------------------|------------------------|
| pcDNA  | Ampicillin             | <i>E.coli</i> MC1061   |
| prKJ   | Ampicillin             | <i>E.coli</i> MC1061   |
| pQXCIP | Ampicillin             | <i>E.coli</i> MC1061   |
| cdm    | Ampicillin-Tetracyclin | <i>E.coli</i> MC1061p3 |

Tabelle 17 Vektoren mit enthaltenen Resistenzen und für die Transformation verwendeten Bakterien

Zunächst wurden die eingefrorenen Bakterien langsam aufgetaut. Nach Vorlegen von 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA in 1,5 ml-*Tubes* wurden 50 µl Bakterien hinzugegeben. Die Anlagerung der DNA an die Bakterien erfolgte 15 Minuten lang auf Eis. Anschließend wurden die Membranporen der Bakterien fünf Minuten bei 37 °C im Thermomixer geöffnet und die DNA wurde aufgenommen. Danach wurden die *Tubes* wieder kurz auf Eis gestellt. Dabei schlossen sich die Membranporen wieder.

Nun wurden die Bakterien mit Hilfe eines Glastabes auf Agarplatten mit den jeweiligen Antibiotika ausgestrichen und kurz antrocknen gelassen. Die Platten wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht bebrütet.

### 3.3.4 Mini- und Maxikulturen

Am Tag nach der Transformation wurde morgens eine Kolonie von der bebrüteten Agarplatte mit Hilfe einer Pipettenspitze entnommen und in ein 15 ml-*Tube* mit 3 ml autoklaviertem LB-Medium und jeweiligen Antibiotikum gegeben. Die *Tubes* wurden nun 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter ständiger Durchmischung inkubiert.

Nach 12-stündiger Bebrütung der Minikultur wurden 200 µl der Bakteriensuspension in einen 500 ml Kolben mit 200 ml autoklaviertem LB-Medium und dem jeweiligen Antibiotikum gegeben. Die Bakterien wurden nun für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter konstanter Durchmischung inkubiert.

### 3.3.5 Maxipreparation

Nach erfolgter Bebrütung der Maxikulturen mit Proliferation der Bakterien sollte nun die produzierte Plasmid-DNA gewonnen und aufgereinigt werden. Hierfür wurde das Plasmid Maxikit von Qiagen verwendet und den Herstellerangaben Folge geleistet.

Die Schritte umfassten Abzentrifugation des Nährmediums, Lyse der Bakterien, Ausfällung und Entfernung von Zellschutt, genomischer DNA und Proteinen, Filterung der Plasmid-DNA sowie Konservierung der Plasmid-DNA in destilliertem Wasser.

### 3.3.6 Photometrische Konzentrationsmessung

Im Photometer wurde die Konzentration von DNA-Lösungen ermittelt. Diese wurde zunächst 1:70 verdünnt.

Für die zu untersuchende dsDNA wurde eine Wellenlänge von 260 nm gewählt.

Als *Blank*-Referenzwert wurde destilliertes Wasser verwendet. Proteinkontaminationen wurden durch Begutachtung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm, Glucosekontaminationen durch Begutachtung des Quotienten der Absorption bei 260 und 230 nm kontrolliert.

### 3.3.7 DNA-Klonierung

Bei der DNA-Klonierung wird ein DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor (bakterielles Plasmid) integriert, um es anschließend mit großer Genauigkeit mittels Transformation und Antibiotikaselektionierung amplifizieren zu können.

Zunächst wurden Insert und Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten (s. 3.3.2). So entstanden Schnittenden mit gleichen Basenpaarsequenzen. Nach Agarosegelelektrophorese (s. 3.3.1) wurden unter UV-Belichtung die zu ligierenden Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Geschnittener Vektor und geschnittenes DNA-Fragment wurden bei 70 °C geschmolzen.

1 µl Vektor, 4 µl Insert, 2,5 µl 10x Ligasepuffer, 0,2 µl T4-DNA-Ligase und 17,5 µl ddH<sub>2</sub>O wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, wobei Insert und Vektor ligiert wurden. Die Ligationsprodukte wurden in Bakterien transformiert (s. 3.3.3). Da die Vektoren spezielle Antibiotikaresistenzen enthielten, konnten inkorrekt ligierte Plasmide mittels Antibiotikazugabe ausselektiert werden. Die so amplifizierte DNA wurde in einer Maxipreparation (s. 3.3.5) aufgereinigt.

### 3.3.8 Umschreibung von RNA in cDNA

Die aus Glomeruli bzw. Zellen isolierte RNA wurde mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde mit einer PCR die Expression von Zielgenen untersucht. Es wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* von Qiagen verwendet. Den Herstelleranweisungen wurde Folge geleistet.

Zunächst wurde die RNA mit dem gDNA *Whipe Out* Puffer des Kits verdaut, um Verunreinigungen durch genomische DNA zu eliminieren. Hierfür wurden 12 µl RNA mit 2 µl 7x *Whipe Out* Puffer versetzt. Das Gemisch wurde drei Minuten bei 42 °C inkubiert. Für die spätere Kontrolle des gDNA-Verdaus mittels Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Kontroll-PCR (GAPDH-Kontroll-PCR) wurden hier 0,5 µl des Ansatzes entnommen und in ein neues 0,5 ml-*Tube* überführt.

Zum restlichen Ansatz wurden 6,5 µl des RT-Mastermixes gegeben, der unmittelbar zuvor auf Eis angesetzt wurde (s. Tabelle 18).

| RT-Mastermix |                                    |
|--------------|------------------------------------|
| 1 µl         | Quantiscript Reverse Transcriptase |
| 4 µl         | Quantiscript RT Buffer (5x)        |
| 1 µl         | RT Primer Mix                      |
| 0,5 µl       | RNase freies Wasser                |

**Tabelle 18 Ansatz des RT-Mastermixes**

Die cDNA wurde 25 Minuten bei 42 °C synthetisiert und die RT anschließend für drei Minuten bei 95 °C inaktiviert.

Anschließend wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA durchgeführt (s. 3.3.6) und die cDNA bei -80 °C gelagert.

Zur Kontrolle von Verunreinigung durch gDNA wurde mit den hierfür abgefüllten Proben eine GAPDH-Kontroll-PCR durchgeführt (s. 3.3.9). Die verwendeten Primer sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

### 3.3.9 PCR

Die PCR ist eine enzymatische Methode zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente in vitro. Durch Katalyse der DNA-Polymerase wird ein durch zwei Primer definierter Abschnitt abgelesen und elongiert. Durch Sequenz vieler Zyklen entsteht exponentiell eine Vielzahl des definierten DNA-Abschnittes.

| PCR-Ansatz |                              |
|------------|------------------------------|
| 1 µl       | DNA-Template (1-10ng DNA)    |
| 1 µl       | <i>AccuPrime</i> -Polymerase |
| 0,5 µl     | Vorwärtsprimer               |
| 0,5 µl     | Rückwärtsprimer              |
| 42 µl      | 10x <i>AccuPrime</i> Puffer  |
|            | ddH <sub>2</sub> O           |

**Tabelle 19 Ansatz für PCR**

Der PCR-Ansatz (s. Tabelle 19) wurde in einen *Thermocycler* gegeben und zunächst bei 95 °C für ein bis drei Minuten inkubiert.

Darauf folgten 15 Zyklen unter folgenden Bedingungen: Im ersten Schritt (Denaturierung) wurden die DNA-Doppelstränge der Templates aufgebrochen, sodass die DNA als Einzelstrang vorlag. Dies geschah 45 Sekunden bei 95 °C.

Das darauffolgende, einminütige *Annealing* ermöglichte das Anlagern der Primer bei für die Primer optimalen Temperaturen (s. Tabelle 20). Die angelagerten Primer dienten als Ausgangspunkt für die anschließende Extension der Einzelstränge zu Doppelsträngen. Diese erfolgte bei 68 °C und einer Lesegeschwindigkeit von 1000 Basenpaaren pro Minute unter Katalyse der *Accuprime*-Polymerase, einer hitzeresistenten DNA-Polymerase. Am Ende eines Zyklusses hatte sich folglich die DNA-Menge verdoppelt.

Nach dem letzten Zyklus erfolgte eine Inkubation des Produktes für zehn Minuten bei 68 °C. In der Folge wurde der Ansatz bis zur Entnahme der DNA bei 4 °C gekühlt.

| Primer für                       | Art                         | Sequenz von 5' nach 3'            | Annealing-Temperatur |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| humanes und murines EphB1        | Vorwärtsprimer              | AAACGGGCTTATAGCAAAGAGG            | 56°C                 |
| humanes EphB1                    | Rückwärtsprimer             | CCTCGTAAGTGAAGGGGTCAA             | 56°C                 |
| murines EphB1                    | Rückwärtsprimer             | GGGGTCCTCATAAGTGAATGG             | 56°C                 |
| humanes und murines EphB2        | Vorwärtsprimer              | GAACGGTGTGACTGACCAGAG             | 56°C                 |
| humanes und murines EphB2        | Rückwärtsprimer             | ACCACGACAGGGTGATGCT               | 56°C                 |
| humanes EphB3                    | Vorwärtsprimer              | GACCCTCATGGACACAAAATGG            | 58°C                 |
| humanes EphB3                    | Rückwärtsprimer             | GCCAGTTGTTCTGGCTTGACT             | 58°C                 |
| murines EphB3                    | Vorwärtsprimer              | TAACGCTGTGGAGGTCTCTGT             | 56°C                 |
| murines EphB3                    | Rückwärtsprimer             | CCTTGCTTTGCTTTGTAACCTCC           | 56°C                 |
| humanes und murines ephrinB1     | Vorwärtsprimer              | ATCATGAAGGTTGGGCAAGATC            | 56°C                 |
| humanes und murines ephrinB1     | Rückwärtsprimer             | TGACAGTGTGTCTGCCTCCT              | 56°C                 |
| humanes ephrinB2                 | Vorwärtsprimer              | CTCAACTGTGCCAAACCAGAC             | 58°C                 |
| murines ephrinB2                 | Vorwärtsprimer              | CTCAACTGTGCCAGACCAGAC             | 58°C                 |
| humanes und murines ephrinB2     | Rückwärtsprimer             | GTTATCCAGGCCCTCCAAAG              | 58°C                 |
| humanes ephrinB3                 | Vorwärtsprimer              | CGAAAACCTGTGTCTGAAATG             | 58°C                 |
| humanes ephrinB3                 | Rückwärtsprimer             | GGAGGTTGCATTGCTGGTG               | 58°C                 |
| murines ephrinB3                 | Vorwärtsprimer              | GCCCTGCTGCTGTTAGGTTT              | 58°C                 |
| murines ephrinB3                 | Rückwärtsprimer             | CCCGATCTGAGGATAAAGCAC             | 58°C                 |
| EphB2 YFP und EphB2 ΔC YFP       | Vorwärtsprimer, EcoRV, MluI | CGCCCCGATATCACGCGTCTGGC CATACTTG  | 58°C                 |
| EphB2 YFP und EphB2 ΔC YFP       | Rückwärtsprimer SacI        | GCGGGGCGCGGTACCGTCGACT GCAGAATTC  | 58°C                 |
| ephrinB1 CFP und ephrinB1 ΔC CFP | Vorwärtsprimer MluI, NotI   | CGCCCCACGCGTATGGAGCTCTT TTGG      | 58°C                 |
| ephrinB1 CFP und ephrinB1 ΔC CFP | Rückwärtsprimer             | GCGGGGGCGGCCGCTGAAGTGT GATGGATATC | 58°C                 |
| Humane und murine GAPDH          | Vorwärtsprimer              | GGTCATCCATGACAACTTTGGTA TCG       | 58°C                 |
| Humane und murine GAPDH          | Rückwärtsprimer             | GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG AC         | 58°C                 |

**Tabelle 20** Verwendete Primer für die PCR

### 3.4 Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenzmikroskopie erlaubt die Visualisierung von Proteinverteilungsmustern in Zellen und kann zudem Co-Lokalisationen von Proteinen nachweisen.

#### 3.4.1 Erstellung der Immunfluoreszenzpräparate

Es wurden stabil mit EphB2YFP transduzierte cos7-Zellen (3.1.7) untersucht. Diese wurden in 12-Well Platten mit Deckgläsern ausgesät und mit Plasmid-DNA der zu untersuchenden Proteine via Lipofektion transfiziert (3.1.3). Zudem wurden

untransfizierte Kontrollen ausgesät, sowie Kontrollproteine transfiziert. Hierdurch konnten bei der Auswertung der Bilder Unterschiede im EphB2-Verteilungsmuster zwischen Kontrollen und transfizierten Zellen untersucht werden.

Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1x Phosphat gepufferte Saline (PBS) gespült, ohne sie abzulösen.

Anschließend wurde 500 µl Methanol/Aceton-Gemisch (20% / 80%) zu den Zellen gegeben, um diese zu fixieren und für die spätere Antikörperinkubation zu permeabilisieren. Das Fixierreagenz wurde wieder abgesaugt und die Zellen in 300 µl Blocklösung mit Primärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei diente die Blocklösung der Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen. Den Kontrollen wurde lediglich Blocklösung ohne Antikörper hinzugegeben. Anschließend wurde dreimal mit 1x Phosphat gepufferter Saline gewaschen und für 30 Minuten mit Sekundärantikörper in Blocklösung inkubiert. Sekundärantikörper waren mit Fluoreszenzproteinen getagt, sodass die transfizierten Proteine mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden konnten. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser wurden vorsichtig entnommen und mit *ProLong Anti-Fade* mit oder ohne Dapi auf Objektträger aufgetragen. Die so erstellten Präparate wurden in kühler und dunkler Umgebung getrocknet.

### **3.4.2 Mikroskopie und Bildbearbeitung**

Die Präparate wurden in ein computergesteuertes Lichtmikroskop mit eingebauter Kamera und Fluoreszenzlampe eingespannt. Für die Mikroskopie der cos7-Zellen wurde durchweg ein Objektiv mit 63-facher Vergrößerung gewählt.

Unter Belichtung der Präparate mit spezifischen Wellenlängen durch die Fluoreszenzlampe wurden die Fluoreszenzproteine der Sekundärantikörper bzw. der stabil transduzierten Zellen zur Lichtemission angeregt. Für das YFP der stabil transduzierten Zellen wurde mit YFP-Filter belichtet. Für die Fluoreszenzproteine der Sekundärantikörper wurden entsprechende Filter gewählt. Je nach Stärke der Fluoreszenz wurden Belichtungszeiten zwischen 1000 und 4000 ms gewählt (bei Versuchen genauer angeführt). Mit der in das Mikroskop eingebauten Kamera und dem Programm *Visi View* konnten zweifarbige Bilder als tif-Dateien aufgenommen und gespeichert werden.

Die Bilder wurden hinsichtlich Kontrast und Helligkeit standardisiert mit dem Programm *ImageJ* bearbeitet und als *jpeg*-Dateien gespeichert. Die Bilder der einzelnen Fluoreszenzproteine wurden mittels *Merge*-Option von *ImageJ* übereinandergelegt. In alle Dateien wurde zur Visualisierung des Maßstabes ein Skalierungsbalken eingefügt.

### **3.5 Live Cell Imaging**

Für die Versuche wurden humane Podozyten vom Typ AB8/13 II (von Prof. M. Saleem, Bristol, Großbritannien) bis maximal zur 30. Passage verwendet. Diese waren stabil viral transduziert und mit Puromycin selektioniert, sodass sie die für den Versuch relevanten Fluoreszenz getagten Proteine exprimierten. Es wurden jeweils EphB2YFP transduzierte Zellen mit ephrinB1CFP transduzierte Zellen in Co-Kultur genommen.

Es wurden die Wildtypen untereinander, die Mutanten mit fehlender zytoplasmatischer Einheit ( $\Delta C$ ) untereinander und die Wildtypen mit den jeweiligen  $\Delta C$ -Mutanten des anderen Proteins untersucht. Durch Aufnahme von *Time Lapse* Videos konnte das Adhäsions- bzw. Repulsionsverhalten der Zellen untersucht werden.

### **3.5.1 Einzeln liegende, in Differenzierung befindliche Podozyten in Co-Kultur**

Nach Ablösen der Podozyten und Abzentrifugation des Trypsins (3.1.4) wurde das Zellpellet in Nährmedium ohne Puromycin resuspendiert. Durch Zellzählung in einer Neubauer-Kammer wurde der Zellgehalt der Suspension ermittelt. Anschließend wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von 10.000 Zellen pro Milliliter vorlag. Nun wurden die beiden stabil transduzierten Zellstämme, die in Co-Kultur genommen werden sollten, zu gleichen Anteilen in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und gut durchmischt. Anschließend wurden 2 ml der Zellsuspension in *2-Well Chambered Coverglasses* gegeben, sodass 20.000 Zellen pro *Well* vorlagen.

Nach gutem Mischen wurden die Zellen bei 37,5 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und differenzierten aus. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt.

Für das Mikroskopieren wurden die Zellen während der Ausdifferenzierung aus dem Inkubator entfernt. Das Medium wurde abgesaugt und phenolrotfreies RPMI-Medium mit 1 % ITS ohne FCS hinzugegeben.

### **3.5.2 Ausdifferenzierte, konfluente Podozyten in Co-Kultur**

Nach Passagieren der Podozyten und Abzentrifugation des Trypsinüberstandes (3.1.4) wurde das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert. Auf die Zugabe von Puromycin wurde verzichtet. Durch Zellzählung in einer Neubauer-Kammer wurde der Zellgehalt der Suspension ermittelt. Anschließend wurde die Zellsuspension so verdünnt, dass eine Zellkonzentration von 25.000 Zellen/ml vorlag. Nun wurde je 1 ml der Zellsuspension in ein *Well* einer *6-Well-Zellschale* gegeben, sodass jedes *Well* 25.000 Zellen enthielt (Monokultur). Die Zellen wurden durch Pipettieren vereinzelt und nach gutem Durchmischen bei 37,5 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dies erfolgte für beide stabil transduzierten Zellpopulationen, die im Experiment beobachtet wurden, zum selben Zeitpunkt. Die Zellen differenzierten in Monokultur aus. Während der Ausdifferenzierung der Podozyten wurde alle zwei Tage das Nährmedium erneuert.

Zwischen Tag 12 und 14 nach Start der Ausdifferenzierung wurden die Zellen nun trypsiniert und in Monokultur (Kontrolle) sowie Co-Kultur in *2-Well Chambered Coverglasses* überführt. Die Zellen wurden trypsiniert und der Trypsinüberstand nach Zentrifugation entfernt (3.1.4). Das Zellpellet wurde in Nährmedium resuspendiert.

Der Zellgehalt der Suspension wurde durch Zählung in einer Neubauer-Kammer ermittelt und die Zellen so verdünnt, dass 25.000 pro ml vorlagen. Für die Kontrollen, d.h. die Monokulturen der Eph- bzw. der Ephrin-Zellen, wurde 1 ml Zellsuspension in ein *Well* eines *2-Well Chambered Coverglass* gegeben, sodass 25.000 Zellen pro *Well* vorlagen.

Für die Co-Kulturen wurden gleiche Mengen der Zellsuspensionen beider zu untersuchender Podozytenpopulationen in ein Zentrifugationsröhrchen gegeben und gut vermischt.

Anschließend wurden 2 ml entnommen und in ein *Well* eines *2-Well Chambered Coverglass* überführt, sodass 50.000 Zellen pro *Well* vorlagen.

Die Zellen wurden nun nach guter Durchmischung bei 37,5°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

12-24 Stunden nach Anlage der Co-Kulturen wurde nun das Nährmedium abgesaugt und phenolrotfreies RPMI-Medium mit 1 % ITS ohne FCS hinzugegeben und die Zellen konnten mikroskopiert werden.

### 3.5.3 Mikroskopie, Bild- und Videobearbeitung

Die *Chambered Coverglasses* wurden in das Mikroskop mit eingebauter Inkubationskammer eingespannt. Computergesteuert wurden eine Temperatur von 37,5 °C und ein CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in der Kammer eingestellt. Der Verlauf der Bedingungen wurde mit Hilfe des Programmes *Incubation Remote Control 2* aufgezeichnet, welches die Messergebnisse des Temperaturkontrollgerätes und des CO<sub>2</sub>-Messgerätes dokumentierte.

Durch Belichtung der Zellen mit einer Fluoreszenzlampe und Filterung bestimmter Wellenlängen wurden die Fluoreszenz getagten Proteine zur Lichtemission angeregt. Je nach Fluoreszenzstärke der Proteine wurden Belichtungszeiten zwischen 1000 und 4000 ms gewählt (bei Versuchen genauer angeführt).

So konnten Eph-Rezeptoren (getagt mit gelb fluoreszierendem Protein = *yellow fluorescent protein*, YFP) und Ephrine (getagt mit zyan fluoreszierendem Protein = *cyan fluorescent protein*, CFP) in den Podozyten dargestellt werden. Für die Mikroskopie der Podozyten wurde grundsätzlich ein Objektiv mit 20-facher Vergrößerung gewählt. Das Programm *VisiView* konnte mit Hilfe einer in das Mikroskop eingebauten Kamera zweifarbig Bilder (schwarz-weiß) als tif-Dateien aufnehmen, die die Lichtemission der relevanten Proteine sichtbar machten. Das Objektiv der Kamera hatte einen Vergrößerungsfaktor von 1,0.

Für alle Versuche wurden Bilder von ausgewählten, repräsentativen Zellgruppen gemacht. Außerdem wurden *Time Lapse Movies* angefertigt. Bei den konfluenten, ausdifferenzierten Zellen wurden zusätzlich noch Aufnahmen der Monokulturen als Kontrolle gemacht. Bei jeder Aufnahme wurde ein Bild unter CFP- und YFP-gefilterter Fluoreszenz aufgenommen. Anschließend wurden die Aufnahmen mit Hilfe des Programmes *ImageJ* bearbeitet. Kontrast und Helligkeit wurden standardisiert eingestellt. Die entsprechenden Farben wurden angewendet. Die YFP-Aufnahmen wurden gelb, die CFP-Aufnahmen zyan gefärbt. Die YFP- und CFP-Aufnahmen wurden mit Hilfe der *Merge*-Option von *ImageJ* übereinandergelegt. Die so entstandenen *Merge*-Bilder konnten nun etwaige Interaktionen zwischen Eph und Ephrin zeigen. Ein Skalierungsbalken wurde zur Darstellung des Maßstabes eingefügt. Die Dateien wurden als jpeg-Dateien gespeichert.

Für die Aufzeichnung der *Time Lapse Videos* wurde das Programm *VisiView* so eingestellt, dass über eine bestimmte Zeitspanne und in gewissen Abständen (bei Versuchen detailliert angeführt) Aufnahmen gemacht wurden. Zudem konnte eine ablaufende Sequenz der gefilterten Wellenlängen eingestellt werden, sodass sowohl YFP als auch CFP aufgenommen werden konnten. Zudem wurde für jeden Zeitpunkt eine Durchlichtaufnahme angefertigt.

Kontrast, Helligkeit und Färbung wurden mit *ImageJ* eingestellt. Die CFP- und YFP-Aufnahmen wurden als *Merge* übereinandergelegt.

Die *Merge*-Aufnahmen wurden als *Stack* hintereinander gesetzt, so dass eine chronologische Bildsequenz entstand. Es wurden ein Skalierungsbalken sowie eine mitlaufende Uhr eingefügt, um den Maßstab bzw. den zeitlichen Verlauf zu visualisieren. Der *Stack* wurde als avi-Videodatei gespeichert, wobei zwölf Bilder pro Sekunde gezeigt wurden.

Die so entstandenen Videos wurden nun mit dem Programm *iMovie* standardisiert bearbeitet und abschließend in das mp4-Format konvertiert.

## 3.6 Mäuse

### 3.6.1 Lyse muriner Glomeruli

Für die Versuche wurden vorliegende Glomeruliisolate vier Monate alter 129P3/J Mäuse verwendet, welche nach der Methode von S. Potthoff et al. (Potthoff, Sitek et al. 2008) angefertigt worden waren.

Die aus den Mäusen entnommenen Glomeruli mussten lysiert werden, um anschließend Proteinexpressionen mittels Western-Blot untersuchen zu können. Die Glomeruli beider Nieren eines Tieres wurden in CHAPS-Lysispuffer aufgenommen und in Glasröhrchen überführt. Das Gewebe wurde mit dem *Tissue Ruptor* zerkleinert, in ein neues Glasröhrchen überführt und 30 Minuten auf Eis lysiert. Danach wurde 30 min. bei  $20.000 \times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und so der Zelldetritus absedimentiert. Mit einem *Magnetcatcher* wurden die freien *Dynabeads* am Boden des Röhrchens gehalten und das Lysat konnte entnommen und in *1,5 ml-Tubes* überführt werden. Zur Erstellung der Proben wurde zu drei Teilen Glomerulilysat ein Teil 4x Laemmli mit DTT gegeben. So wurden die Proteine linearisiert und ihre Faltung inhibiert. Abschließend wurden die Proben fünf Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekocht.

### 3.6.2 RNA-Isolierung aus murinen Glomeruli

Für die Versuche wurden vorliegende Glomeruliisolate vier Monate alter 129P3/J Mäuse verwendet, welche nach der Methodik von S. Potthoff et al. (Potthoff, Sitek et al. 2008) angefertigt worden waren.

Die RNA aus den Glomeruli wurde isoliert, um sie in cDNA umschreiben (s.3.3.8) und RNA-Expressionsversuche mittels PCR (s. 3.3.9) durchführen zu können.

Vor der eigentlichen RNA-Isolierung wurden die Glomeruli in *RNA Later*-Lösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Alle anschließenden Schritte fanden bei Raumtemperatur statt.

Die RNA-Isolierung wurde mit Hilfe des *RNEasy* Minikits von Qiagen durchgeführt.

Die *RNA Later*-Lösung wurde abpipettiert und das Gewebe in  $300\text{ }\mu\text{l}$  RLT-Puffer mit  $10\text{ }\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol unter Verwendung eines *Tissue Ruptors* homogenisiert. Weitere  $300\text{ }\mu\text{l}$  RLT-Puffer mit  $10\text{ }\mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol wurden hinzugegeben. Unter Pipettieren wurde gut durchmischt. Es folgte ein dreiminütiger Zentrifugationsschritt bei  $21.200 \times g$ . Der Überstand wurde auf die gDNA-Säule überführt und diese im Anschluss für 15 Sekunden bei  $8000 \times g$  zentrifugiert.  $500\text{ }\mu\text{l}$  siebzigprozentiges Ethanol wurden hinzugegeben und das entstandene Gemisch auf die DNA-Säule übertragen. Es wurde 15 Sekunden bei  $8000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden  $350\text{ }\mu\text{l}$  RW1-Puffer auf die Säule gegeben, bei  $8000 \times g$  15 Sekunden lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Elimination von gDNA wurden  $70\text{ }\mu\text{l}$  RDD Puffer und  $10\text{ }\mu\text{l}$  DNase auf die Säulen gegeben und 15 Minuten inkubiert. Die Säule wurde hiernach mit  $350\text{ }\mu\text{l}$  RW1-Puffer befüllt und für 15 Sekunden bei  $8000 \times g$  zentrifugiert. Die anschließenden Waschschritte entsprachen denen bei der RNA-Isolierung aus humanen Podozyten (vgl. 3.1.6).

## 4. Ergebnisse

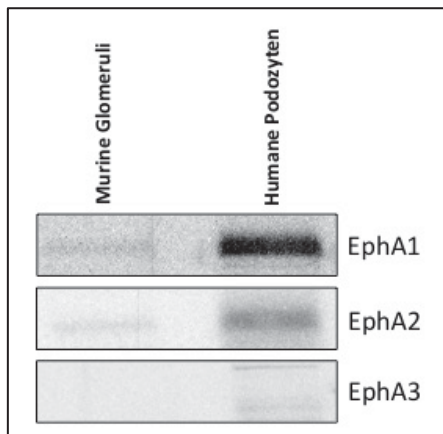
### 4.1 Proteinexpression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in humanen Podozyten

Die Proteinexpression der Eph-Rezeptoren (Eph) A1-A3 und B1-B3, sowie die Expression der ephrine A1, A2 und B1 wurde in Ganzzelllysaten humaner, immortalisierter Podozyten und lysierten, murinen Glomeruli mittels *SDS-Page* und *Western Blot* untersucht.

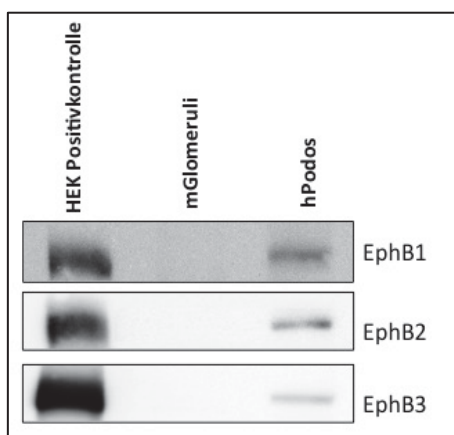
Für die Eph-Rezeptoren B1-B3 wurden zusätzlich HEK293T Zellen mit pcDNA V5.EphB1-B3 transfiziert und die Ganzzelllysate der Zellen als Positivkontrolle verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass humane Podozyten die Eph-Rezeptoren A1 und A2 (s. Abb. 8) sowie B1, B2 und B3 (s. Abb. 9) exprimieren. Die endogene Expression von EphA3 konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich in den Zellen eine Expression der ephrine A1, A2 und B1 (s. Abb. 10).

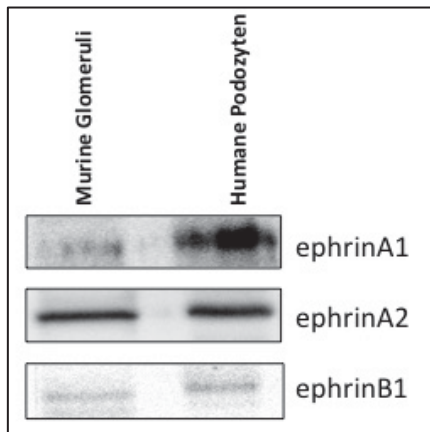
In murinen Glomeruli konnte keine Expression von EphA1, A2 und A3 sowie (s. Abb. 8) EphB1, B2 und B3 (s. Abb. 9) detektiert werden. Die ephrine A1, A2 und B1 werden in murinen Glomeruli exprimiert (s. Abb. 10).



**Abb. 8 Proteinexpression von EphA1, A2 und A3 in murinen Glomeruli und humanen Podozyten** Es wurden Ganzzelllysate von humanen, immortalisierten Podozyten sowie ein murines, glomeruläres Lysat erstellt. Im *Western-Blot* wurde gegen  $\alpha$ -EphA1,  $\alpha$ -EphA2 und  $\alpha$ -EphA3 gefärbt. EphA1 und A2 werden in humanen Podozyten jedoch nicht in murinen Glomeruli exprimiert. EphA3 wird weder in murinen Glomeruli noch in humanen Podozyten exprimiert.



**Abb. 9 Proteinexpression von EphB1, B2 und B3 in murinen Glomeruli und humanen Podozyten** Es wurden Ganzzelllysate von humanen, immortalisierten Podozyten sowie ein murines, glomeruläres Lysat erstellt. Im *Western-Blot* wurde gegen  $\alpha$ -EphB1,  $\alpha$ -EphB2 und  $\alpha$ -EphB3 gefärbt. EphB1, B2 und B3 werden in humanen Podozyten jedoch nicht in murinen Glomeruli exprimiert. Als Positivkontrolle wurden Lysate von mit EphB1, B2 und B3 transient transfizierten HEK293T-Zellen verwendet.



**Abb. 10 Proteinexpression von ephrinA1, A2 und B1 in murinen Glomeruli und humanen Podozyten** Es wurden Ganzzelllysate von humanen, immortalisierten Podozyten sowie ein murines, glomeruläres Lysat erstellt. Im *Western-Blot* wurde gegen  $\alpha$ -ephrinA1,  $\alpha$ -ephrinA2 und  $\alpha$ -ephrinB1 gefärbt. Die ephrine A1, A2 und B1 werden in humanen Podozyten und in murinen Glomeruli exprimiert.

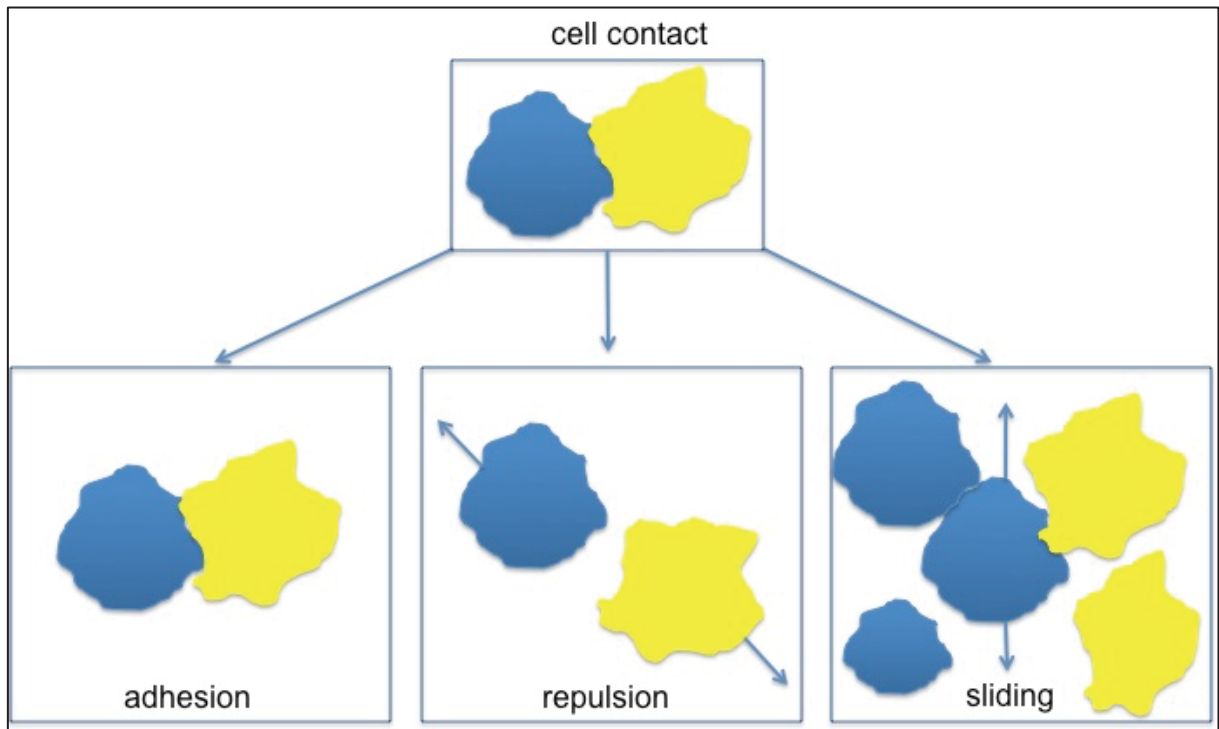
#### 4.2 Live Cell Imaging

Mit ephrinB1CFP sowie EphB2YFP stabil transduzierte Podozyten wurden in Co-Kultur via *Live Cell Imaging* auf ihr Positionierungsverhalten untersucht. Neben den Wildtypproteinen wurden zusätzlich die Mutanten von EphB2 und ephrinB1 ohne zytoplasmatische Domäne verwendet (EphB2 $\Delta$ C, ephrinB1 $\Delta$ C,  $\Delta$ C = *delta cytoplasmatic domain*), um den Einfluss der intrazellulären Proteindomänen beurteilen und etwaige Unterschiede zur Interaktion zwischen den Wildtypproteinen detektieren zu können.

Hierfür wurden sowohl in Differenzierung befindliche als auch ausdifferenzierte Podozyten untersucht. Es wurden für die Analyse unterschiedliche Observationszeiträume gewählt, da die ausdifferenzierten Zellen sich deutlich träger bewegten als die sich in Differenzierung befindlichen. So lagen die Observationszeiträume bei den in Differenzierung befindlichen Zellen zwischen 90 und 500 Minuten. Bei den ausdifferenzierten Podozyten wurden hingegen Observationszeiträume von 12 bis 24 Stunden gewählt.

Es wurden drei Kategorien der Zellinteraktionen festgelegt: Adhäsion, Repulsion und ein "Aneinandervorbeigleiten", im Folgenden als *Sliding* bezeichnet (s. Abb. 11).

Zur Auswertung wurden alle Zell-Zell-Kontakte dokumentiert und das Verhalten der Zellen einem der drei beobachteten Muster zugewiesen. Fand sich mehr als eine Art der Zellinteraktion zwischen zwei Zellen, so wurde der Punktwert für diesen Zellkontakt dezimal auf die beobachteten Verhaltensweisen aufgeteilt.



**Abb. 11: Veranschaulichung der drei beobachteten Zellinteraktionsmuster Adhäsion, Repulsion und Gleiten (*Sliding*)** Die gelben Zellen repräsentieren die mit EphB2YFP stabil transduzierten Podozyten, die blauen die mit ephrinB1CFP transduzierten Zellen.

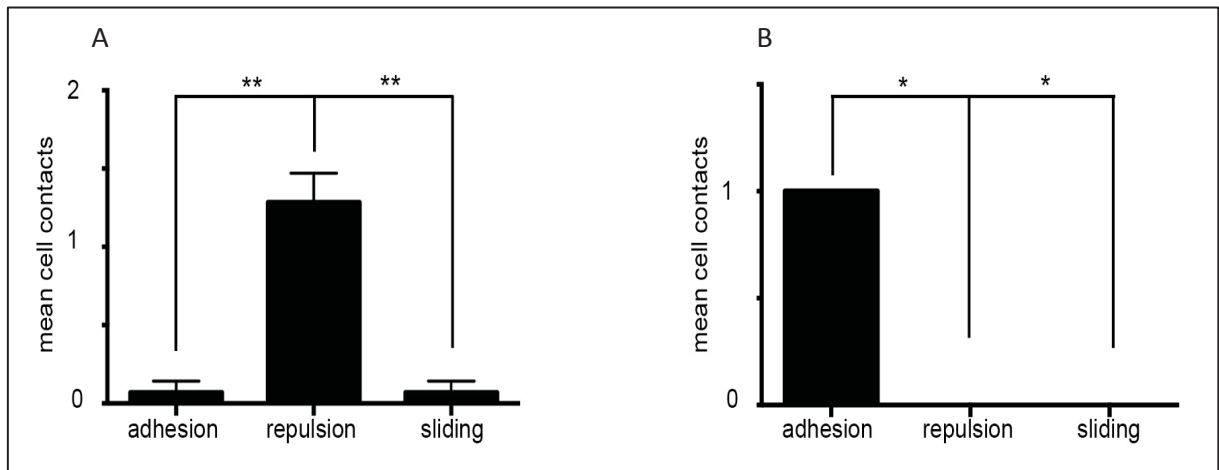
#### 4.2.1 In Ausdifferenzierung befindliche Podozyten

##### EphB2 und ephrinB1

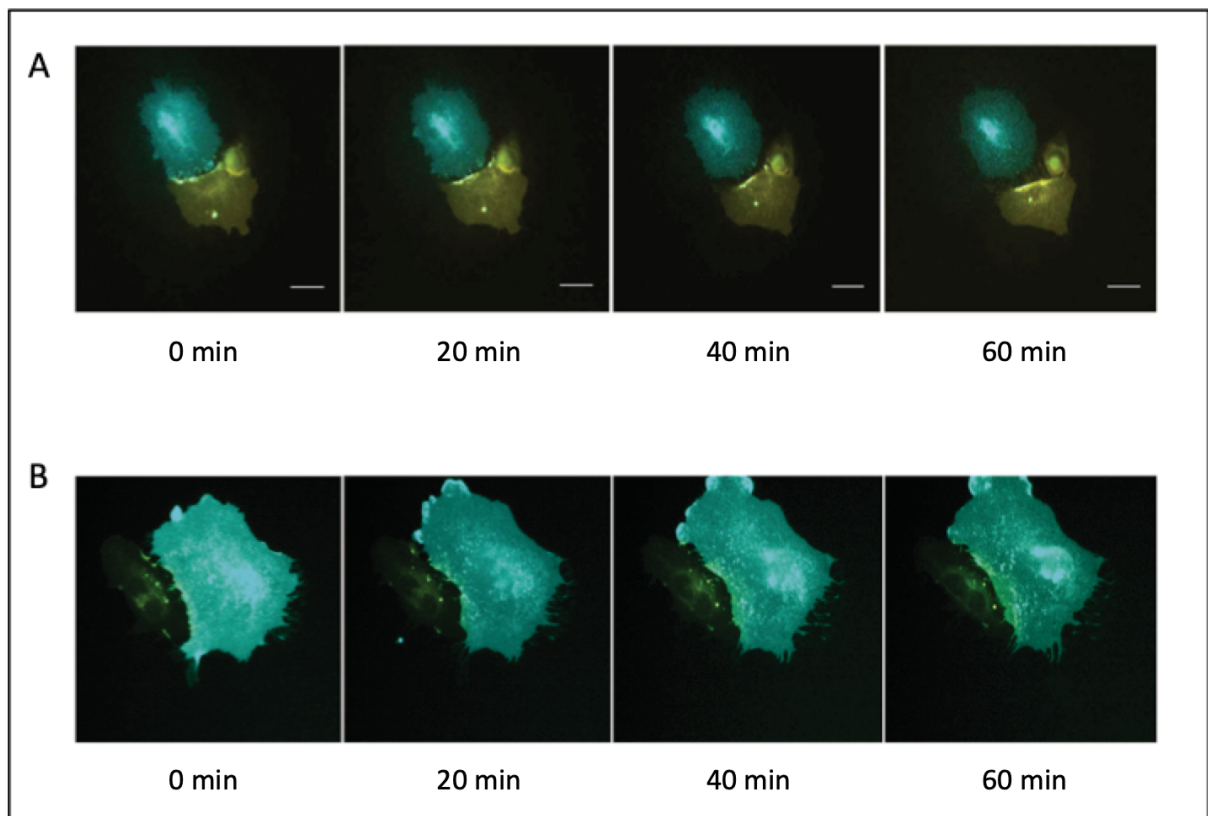
Zwischen EphB2 und ephrinB1 exprimierenden Podozyten kam es signifikant häufiger zu einer Repulsion als zu einer Adhäsion oder einem *Sliding*. So ließ sich bei insgesamt zehn beobachteten Zellinteraktionen acht Mal eine Repulsion der Zellen dokumentieren, wohingegen nur einmal eine Adhäsion zu beobachten war. In einem Fall kam es zum *Sliding* (Abb. 12, 13).

##### EphB2ΔC und ephrinB1

Es wurden in fünf Versuchsansätzen insgesamt vier Zellinteraktionen beurteilt. Es zeigten sich ausschließlich Zelladhäsionen. *Sliding* und Repulsion wurden nicht beobachtet. Dies zeigt eine signifikante Häufung von Adhäsion gegenüber Repulsion und *Sliding* auf dem 5 %-Signifikanzniveau (Abb. 12, 13).



**Abb. 12: Statistische Auswertung der Zellinteraktionen von in Differenzierung befindlichen Podozyten für die Versuchsansätze EphB2/ephrinB1 (A) sowie EphB2ΔC/ephrinB1 (B)** y-Achse: durchschnittliche Anzahl an Zellinteraktionen pro Versuchsansatz, x-Achse: die unterschiedlichen Interaktionsmuster Adhäsion, Repulsion und Sliding. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,01$ , \* $= p < 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiple comparisons,  $n=10$  (A),  $n=4$  (B)



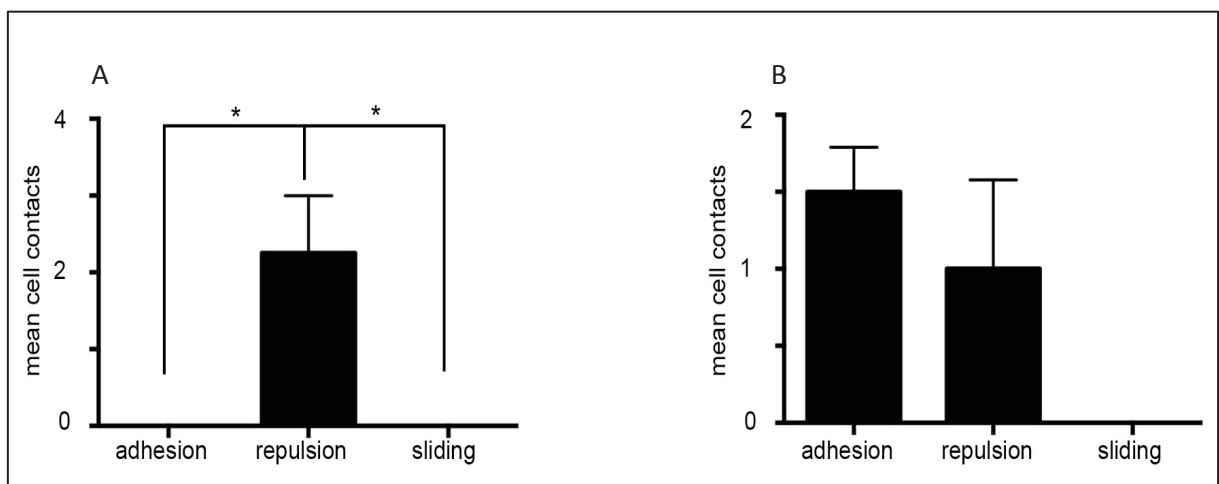
**Abb. 13 A: Interaktionsverhalten von EphB2YFP sowie ephrinB1CFP tragenden Podozyten in Differenzierung** Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt kommt es im Verlauf zur Abstoßung (Repulsion) der Zellen. Zyan leuchtet ephrinB1CFP, gelb EphB2YFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 20, 40 und 60 Minuten nach Versuchsbeginn. 100x Vergrößerung **B: Interaktionsverhalten von EphB2ΔCYFP sowie ephrinB1CFP tragenden Podozyten in Differenzierung** Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt verbleiben die Zellen adhären. Die unter A beschriebene Repulsion bleibt aus. Zyan leuchtet ephrinB1CFP, gelb EphB2ΔCYFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 20, 40 und 60 Minuten nach Versuchsbeginn. 100x Vergrößerung

### EphB2 und ephrinB1ΔC

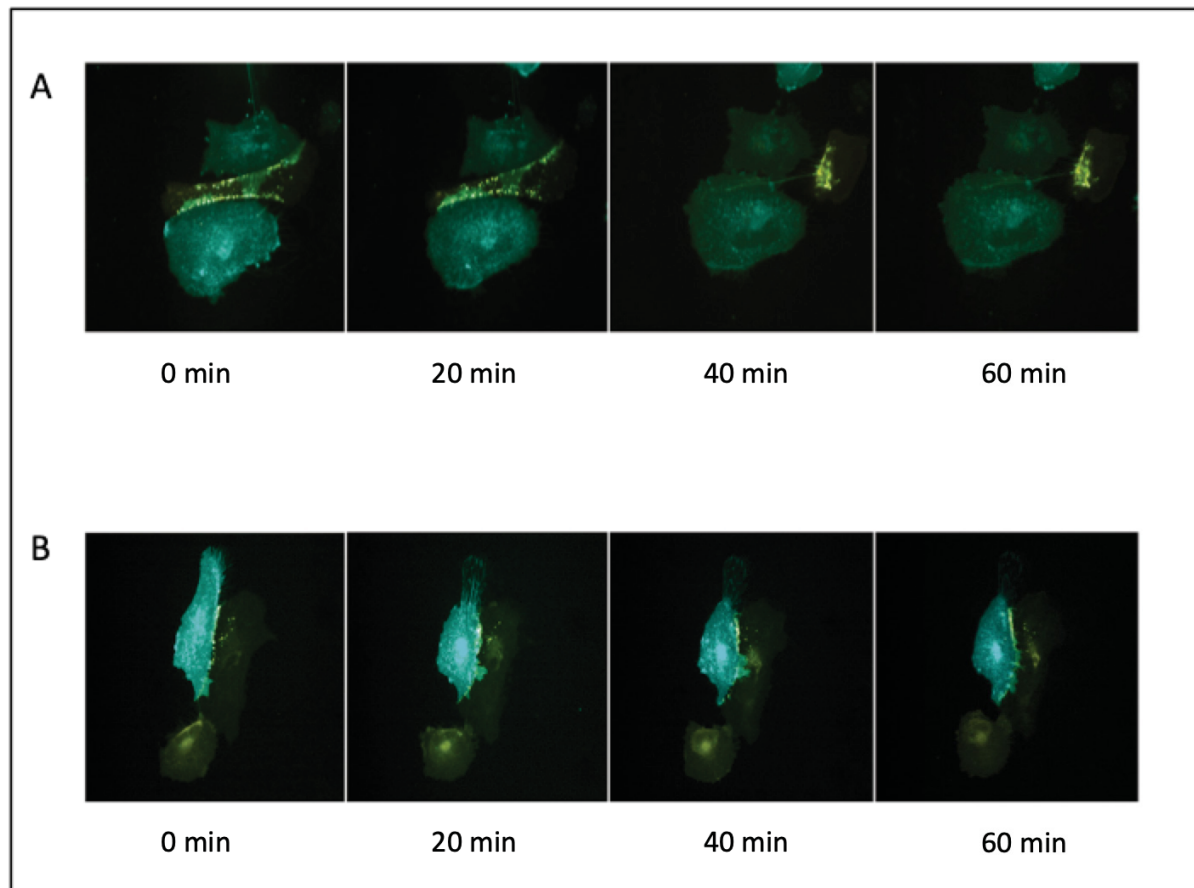
Bei insgesamt neun Zellinteraktionen zeigten sich ausschließlich Repulsionen. Adhäsion oder *Sliding* konnte nicht dokumentiert werden. Dies entspricht einer signifikanten Häufung von Repulsion gegenüber Adhäsion und *Sliding*. (Abb. 14,15).

### EphB2ΔC und ephrinB1ΔC

Bei zehn beobachteten Zellinteraktionen fanden sich sechs Mal eine Adhäsion und vier Mal eine Repulsion zwischen den Podozyten. *Sliding* fand sich nicht. Signifikante Unterschiede lagen nicht vor (Abb. 14,15).



**Abb. 14** Statistische Auswertung der Zellinteraktionen von in Differenzierung befindlichen Podozyten für die Versuchsansätze EphB2/ephrinB1ΔC (A) sowie EphB2ΔC/ephrinB1ΔC (B) y-Achse: durchschnittliche Anzahl an Zellinteraktionen pro Versuchsansatz, x-Achse: die unterschiedlichen Interaktionsmuster Adhäsion, Repulsion und *Sliding*. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,01$ , \* $= < p 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiple comparisons,  $n=10$  (A),  $n=9$  (B)



**Abb. 15 A: Interaktionsverhalten von EphB2YFP sowie ephrinB1ΔCCFP tragenden Podozyten in Differenzierung** Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt von zwei ephrinB1ΔC tragenden Zellen mit einer EphB2YFP tragenden kommt es im Verlauf zur Abstoßung, Repulsion, der EphB2 tragenden Zelle. Zyan leuchtet ephrinB1ΔCCFP gelb EphB2YFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 20, 40 und 60 Minuten nach Versuchsbeginn. 100x Vergrößerung **B: Interaktionsverhalten von EphB2ΔCYFP sowie ephrinB1ΔCCFP tragenden Podozyten in Differenzierung** Nach dem initialen Zell-Zell-Kontakt verbleiben die Zellen adhären. Die unter A beschriebene Repulsion bleibt aus. Zyan leuchtet ephrinB1ΔCCFP, gelb EphB2ΔCYFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 20, 40 und 60 Minuten nach Versuchsbeginn. 100x Vergrößerung

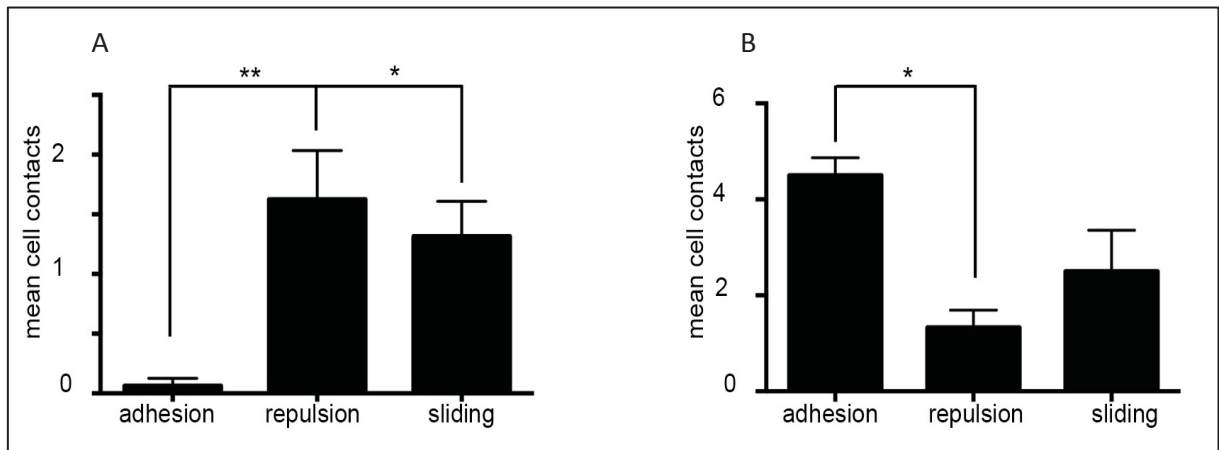
#### 4.2.2 Ausdifferenzierte Podozyten

##### EphB2 und ephrinB1

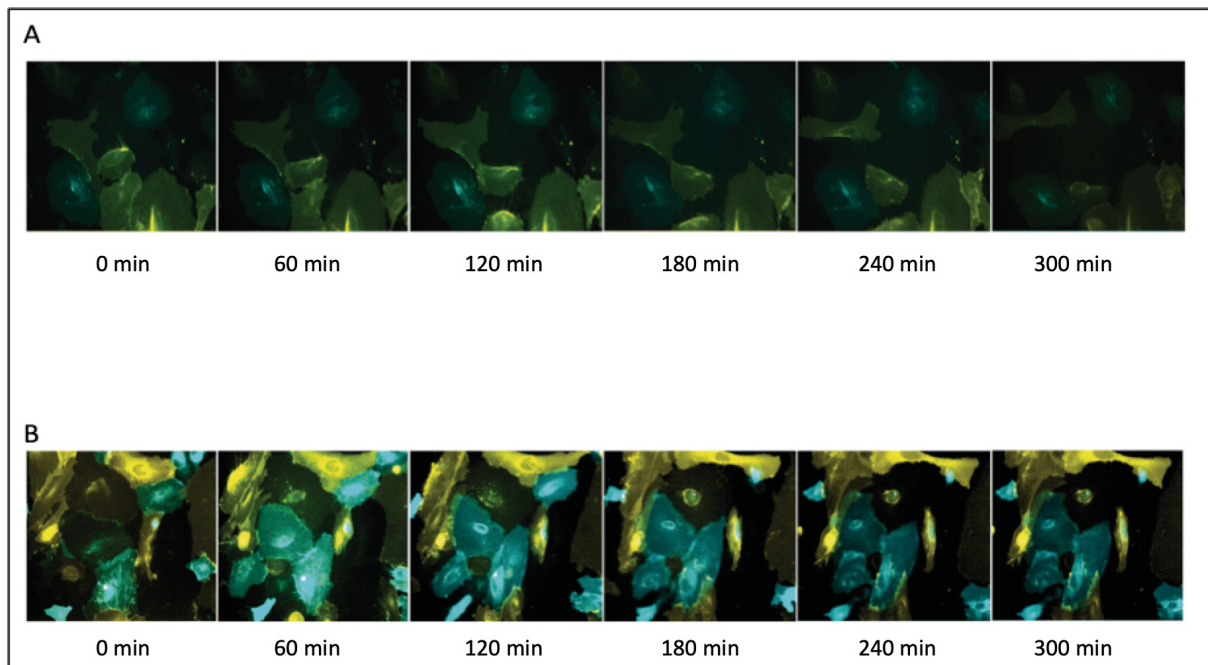
In acht Versuchsansätzen wurden insgesamt 24 Zellinteraktionen beobachtet. Hierbei konnte in 54 % eine Repulsion, in 44 % *Sliding* sowie in 2 % Adhäsion beobachtet werden. Dies entspricht einer signifikanten Häufung von Repulsion verglichen mit Adhäsion auf dem 1 %-Signifikanzniveau und einer signifikanten Häufung von Repulsion gegenüber *Sliding* auf dem 5 %-Signifikanzniveau (Abb. 16, 17).

##### EphB2ΔC und ephrin B1

In sechs Versuchsansätzen wurden 50 Zellinteraktionen beobachtet. Repulsion konnte in 16 %, Adhäsion in 54 % sowie *Sliding* in 30 % der Fälle beobachtet werden. Dies belegt eine signifikante Häufung von Adhäsion gegenüber Repulsion auf dem 5 %-Signifikanzniveau (Abb. 16, 17).



**Abb. 16** Statistische Auswertung der Zellinteraktionen von ausdifferenzierten Podozyten für die Versuchsansätze EphB2/ephrinB1 (A) sowie EphB2ΔC/ephrinB1 (B) y-Achse: durchschnittliche Anzahl an Zellinteraktionen pro Versuchsansatz, x-Achse: die unterschiedlichen Interaktionsmuster Adhäsion, Repulsion und Sliding. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,01$ , \* $= < p 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiple comparisons,  $n=24$  (A),  $n=50$  (B)



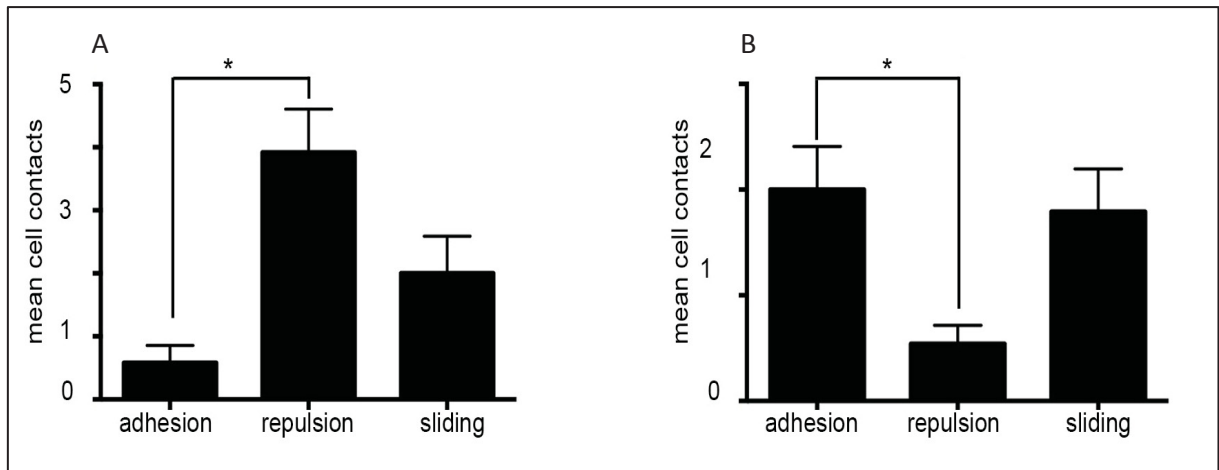
**Abb. 17 A: Interaktionsverhalten von EphB2YFP sowie ephrinB1CFP tragenden, differenzierten Podozyten** Mehrheitlich kann repulsives Zellverhalten gesehen werden. Außerdem zeigt sich ein ausgeprägtes Sliding. Zyan leuchtet ephrinB1CFP, gelb EphB2YFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 60, 120, 180, 240 sowie 300 Minuten nach Versuchsbeginn, 100x Vergrößerung. **B: Interaktionsverhalten von EphB2ΔCYFP sowie ephrinB1CFP tragenden, differenzierten Podozyten** Mehrheitlich findet sich Sliding sowie adhärenthes Zellverhalten bei Zell-Zell-Kontakt. Zyan leuchtet ephrinB1CFP, gelb EphB2ΔCYFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 60, 120, 180, 240 sowie 300 Minuten nach Versuchsbeginn, 100x Vergrößerung

### EphB2 und ephrinB1ΔC

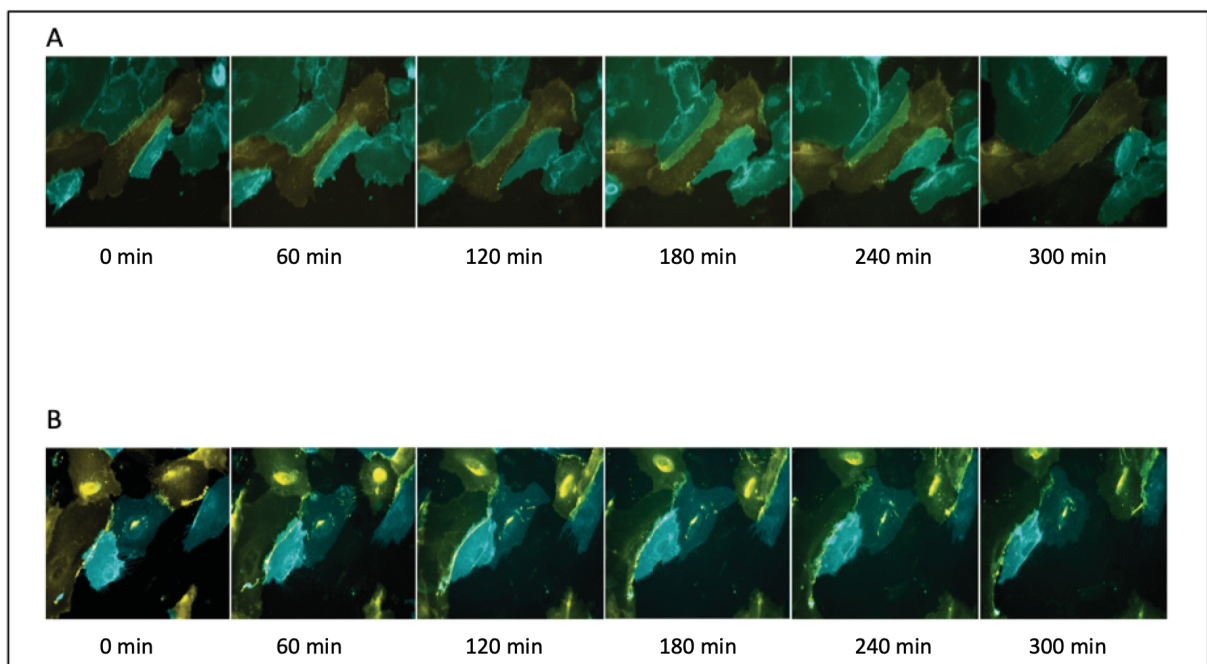
Bei fehlender intrazellulärer Domäne von ephrinB1 wurden insgesamt 39 Zellkontakte beurteilt. In 60 % kam es zur Repulsion, in 31 % zu Sliding sowie in 9 % zur Adhäsion. Eine Signifikanz zeigte sich hier für die Häufung von Repulsion gegenüber Adhäsion auf dem 5 %-Signifikanzniveau (Abb. 18, 19).

### EphB2 $\Delta$ C und ephrinB1 $\Delta$ C

Bei fehlender intrazellulärer Domäne von EphB2 und ephrinB1 wurden in sechs Versuchsansätzen insgesamt 52 Zellinteraktionen beobachtet. Adhäsion konnte in 46 %, *Sliding* in 41 % und Repulsion in 12,5 % der Fälle konstatiert werden. Eine signifikante Häufung von Adhäsion gegenüber Repulsion auf dem 5 %-Signifikanzniveau konnte nachgewiesen werden (Abb. 18, 19).



**Abb. 18: Statistische Auswertung der Zellinteraktionen von ausdifferenzierten Podozyten für die Versuchsansätze EphB2/ephrinB1 $\Delta$ C (A) sowie EphB2 $\Delta$ C/ephrinB1 $\Delta$ C (B)** y-Achse: durchschnittliche Anzahl an Zellinteraktionen pro Versuchsansatz, x-Achse: die unterschiedlichen Interaktionsmuster Adhäsion, Repulsion und *Sliding*. Gezeigt werden die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,01$ , \* $= < p 0,05$ , Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiple comparisons,  $n=39$  (A),  $n=52$  (B)



**Abb. 19 Interaktionsverhalten von EphB2YFP sowie ephrinB1 $\Delta$ CCFP tragenden, differenzierten Podozyten** Mehrheitlich kann repulsives Zellverhalten gesehen werden. Außerdem zeigt sich ein ausgeprägtes *Sliding*. Zyan leuchtet ephrinB1 $\Delta$ CCFP, gelb EphB2YFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 60, 120, 180, 240 sowie 300 Minuten nach Versuchsbeginn, 100x Vergrößerung **B: Interaktionsverhalten von EphB2 $\Delta$ CYFP sowie ephrinB1 $\Delta$ CCFP tragenden, differenzierten Podozyten** Mehrheitlich findet sich *Sliding* sowie adhärenes Zellverhalten bei Zell-Zell-kontakt. Zyan leuchtet ephrinB1 $\Delta$ CCFP, gelb EphB2 $\Delta$ CYFP. Darstellung der Zellen initial sowie nach 60, 120, 180, 240 sowie 300 Minuten nach Versuchsbeginn, 100x Vergrößerung.

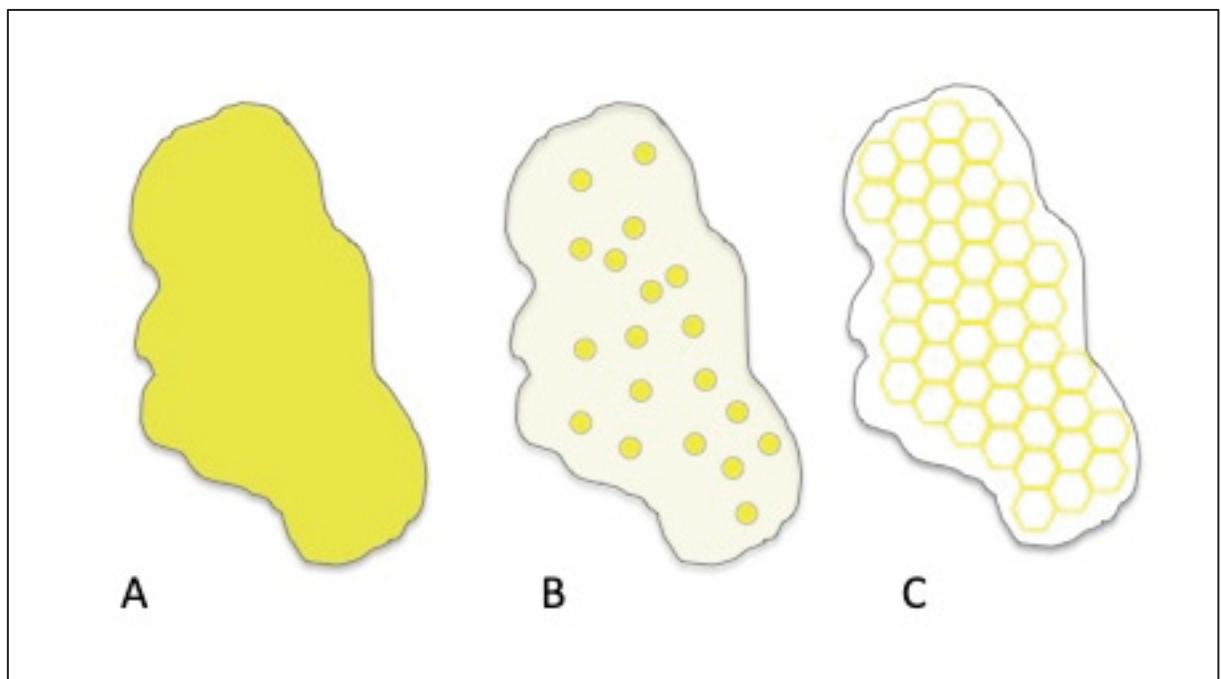
### 4.3 Zelluläres Verteilungsmuster von EphB2 in Abhängigkeit zur Co-Expression mit Nephrin

In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der EphB2-Rezeptor mit Nephrin interagiert und Nephrin phosphoryliert. Um das zelluläre Verteilungsmuster von EphB2-Rezeptoren und Nephrin zu untersuchen, wurden cos7-Zellen mit EphB2-YFP stabil transduziert. Zudem wurde transient mit Nephrin bzw. Podocin als Negativkontrolle transfiziert. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde Nephrin bzw. die Negativkontrolle rot dargestellt.

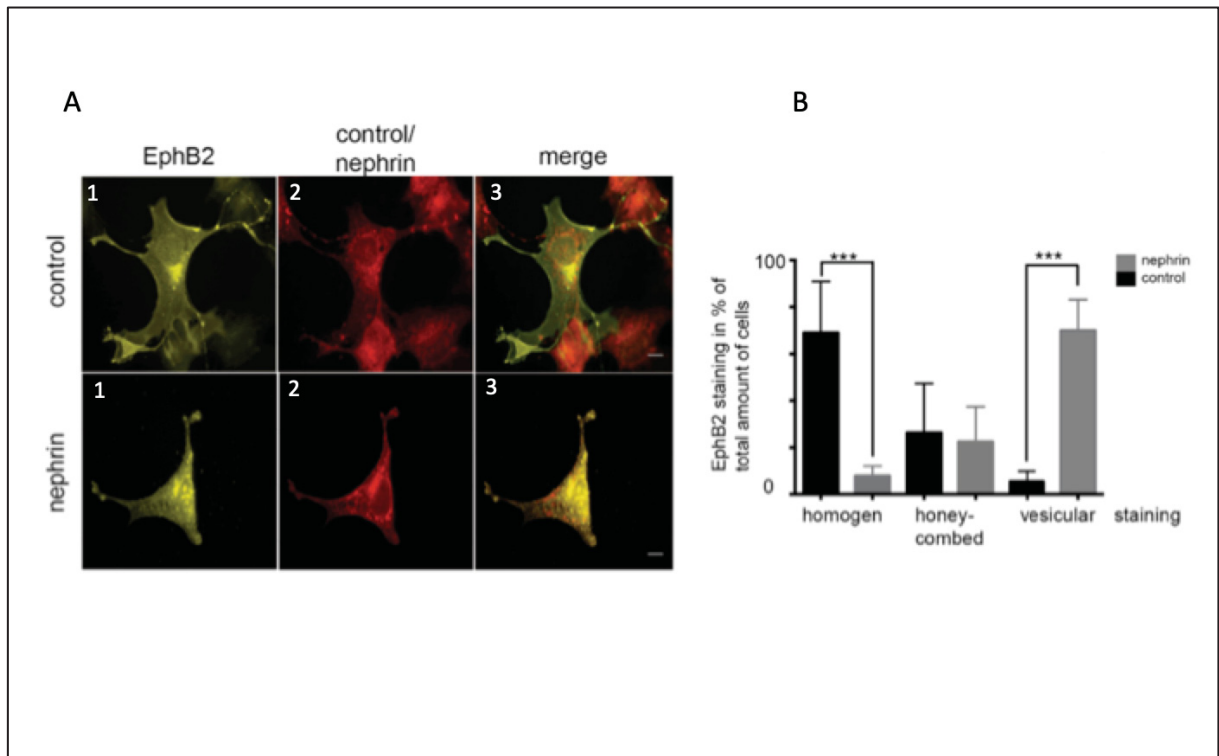
Insgesamt konnten drei unterschiedliche Verteilungsmuster des EphB2-Rezeptors über die Zellen beobachtet werden: ein homogenes, ein honigwabenartiges (*honey-combed*) sowie ein vesikuläres (s. Abb. 20). Nach Verblindung wurde jeder Zelle ein Verteilungsmuster zugewiesen. Konnten pro Zelle mehrere Verteilungsmuster gesehen werden, wurde der Punktwert dezimal auf die Verteilungsmuster aufgeteilt.

Insgesamt wurden 133 mit Nephrin transfizierte Zellen beobachtet. Hierbei ergaben sich 12,5 Punkte für das homogene Verteilungsmuster, 29,5 Punkte für das honigwabenartige Verteilungsmuster sowie 94 Punkte für das vesikuläre Verteilungsmuster.

Bei den Kontrollen wurden 120 Zellen beurteilt. Hier zeigte sich 79 Mal ein homogenes, 35 Mal ein honigwabenartiges und sechs Mal ein vesikuläres Verteilungsmuster. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass in den Kontrollzellen zumeist ein homogenes Verteilungsmuster von EphB2 vorlag. Im Vergleich zu den mit Nephrin transfizierten Zellen zeigte sich eine signifikante Häufung des homogenen Verteilungsmusters. Bei Nephrin transfizierten Zellen lag im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Häufung von vesikulärem Verteilungsmuster vor. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Häufung des honigwabenartigen Verteilungsmusters beobachtet werden (s. Abb. 21).



**Abb. 20: Schematische Darstellung der beobachteten Verteilungsmuster von EphB2 über die Zelle:** Die gelbe Farbe steht für EphB2-YFP; **A:** homogenes Verteilungsmuster von EphB2 **B:** Vesikuläres Verteilungsmuster von EphB2 **C:** Honigwabenartiges (*honey-combed*) Verteilungsmuster von EphB2



**Abb. 21 Zelluläres Verteilungsmuster von EphB2-Rezeptoren in Abhängigkeit zur Co-Expression mit Nephhrin**  
**A:** Cos7-Zellen wurden mit EphB2YFP stabil transduziert und mit Nephhrin (*nephhrin*) bzw. einem Kontrollplasmid (*control*) transient transfiziert. Mittels sekundärer Immunfluoreszenz wurde Nephhrin bzw. das Kontrollplasmid rot dargestellt. EphB2 (gelb,1), Nephhrin bzw. Kontrolle (rot,2). *Merge* – Co-Lokalisation (3), 400x Vergrößerung **B:** Statistische Auswertung der beobachteten Zellen im Hinblick auf das EphB2-Verteilungsmuster (*EphB2-staining*). Aufgetragen auf der y-Achse ist der Anteil an jeweiligem Verteilungsmuster bezogen auf die Gesamtheit beobachteter Zellen. Aufgetragen auf der x-Achse die Verteilungsmuster homogen, honigwabentartig (*honey-combed*) und vesikulär. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, Kruskal-Wallis-Test mit Dunns *multiple comparisons*, n=133 (mit Nephhrin transfizierte cos7-Zellen), n=120 (mit Kontrollplasmid transfizierte cos7-Zellen) \*\*\*p<0,01.

## 5. Diskussion

Die Eph-Rezeptoren EphA1, EphA2, EphB1, EphB2 und EphB3 werden in humanen Podozyten exprimiert. Ebenfalls konnte die Expression der Liganden ephrinB1, ephrinA1 und ephrinA2 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Humane Podozyten welche EphB2 und ephrinB1 auf ihrer Zelloberfläche tragen, zeigen nach Rezeptor-Liganden-Bindung eine Zellrepulsion. Diese ist abhängig von der zytoplasmatischen Domäne von EphB2, da bei deren Fehlen die zuvor beobachtete Repulsion ausbleibt und sich die Zellen adhären zeigen. Bei Co-Expression von EphB2 und Nephhrin zeigte sich in cos7-Zellen eine Umverteilung des EphB2-Rezeptors über der Zelle. Im Vergleich zur alleinigen Expression von EphB2, bei welcher sich ein homogenes Verteilungsmuster zeigt, kann bei Co-Expression mit Nephhrin ein eher vesikuläres Verteilungsmuster beobachtet werden.

### 5.1 Expression von Eph-Rezeptoren und Ephrinen in humanen Podozyten

Auf Proteinebene konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass die Rezeptoren EphA1, EphA2, EphB1, EphB2 und EphB3 sowie die ephrine A1, A2 und B1 im humanen Podozyten exprimiert werden. Bereits zuvor konnte von unserer Arbeitsgruppe via PCR-

Untersuchungen die Expression von EphB1-B3 im humanen Podozyten nachgewiesen werden (Doktorarbeit von Nils Haep). Hashimoto et al. zeigten, dass ephrinB1 auf Proteinebene in Podozyten exprimiert wird und an der podozytären Schlitzmembran lokalisiert ist (Hashimoto, Karasawa et al. 2007). Zudem konnte die Expression von EphB4 in Glomeruli von Ratten belegt und seine nephroprotektiven Eigenschaften durch Interaktion mit dem Liganden ephrinB2 nachgewiesen werden (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). EphrinB2 konnte in selbiger Arbeit in geringem Maße auch im Glomerulum detektiert werden (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). Im Zuge unserer Expressionsuntersuchungen gelang hingegen kein Expressionsnachweis von ephrinB2 im humanen Podozyten. Die Expression weiterer Eph-Rezeptoren und ephrine in der humanen Niere konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

## **5.2 EphB2/ephrinB1-Interaktion und ihr Einfluss auf Repulsion und Adhäsion von Podozyten**

Binden EphB2 und ephrinB1 aneinander, während sie auf der Zellmembran benachbarter Podozyten verankert sind, führt dies nach der initialen Bindung zur Repulsion der Zellen. Für die Repulsion ist die zytoplasmatische Domäne der EphB2-Rezeptoren essentiell, da die Podozyten bei Fehlen dieser Domäne in Adhäsion verbleiben. In hippokampalen Zellen wurde ebenfalls eine EphB2/ephrinB1 vermittelte Repulsion beschrieben (Noren und Pasquale 2004). In Analogie zu dem oben beschriebenen Effekt ephrinB1 und EphB2 vermittelter Repulsion in Podozyten ist in hippokampalen Zellen ebenfalls die zytoplasmatische Domäne EphB2 Rezeptoren für die Repulsion notwendig (Noren und Pasquale 2004).

### **5.2.1 Implikationen für die Physiologie**

Der glomeruläre Filter darf als hochspezialisiertes Proteinkonstrukt verstanden werden, dessen molekularer Aufbau essenziell für seine Größen- und Ladungsselektivität ist. Für die Größenselektivität spielt insbesondere die Architektur der podozytären Schlitzmembran eine zentrale Rolle (Rodewald und Karnovsky 1974). Die schlitzmembranären Poren weisen physiologischerweise eine Weite von in etwa 30-40 nm auf. Eine Aufrechterhaltung dieses Abstands darf als unerlässlich für die adäquate glomeruläre Filtration angesehen werden (Rodewald und Karnovsky 1974). Während die Podozyten sich mit ihren Sekundärfortsätzen im Bereich der Schlitzmembran sehr stark annähern, reichen die apikalen Pole ihres Somas in den Harn hinein. Hier sind die Abstände zwischen benachbarten Podozyten größer als im Bereich des Schlitzdiaphragmas (Kerjaschki 2001).

Hashimoto et al. konnten zeigen, dass der Ligand ephrinB1 direkt an der glomerulären Schlitzmembran exprimiert wird (Hashimoto, Karasawa et al. 2007). In *Western-Blot*-Untersuchungen konnten wir belegen, dass EphB2 im humanen Podozyten exprimiert wird. Ob EphB2 in direkter Nähe der Schlitzmembran exprimiert wird, wurde bisher nicht untersucht. Aufgrund des Vorkommens von Eph-Rezeptoren an *Adhaerens Junctions* (Fang, Ireton et al. 2008) lässt sich jedoch ein Vorkommen von Eph-Rezeptoren in direkter Nachbarschaft zur glomerulären Schlitzmembran vermuten, da diese molekular als modifizierte *Adhaerens Junction* klassifiziert wird (Reiser, Kriz et al. 2000). Beispielsweise könnte man analog zur Untersuchung von ephrinB1 (Hashimoto, Karasawa et al. 2007) versuchen, immunologisch markiertes EphB2 elektronenmikroskopisch in direkter Umgebung der Schlitzmembran darzustellen.

Die Interaktion von EphB2 und ephrinB1 führt zur Repulsion der Zellen, auf welchen die Proteine exprimiert sind. Dies konnte zunächst von Noren et al. in hippokampalen Zellen belegt werden (Noren und Pasquale 2004). Via *Live Cell Imaging* konnten wir zeigen, dass sich dieses Interaktionsmuster auch im humanen Podozyten wiederfindet. Durch die beobachtete Repulsion von Podozyten nach EphB2/ephrinB1-Interaktion könnte direkter Einfluss auf die Weite der schlitzmembranären Poren ausgeübt werden. Möglicherweise spielen die repulsiven Effekte eine Rolle bei der Homöostase der schlitzmembranären Porenweite, da sie eine über das physiologische Maß hinausgehende Annäherung (Adhäsion) der Zellen verhindern. In verschiedenen Geweben werden durch Eph/ephrin-Interaktion strikte Grenzen von Zellpopulationen ausgebildet (Triplett und Feldheim 2012, Cayuso, Xu et al. 2015). So wird etwa bei der Entstehung des retinalen Projektionssystems die genaue Topographie von Zellen ermöglicht (Triplett und Feldheim 2012). Möglicherweise wird auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des Podozytennetzwerks über Eph/ephrin vermittelte Effekte eine strikte Grenzausbildung zwischen benachbarten Podozyten vermittelt und so die physiologische Weite der schlitzmembranären Poren gewährleistet. Neben der direkten Interaktion von EphB2 und ephrinB1 an der glomerulären Schlitzmembran ist auch eine weiter apikal stattfindende Bindung denkbar. Hier sind die Abstände zwischen den benachbarten Podozyten physiologischer Weise größer. Hier könnte eine unphysiologische Annäherung der benachbarten Zellen durch EphB2/ephrinB1-Interaktion verhindert werden. Möglicherweise existiert ein Gradient der Eph- bzw. ephrin-Konzentration zwischen verschiedenen Zellbereichen. Möglicherweise liegt in den luminal gelegenen Podozytenabschnitten eine höhere Konzentration an EphB2 und ephrinB1 vor als in den Bereichen direkt an der Schlitzmembran, sodass hier eine gesteigerte Zellrepulsion zu finden ist und die physiologische Struktur des Podozytennetzwerks aufrechterhalten wird. Solche Eph-Konzentrationsgradienten in Zellen finden sich beispielsweise in der retinalen Karte, um dort strikte Zellgrenzen zu definieren (Triplett, Pfeifferberger et al. 2011).

Neben den zu vermutenden Prozessen im adulten Organismus stellt sich die Frage nach dem Einfluss Eph/ephrin vermittelter Effekte im Rahmen der Entwicklung des glomerulären Filters bzw. des Podozytennetzwerks. Eph/ephrin vermittelte Prozesse spielen in der embryonalen Entwicklung von Geweben eine entscheidende Rolle (Klein 2012). Bereits belegt werden konnte, dass EphB4 sowie ephrinB1 und ephrinB2 in Vorstufen des Glomerulum exprimiert werden (Hashimoto, Karasawa et al. 2007, Wnuk, Hlushchuk et al. 2012, Fukusumi, Zhang et al. 2018).

Inwieweit die von uns gemachten Beobachtungen auch *in vivo* auf humane Podozyten zutreffen, ist offen. Die von uns durchgeführten Versuche erfolgten mit immortalisierten Podozyten, welche nicht im physiologischen Maße die schlitzmembranären Proteine wie beispielsweise Nephrin und Podocin exprimieren. Auch primäre Podozyten verlieren schlitzmembranäre Proteine kurz nachdem sie in Kultur sind. Es gibt daher *in vitro* zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine besseren Modellsysteme zur Untersuchung von Podozyten.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass EphB2 Nephrin *in vitro* bindet und zu dessen Phosphorylierung beiträgt (Doktorarbeit von Nils Haep). Es ist bekannt, dass die Nephrinphosphorylierung an den Tyrosinen Y1176, Y1193 und Y1217 den glomerulären Filter stabilisiert (New, Martin et al. 2016). Somit kann impliziert werden, dass EphB2 protektiv auf den glomerulären Filter wirkt. Inwieweit die Bindung von EphB2 und Nephrin Einfluss auf die Interaktion von EphB2 mit ephrinB1 nimmt, ist unklar. In vielen Geweben sind Eph-Rezeptoren sowie ephrine im physiologischen Zustand herunterreguliert und werden nur im Rahmen reaktiver Prozesse bei

Zellschädigung vermehrt exprimiert (Janes, Adikari et al. 2008). Folglich stellt sich weitergehend die Frage, in welchem Maße EphB2 und ephrinB1 physiologischer Weise im Podozyten exprimiert werden und ob bzw. in welchem Ausmaß die von uns beobachtete Repulsion von Podozyten im gesunden Zustand stattfindet.

### **5.2.2 Implikation für die Pathophysiologie/proteinurische Nierenerkrankungen**

Grundlage für proteinurische Nierenerkrankungen sind Schädigungen des glomerulären Filters und insbesondere der Schlitzmembran, welche zu einem Verlust der Größenselektivität und der Undurchlässigkeit für Markerproteine führen. Podozyten reagieren auf schädigende Einflüsse wie Toxine oder hohe Scherkräfte durch so genanntes Podozyten-*Effacement* (Kriz, Shirato et al. 2013). Hierbei verlieren die Podozyten die interdigitierenden Fußfortsätze und imponieren als breite Zellkomplexe auf der glomerulären Basalmembran (Kriz, Shirato et al. 2013). Während Podozyten-*Effacement* auf der einen Seite als Marker für zelluläre Schädigung angesehen werden muss, dient es auf der anderen Seite zur anhaltenden Anheftung der Podozyten auf der glomerulären Basalmembran (GBM) und wirkt einem Podozytenverlust entgegen (Kriz, Shirato et al. 2013). Der Verlust von Podozyten ist irreversibel, da diese nicht mehr zur Zellteilung und somit zur Regeneration fähig sind. So steht Podozytenverlust in direktem Zusammenhang zur Entstehung terminalen Nierenversagens (Kriz, Shirato et al. 2013).

Die Interaktion von EphB2 und ephrinB1 führt zur Repulsion benachbarter Podozyten. Eine gesteigerte Expression von EphB2 und ephrinB1 könnte zur Entfernung der interdigitierenden, podozytären Fußfortsätze untereinander führen. EphB2/ephrinB1 vermittelte Effekte könnten somit eine Rolle bei der Entstehung von podozytärem *Effacement* spielen. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund der Erkenntnisse aus anderen Geweben wie etwa der Haut interessant, wo nach zellulärer Schädigung Eph vermittelte Prozesse reaktive zelluläre Prozesse vermitteln und zur Wundheilung beitragen. Auch in der Niere wurde schon gezeigt, dass bei glomerulärem Schaden im Rahmen der Thy1.1-Nephritis in Ratten EphB4 eine Schlüsselrolle bei der Rekonstitution spielt und dessen Inhibierung zu gesteigertem glomerulären Schaden mit konsekutiver Proteinurie führt (Wnuk, Hlushchuk et al. 2012). Im Tubulussystem konnte außerdem belegt werden, dass nach Ischämie EphA2 im Rahmen der Reperfusion hochreguliert wird (Baldwin, Chen et al. 2006). Folglich stellt sich die Frage, inwieweit auch die EphB2/ephrinB1-Interaktion bei glomerulärer Schädigung eine Rolle spielt und ob es eine Hochregulation im Rahmen pathologischer Prozesse gibt. Fukusumi et al. konnten zeigen, dass bei einem Patienten mit proteinurischer Nierenerkrankung ephrinB1 herabreguliert ist (Fukusumi, Zhang et al. 2018). Dies könnte zum einen bedeuten, dass der Verlust von ephrinB1 zu glomerulärem Schaden führt, zum anderen könnte es jedoch auch den Verlust von Podozyten und damit einhergehende, geringere Expression von ephrinB1 widerspiegeln. Die von unserer Arbeitsgruppe belegte Phosphorylierung von Nephrin durch EphB2 *in vitro* (Doktorarbeit von Nils Haep) könnte zudem mit oder ohne gesteigerte Expression von EphB2 bei podozytärer Schädigung zu einer Stabilisierung des glomerulären Filters beitragen, da Nephrinphosphorylierung für die Integrität des podozytären Filters essenziell ist (New, Martin et al. 2016). In unseren Versuchen wurden immortalisierte, humane Podozyten verwendet, welche im Gegensatz zu Podozyten *in vivo* kaum bis kein Nephrin exprimieren. Das podozytäre Zellverhalten könnte durch eine EphB2/Nephrin-Interaktion zusätzlich beeinflusst werden und eine Repulsion der Podozyten erst bei stark gesteigerter Expression von EphB2 bzw. ephrinB1 ausgelöst werden. Ebenfalls ist

nicht geklärt, welche Rolle eine Nephrinphosphorylierung für die EphB2/ephrinB1 vermittelte Repulsion von Podozyten spielt.

### **5.3 Beeinflussung des Verteilungsmusters von EphB2 durch Nephrin**

Die Verteilung von EphB2 in cos7-Zellen wird signifikant durch die gleichzeitige Expression von Nephrin beeinflusst. Während bei alleiniger Expression von EphB2 ein homogenes Verteilungsmuster von EphB2 prädominiert, zeigt sich bei Co-Expression mit Nephrin ein eher vesikuläres Verteilungsmuster. Dies belegt eine Umverteilung der EphB2-Rezeptoren innerhalb der Zelle bei Interaktion mit Nephrin. Wie bereits erwähnt konnte unsere Arbeitsgruppe zudem belegen, dass Nephrin durch EphB2 phosphoryliert wird und dies zu einer Stabilisierung des glomerulären Filters und der Schlitzmembran führt. Hierbei findet die Bindung von Nephrin an EphB2 am extrazellulären EphB2-Anteil statt (Doktorarbeit von Nils Haep). Die intrazellulär gelegene Kinasedomäne des EphB2-Rezeptors spielt für die Nephrinphosphorylierung die entscheidende Rolle, wie Mutationsanalysen ergaben (Doktorarbeit Nils Haep). Hierbei ist die Nephrinphosphorylierung durch Src-Kinasen anzunehmen, da sowohl bekannt ist, dass nach Eph-Aktivierung Proteine durch Src-Kinasen phosphoryliert werden, als auch, dass Nephrin von Src-Kinasen phosphoryliert werden kann (Bruckner und Klein 1998, Lahdenpera, Kilpelainen et al. 2003). Des Weiteren ist eine Nephrin vermittelte Endozytose von EphB2 denkbar, welche die EphB2/ephrinB1 vermittelte Repulsion unterbindet, da EphB2 dann nicht mehr auf der Zellmembran verankert vorliegt und so eine Bindung an ephrinB1 auf benachbarten Zellen unterbunden wird. Der Verlust von Nephrin steht in direktem Zusammenhang mit podozytären Schaden (Huttunen 1976). Geht man von einer Nephrin vermittelten Endozytose von EphB2 im physiologischen Zustand und somit zu einem Ausbleiben von EphB2/ephrinB1 vermittelter Repulsion aus, so könnte es bei Nephrinverlust durch die EphB2/ephrinB1 initiierte Repulsion zu Podozyten-*Effacement* kommen. Eine Nephrin vermittelte Endozytose von EphB2 kann durch das von uns beobachtete vesikuläre Verteilungsmuster von Ephb2 impliziert werden. Inwieweit EphB2/Nephrin-Interaktion wirklich zur Endozytose von EphB2 muss in daraufhin ausgerichteten Versuchen belegt werden.

### **5.4 Rolle der EphB2-Tyrosinkinasedomäne für die Adhäsion und Repulsion von Podozyten sowie für den Podozyten im Allgemeinen**

Während bei der Interaktion von EphB2 und ephrinB1 tragenden Zellen eine signifikante Häufung von Repulsion gegenüber Adhäsion zu beobachten ist, konnte sowohl in ausdifferenzierten als auch in ausdifferenzierenden Podozyten eine verstärkte Adhäsion bei Fehlen der zytoplasmatischen EphB2-Domäne beobachtet werden. Ein Wegfall der zytoplasmatischen Domänen von EphB2 und ephrinB1 konnte in ausdifferenzierten Podozyten ebenfalls eine vermehrte Adhäsion belegt werden. In ausdifferenzierenden Zellen mit fehlenden, zytoplasmatischen Anteilen von EphB2 und ephrinB1 fand sich hingegen weder gehäufte Repulsion noch Adhäsion. Bei intakter zytoplasmatischer Domäne von EphB2 und fehlender zytoplasmatischer Domäne von ephrinB1 findet sich wiederum die bei den Wildtypen beobachtete Repulsion. Insgesamt lässt sich so belegen, dass für das repulsive Verhalten der Podozyten die intrazelluläre Domäne von EphB2 essenziell ist. Das Fehlen der zytoplasmatischen ephrinB1-Domäne führt hingegen nicht zu einer Änderung des bei den Wildtypen beobachteten, repulsiven Zellverhaltens.

Wie bereits erwähnt konnte dieser Effekt ebenfalls in hippokampalen Zellen gezeigt werden (Noren und Pasquale 2004).

Bei fehlendem intrazellulären Anteil von EphB2 kommt es zu einem Verlust der juxtramembranären Domäne, der Tyrosinkinasedomäne, des SAM sowie der PDZ-Domäne. So kann sowohl die Autophosphorylierung von Eph als auch die Interaktion mit GDP-Austauschfaktoren und die Aktivierung von Proteinkinasen (z.B. Src-Kinasen) nicht stattfinden. Letztlich verhindert dies die Effekte auf das Zytoskelett und damit die beim Wildtyp beobachtete Repulsion. Zudem sind intrazelluläre Anteile von Eph-Rezeptoren wie das SAM und auch die juxtramembranäre Domäne potenzielle Bindungsstellen für weitere Eph-Rezeptoren. Die Signaltransduktion von Eph-Rezeptoren wird durch *Clustering* im Sinne einer Homo- bzw. Heterooligomerisierung initiiert, welche ohne diese potenziellen Bindungsstellen nicht stattfinden kann (Kullander und Klein 2002).

### **5.5 Potentielle Targets der EphB-Rezeptortyrosinkinasen am glomerulären Filter**

Eph/ephrin vermittelte Repulsion und Adhäsion wird durch Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie sowie von G-Proteinen, welche GTPase-Aktivität aufweisen, vermittelt (Noren und Pasquale 2004). Durch Interaktion dieser GTPasen mit dem Zytoskelett kommt es zu Aktinpolymerisierung und so zur Bewegung der Zellen (Noren und Pasquale 2004). Diese durch GTPasen vermittelten Effekte wurden vor allem in neuronalen Zellen beschrieben. Auch im humanen Podozyten werden GTPasen der Rho-Familie exprimiert (Lal und Tryggvason 2012). Eine gesteigerte Aktivität von RhoA und Rac1 führt zu glomerulärer Dysfunktion und Proteinurie (Lal und Tryggvason 2012, Wang, Ellis et al. 2012). Ein Mangel an RhoA im humanen Podozyten führt jedoch andererseits zu zytoskelettaler Instabilität von Podozyten in Mäusen (Lal und Tryggvason 2012). Ein Verlust von Rac1 resultiert in einer unphysiologisch gesteigerten RhoA-Aktivität, was zu fokaler segmentaler Glomerulosklerose in Mäusen führt (Lal und Tryggvason 2012). Die Rho-GTPase cdc42 ist essenziell für die Aufrechterhaltung des podozytären Polaritätskomplexes (Lal und Tryggvason 2012). Folglich scheint das Maß an Expression und Aktivität der Rho-GTPasen entscheidend für die Integrität der Podozytenfunktion zu sein.

Gesteigerte Eph/ephrin-Interaktion führt zu einer gesteigerten Aktivität der Rho-GTPasen, wohingegen ein gewisses Maß an GTPase-Aktivität auch im nicht aktivierten Zustand vermittelt wird. Dies gilt vornehmlich für cdc42 (Noren und Pasquale 2004). Cdc42-Aktivität wird auch in nicht aktiviertem Zustand von Eph-Rezeptoren vermittelt und ist wie oben beschrieben wichtig für die Aufrechterhaltung des Polaritätskomplexes des Podozyten. RhoA- und Rac1-Aktivität werden nach Eph/ephrin-Interaktion gesteigert und führen im Podozyten zu Proteinurie und glomerulärer Dysfunktion. Folglich lässt sich implizieren, dass auch das Maß an Eph-ephrin-Interaktion entscheidend für eine physiologische Podozytenfunktion ist, da eine überschießende Eph-Signaltransduktion in gesteigerter Rho- und Rac1-Aktivität münden würde und so glomeruläre Schädigung auslösen kann. Andererseits könnte die gesteigerte Aktivität von Eph-Rezeptoren und GTPasen in Podozyten-*Effacement* resultieren, welches bei podozytärer Schädigung den kompletten Podozytenverlust von der glomerulären Basalmembran verhindert, jedoch mit einer Funktionseinschränkung des glomerulären Filters im Sinne einer Proteinurie einhergeht.

## 5.6 Stärken und Schwächen der Arbeit sowie Ausblick

Mit dieser Arbeit konnten die bereits zuvor bestehenden Erkenntnisse bezüglich der Expression von Eph-Rezeptoren und ephrinen im humanen Podozyten auf Proteinebene unterstrichen und erweitert werden. Zudem wurde erstmals eine Methode entwickelt, humane Podozyten, welche Eph-Rezeptoren und ephrine exprimieren, via *Live Cell Imaging* zu beobachten und die Zell-Zell-Interaktionen in Echtzeit nachzuvollziehen. Diese Beobachtungen wurden an immortalisierten Podozyten *in vitro* gemacht, welche die physiologisch vorkommenden, schlitzmembranären Proteine nicht exprimieren. Ein anderes Zellkulturmodell für humane Podozyten existiert jedoch nicht und eine mikroskopische Untersuchung der Repulsion und Adhäsion von Podozyten *in vivo* ist zumindest zur Zeit technisch noch nicht möglich. Zudem ist zu sagen, dass die Beurteilung des Zellverhaltens nicht softwaregestützt sondern verblindet vom Untersucher selbst vorgenommen wurde. Versuche, mittels eines automatisierten Programms die Zellbewegung zu analysieren, scheiterten aufgrund der feinen zellulären Ausläufer und der teils zu geringen Immunfluoreszenz. In manchen Versuchsansätzen lagen insgesamt wenige Zellinteraktionen vor, anhand welcher die statistische Auswertung bezüglich Adhäsion, Repulsion und *Sliding* erfolgte. Höhere n-Zahlen wären wünschenswert für noch aussagekräftigere Ergebnisse.

Es konnte gezeigt werden, dass die Co-Expression von Nephrin und EphB2 in cos7-Zellen zu einer Änderung des Verteilungsmusters von EphB2 über die Zelle führt. Die hieraus entstehenden Implikationen sind Anstoß zu weiteren Überlegungen, inwieweit Nephrin/Eph-Interaktion zu physiologischen bzw. pathophysiologischen Prozessen führt. Ob Nephrinbindung an EphB2 wirklich zu einer Endozytose oder zu einem Eph-*Clustering* führt, muss jedoch in weiterführenden, daraufhin ausgerichteten Versuchen untersucht werden.

Insgesamt ist offen, inwieweit die korrekte Expression von EphB2 und ephrinB1 im humanen Podozyten essenziell für eine normale Nierenfunktion ohne Proteinurie ist. *In vivo* müsste untersucht werden, ob der Verlust von Eph-Rezeptoren oder ephrinen (*Knock-Out*-Mutationen) zu Proteinurie oder Nierenversagen führt. Hier liegen bereits erste Untersuchungen bzgl. ephrinB1-Verlust und damit einhergehender Proteinurie vor (Fukusumi, Zhang et al. 2018)

## 6. Quellenverzeichnis

- Baldwin, C., Chen, Z. W., Bedirian, A., Yokota, N., Nasr, S. H., Rabb, H. und Lemay, S. (2006). "Upregulation of EphA2 during in vivo and in vitro renal ischemia-reperfusion injury: role of Src kinases." Am J Physiol Renal Physiol **291**(5): F960-971.
- Bruck, K., Stel, V. S., Gambaro, G., Hallan, S., Volzke, H., Arnlov, J., Kastarinen, M., Guessous, I., Vinhas, J., Stengel, B., Brenner, H., Chudek, J., Romundstad, S., Tomson, C., Gonzalez, A. O., Bello, A. K., Ferrieres, J., Palmieri, L., Browne, G., Capuano, V., Van Biesen, W., Zoccali, C., Gansevoort, R., Navis, G., Rothenbacher, D., Ferraro, P. M., Nitsch, D., Wanner, C., Jager, K. J. und European, C. K. D. B. C. (2016). "CKD Prevalence Varies across the European General Population." J Am Soc Nephrol **27**(7): 2135-2147.
- Bruckner, K. und Klein, R. (1998). "Signaling by Eph receptors and their ephrin ligands." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 375-382.
- Buchert, M., Schneider, S., Meskenaite, V., Adams, M. T., Canaani, E., Baechi, T., Moelling, K. und Hovens, C. M. (1999). "The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain." J Cell Biol **144**(2): 361-371.
- Cayuso, J., Xu, Q. und Wilkinson, D. G. (2015). "Mechanisms of boundary formation by Eph receptor and ephrin signaling." Dev Biol **401**(1): 122-131.
- Cramer, K. S. und Miko, I. J. (2016). "Eph-ephrin signaling in nervous system development." F1000Res **5**.
- Currie, G. und Delles, C. (2013). "Proteinuria and its relation to cardiovascular disease." Int J Nephrol Renovasc Dis **7**: 13-24.
- Daniels, B. S., Deen, W. M., Mayer, G., Meyer, T. und Hostetter, T. H. (1993). "Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods." J Clin Invest **92**(2): 929-936.
- Donoviel, D. B., Freed, D. D., Vogel, H., Potter, D. G., Hawkins, E., Barrish, J. P., Mathur, B. N., Turner, C. A., Geske, R., Montgomery, C. A., Starbuck, M., Brandt, M., Gupta, A., Ramirez-Solis, R., Zambrowicz, B. P. und Powell, D. R. (2001). "Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN." Mol Cell Biol **21**(14): 4829-4836.
- Drumond, M. C. und Deen, W. M. (1994). "Structural determinants of glomerular hydraulic permeability." Am J Physiol **266**(1 Pt 2): F1-12.
- Fang, W. B., Ireton, R. C., Zhuang, G., Takahashi, T., Reynolds, A. und Chen, J. (2008). "Overexpression of EPHA2 receptor destabilizes adherens junctions via a RhoA-dependent mechanism." J Cell Sci **121**(Pt 3): 358-368.
- Fouchier, R. A., Meyer, B. E., Simon, J. H., Fischer, U. und Malim, M. H. (1997). "HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import." EMBO J **16**(15): 4531-4539.
- Frei, U. und Schober-Halstenberg, H. J. (1999). "Annual Report of the German Renal Registry 1998. QuaSi-Niere Task Group for Quality Assurance in Renal Replacement Therapy." Nephrol Dial Transplant **14**(5): 1085-1090.
- Fukusumi, Y., Zhang, Y., Yamagishi, R., Oda, K., Watanabe, T., Matsui, K. und Kawachi, H. (2018). "Nephrin-Binding Ephrin-B1 at the Slit Diaphragm Controls Podocyte Function through the JNK Pathway." J Am Soc Nephrol **29**(5): 1462-1474.
- Gerke, P., Huber, T. B., Sellin, L., Benzing, T. und Walz, G. (2003). "Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1." J Am Soc Nephrol **14**(4): 918-926.

Girndt, M., Trocchi, P., Scheidt-Nave, C., Markau, S. und Stang, A. (2016). "The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1)." Dtsch Arztebl Int **113**(6): 85-91.

Hashimoto, T., Karasawa, T., Saito, A., Miyauchi, N., Han, G. D., Hayasaka, K., Shimizu, F. und Kawachi, H. (2007). "Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte." Kidney Int **72**(8): 954-964.

Himanen, J. P., Chumley, M. J., Lackmann, M., Li, C., Barton, W. A., Jeffrey, P. D., Vearing, C., Geleick, D., Feldheim, D. A., Boyd, A. W., Henkemeyer, M. und Nikolov, D. B. (2004). "Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling." Nat Neurosci **7**(5): 501-509.

Hirai, H., Maru, Y., Hagiwara, K., Nishida, J. und Takaku, F. (1987). "A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene." Science **238**(4834): 1717-1720.

Holzman, L. B., St John, P. L., Kovari, I. A., Verma, R., Holthofer, H. und Abrahamson, D. R. (1999). "Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell." Kidney Int **56**(4): 1481-1491.

Hudson, B. G., Reeders, S. T. und Tryggvason, K. (1993). "Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis." J Biol Chem **268**(35): 26033-26036.

Huttunen, N. P. (1976). "Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients." Arch Dis Child **51**(5): 344-348.

Inoue, T., Yaoita, E., Kurihara, H., Shimizu, F., Sakai, T., Kobayashi, T., Ohshiro, K., Kawachi, H., Okada, H., Suzuki, H., Kihara, I. und Yamamoto, T. (2001). "FAT is a component of glomerular slit diaphragms." Kidney Int **59**(3): 1003-1012.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S. und Tsukita, S. (1997). "Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments." J Cell Biol **138**(1): 181-192.

Janes, P. W., Adikari, S. und Lackmann, M. (2008). "Eph/ephrin signalling and function in oncogenesis: lessons from embryonic development." Curr Cancer Drug Targets **8**(6): 473-479.

Janes, P. W., Nievergall, E. und Lackmann, M. (2012). "Concepts and consequences of Eph receptor clustering." Semin Cell Dev Biol **23**(1): 43-50.

Jensen, F. C., Girardi, A. J., Gilden, R. V. und Koprowski, H. (1964). "Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus." Proc Natl Acad Sci U S A **52**: 53-59.

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

Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A. und Tryggvason, K. (1998). "Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome." Mol Cell **1**(4): 575-582.

Khoshnoodi, J., Sigmundsson, K., Ofverstedt, L. G., Skoglund, U., Obrink, B., Wartiovaara, J. und Tryggvason, K. (2003). "Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions." Am J Pathol **163**(6): 2337-2346.

Klein, R. (2012). "Eph/ephrin signalling during development." Development **139**(22): 4105-4109.

Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., LeHir, M. und Lemley, K. V. (2013). "The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement." Am J Physiol Renal Physiol **304**(4): F333-347.

Kullander, K. und Klein, R. (2002). "Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(7): 475-486.

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

Lal, M. A. und Tryggvason, K. (2012). "Knocking out podocyte rho GTPases: and the winner is." J Am Soc Nephrol **23**(7): 1128-1129.

Levey, A. S., Andreoli, S. P., DuBose, T., Provenzano, R. und Collins, A. J. (2007). "Chronic kidney disease: common, harmful, and treatable--World Kidney Day 2007." J Am Soc Nephrol **18**(2): 374-378.

Mosch, B., Reissenweber, B., Neuber, C. und Pietzsch, J. (2010). "Eph receptors and ephrin ligands: important players in angiogenesis and tumor angiogenesis." J Oncol **2010**: 135285.

New, L. A., Martin, C. E., Scott, R. P., Platt, M. J., Keyvani Chahi, A., Stringer, C. D., Lu, P., Samborska, B., Eremina, V., Takano, T., Simpson, J. A., Quaggin, S. E. und Jones, N. (2016). "Nephrin Tyrosine Phosphorylation Is Required to Stabilize and Restore Podocyte Foot Process Architecture." J Am Soc Nephrol **27**(8): 2422-2435.

Nitsch, D., Grams, M., Sang, Y., Black, C., Cirillo, M., Djurdjev, O., Iseki, K., Jassal, S. K., Kimm, H., Kronenberg, F., Oien, C. M., Levey, A. S., Levin, A., Woodward, M., Hemmelgarn, B. R. und Chronic Kidney Disease Prognosis, C. (2013). "Associations of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with mortality and renal failure by sex: a meta-analysis." BMJ **346**: f324.

Noren, N. K. und Pasquale, E. B. (2004). "Eph receptor-ephrin bidirectional signals that target Ras and Rho proteins." Cell Signal **16**(6): 655-666.

Ou, S. M., Chen, Y. T., Hung, S. C., Shih, C. J., Lin, C. H., Chiang, C. K., Tarng, D. C. und Taiwan Geriatric Kidney Disease Research, G. (2016). "Association of estimated glomerular filtration rate with all-cause and cardiovascular mortality: the role of malnutrition-inflammation-cachexia syndrome." J Cachexia Sarcopenia Muscle **7**(2): 144-151.

Pasquale, E. B. (2008). "Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease." Cell **133**(1): 38-52.

Pavenstadt, H. (1998). "The charge for going by foot: modifying the surface of podocytes." Exp Nephrol **6**(2): 98-103.

Potthoff, S. A., Sitek, B., Stegbauer, J., Schulenburg, T., Marcus, K., Quack, I., Rump, L. C., Meyer, H. E., Stuhler, K. und Vonend, O. (2008). "The glomerular proteome in a model of chronic kidney disease." Proteomics Clin Appl **2**(7-8): 1127-1139.

Putaala, H., Soininen, R., Kilpelainen, P., Wartiovaara, J. und Tryggvason, K. (2001). "The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death." Hum Mol Genet **10**(1): 1-8.

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

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

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

Schwarz, K., Simons, M., Reiser, J., Saleem, M. A., Faul, C., Kriz, W., Shaw, A. S., Holzman, L. B. und Mundel, P. (2001). "Podocin, a raft-associated component of the

glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin." J Clin Invest **108**(11): 1621-1629.

Shein, H. M. und Enders, J. F. (1962). "Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics." Proc Natl Acad Sci U S A **48**: 1164-1172.

Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M. und Kingsman, A. J. (1995). "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors." Nucleic Acids Res **23**(4): 628-633.

Triplett, J. W. und Feldheim, D. A. (2012). "Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps." Semin Cell Dev Biol **23**(1): 7-15.

Triplett, J. W., Pfeifferberger, C., Yamada, J., Stafford, B. K., Sweeney, N. T., Litke, A. M., Sher, A., Koulakov, A. A. und Feldheim, D. A. (2011). "Competition is a driving force in topographic mapping." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(47): 19060-19065.

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

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

Wan, Y. G., Sun, W., Zhang, J., Li, M., Ruan, J. G., Wang, Y. und Shmizu, F. (2007). "[Nephritic model induced by anti-Thy1.1 monoclonal antibody and its application to study on Chinese materia medica]." Zhongguo Zhong Yao Za Zhi **32**(6): 461-465.

Wang, L., Ellis, M. J., Gomez, J. A., Eisner, W., Fennell, W., Howell, D. N., Ruiz, P., Fields, T. A. und Spurney, R. F. (2012). "Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases." Kidney Int **81**(11): 1075-1085.

Wnuk, M., Hlushchuk, R., Janot, M., Tuffin, G., Martiny-Baron, G., Holzer, P., Imbach-Weese, P., Djonov, V. und Huynh-Do, U. (2012). "Podocyte EphB4 signaling helps recovery from glomerular injury." Kidney Int **81**(12): 1212-1225.

Zimmer, M., Palmer, A., Kohler, J. und Klein, R. (2003). "EphB-ephrinB bi-directional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion." Nat Cell Biol **5**(10): 869-878.

## Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Rump für die Möglichkeit, in seinem Institut forschen zu dürfen, danken. Zudem danke ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Lorenz Sellin, für die Konzeption meiner Arbeit und die Weitergabe seines Wissens an mich.

Einen außerordentlichen Dank möchte ich meiner Betreuerin, Fr. Dr. Eva Königshausen, aussprechen. Du, liebe Eva, hast mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Ich hätte mir keine bessere Betreuerin als Dich wünschen können.

Zudem danke ich dem gesamten Team der experimentellen Nephrologie. Herausstellen möchte ich hier Frau Blanka Duvnjak, Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt, die immer ein offenes Ohr bei auftretenden Schwierigkeiten hatten.

Ich danke meinem "Leidensgenossen", Herrn Dr. Christian Weigel, für eine schöne Doktorandenzeit und die gegenseitige Unterstützung, die uns das Leben deutlich erleichtert hat.

Meiner Mutter möchte ich dafür danken, dass sie mich zu dem Menschen gemacht hat, der ich heute bin. Vielen Dank für all Deine Liebe, Unterstützung und auch für dein Nerven, dass ich endlich mit dem Schreiben voran machen soll.

Zuletzt danke ich meiner wundervollen Ehefrau, Lea, dass sie mir immer den Rücken freihält und mir die nötige Ruhe für den finalen Schreibprozess ermöglicht hat. Ohne Deine Unterstützung wäre ich wohl nie fertig geworden. Ich liebe Dich.