

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

Der Einfluss von extrazellulärem *Nephrin* auf die Interaktion  
humaner Podozyten im *Live Cell Imaging*

Dissertation

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

vorgelegt von

Lukas Ludwig Peter Heimann

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Herr PD Dr. med. Bernd Bittersohl

Meinen Eltern gewidmet

## Zusammenfassung

Chronische Nierenerkrankungen sind ein bedeutsames Problem weltweiter Gesundheitssysteme (Currie and Delles, 2013, Zhang and Rothenbacher, 2008). Proteinurie ist ein Marker renaler Schädigung, der häufig schon eher messbar ist als eine konkrete Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (Currie and Delles, 2013). Die Proteinurie ist hierbei Ausdruck der Schädigung des glomerulären Filters, der dreischichtig aus fenestriertem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten, mit der zwischen ihnen ausgebildeten glomerulären Schlitzmembran, aufgebaut ist. Podozytäre Schädigung zeigt sich in vielen Erkrankungen der humanen Niere, unter anderem bei *Minimal Change* Glomerulonephritis, fokal segmentaler Glomerulosklerose und diabetischer Nephropathie (Asanuma, 2015). Der genaue Mechanismus der Positionierung der Podozyten sowie der sich zwischen ihren sekundären Fußfortsätzen ausbildenden glomerulären Schlitzmembran bleibt bislang unklar. Im Vorfeld konnte der Einfluss der *Eph-ephrin*-Interaktion auf die Positionierung von Tubuluszellen gezeigt werden (Pasquale, 2005, Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007). *Nephrin*, als Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran, konnte als Interaktionspartner von *ephrin-B1* identifiziert werden. *Eph-B2* ist dabei der mit dem *ephrin-B1*-Liganden interagierende Rezeptor (Hashimoto et al., 2007). Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Stimulation der podozytären Interaktion humaner Podozyten, die den *Eph-B2*-Rezeptor bzw. den *ephrin-B1*-Liganden exprimieren, durch die *Nephrin* Immunglobulinomänen Ig 1–2 und Ig 3–4 die zelluläre Adhäsion beeinflusst. Es zeigen sich ein späterer Beginn und längere Adhäsionen bei Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 im Vergleich zur Kontrolle. Die Stimulationen mit *Nephrin* Ig 1–2 und *Nephrin* Ig 3–4 führen zu einem späteren Ende der Adhäsionen und zu vermehrter Adhäsion zum Zeitpunkt 600 min. Es konnte kein signifikanter Einfluss auf die podozytäre Adhäsion durch Stimulation mit dem gesamten extrazellulären *Nephrin* gezeigt werden. Die Untersuchungen konnten keinen Einfluss von extrazellulärem *Nephrin* auf die *Eph*-Rezeptor vermittelte Repulsion humaner Podozyten zeigen. Die in dieser Untersuchung identifizierte Interaktionsstelle von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* steht im Widerspruch zu den von Fukusumi veröffentlichten Untersuchungen zur Interaktion von *Nephrin* und *ephrin-B1* (Fukusumi et al., 2018). Weitere Untersuchungen sollten die Interaktionsstelle überprüfen und spezifizieren, ob diese für *Eph-B2* und *ephrin-B1* gleich ist. Die Interaktion von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* scheint über eine Stabilisierung der Podozyten und der glomerulären Schlitzmembran für die Aufrechterhaltung einer korrekten Filterfunktion des Glomerulums von Bedeutung zu sein.

## Abstract

„Chronic kidney disease and its associated morbidity pose a worldwide health problem“ (Currie and Delles, 2013, Zhang and Rothenbacher, 2008). Proteinuria is a widely accepted marker of renal injury that is often detected earlier than a decline of the glomerular filtration rate (Currie and Delles, 2013). Proteinuria displays a dysfunction of the glomerular filter that consists of three layers, the fenestrated epithelium, the glomerular basement membrane and the podocytes, building the slit diaphragm inbetween them. Podocyte injury is present in nephropathies of different origin for example minimal change glomerulonephritis, focal segmental glomerulosclerosis and diabetic nephropathy (Asanuma, 2015). The exact mechanisms of podocyte and slit diaphragm alignment are yet not fully understood. The role of *Eph*-receptors in vascular and neuronal development has been established several years ago. Previous investigations have shown the expression of several *Eph*-receptors and their corresponding ligands in the human kidney and the impact of *Eph-ephrin*-interaction on tubule cell positioning (Pasquale, 2005, Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007). *Nephrin*, as the main character of the slit diaphragm interacts with the *ephrin-B1*-ligand (Hashimoto et al., 2007). *Eph-B2* is the corresponding receptor for *ephrin-B1* (Hashimoto et al., 2007). Our studies show that stimulating the interaction of human podocytes, expressing either *Eph-B2*-receptor or *ephrin-B1*-ligand, by extracellular *Nephrin* immunoglobulin domain Ig 1–2 and Ig 3–4 alters cellular adhesion. Stimulation with *Nephrin* Ig 1–2 increases the length and shows later start of adhesion of opposed cells compared to control. Stimulation with *Nephrin* Ig 1–2 and *Nephrin* Ig 3–4 show later end of adhesion and more adhesion 600 mins after starting *Live Cell Imaging*. No significant effect was found for stimulation with full extracellular *Nephrin* or other *Nephrin* Ig-*Truncations*. The studies did not show alteration of podocyte repulsion as a result of stimulation by extracellular *Nephrin*. The interaction site between *Nephrin* and *Eph-B2/ephrin-B1* identified within this study conflicts with results of interaction between *Nephrin* und *ephrin-B1* published by Fukusumi (Fukusumi et al., 2018). Further studies are needed to clarify the correct interaction site and specify whether it is identical for *Eph-B2* and *ephrin-B1* or not. The interaction between *Nephrin* and *Eph-B2* and *ephrin-B1* may be crucial for stabilization of podocytes and thereby of the slit diaphragm, which is essential for maintenance of correct filter function of the glomerulum.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
a.d.	Destilliertes Wasser
<i>ADAM</i>	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase</i>
ANA	Anti-Nephrin-Antikörper
aPKC	Atypische Protein Kinase C
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
c	Zenti
<i>CD2AP</i>	<i>CD2-associated protein</i>
<i>CDC42</i>	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<i>CFP</i>	<i>Cyan fluorescent protein</i>
<i>CIP</i>	<i>Alkaline Phosphatase Calf Intestinal</i>
<i>CKD</i>	<i>Chronic kidney disease</i> (Chronische Niereninsuffizienz)
<i>CNF</i>	<i>Congenital Nephrotic Syndrome, Finnish Type</i>
C-Terminus	Carboxy Terminus
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EGF</i>	<i>Epidermal Growth Factor</i>
<i>Eph</i>	<i>Erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma</i>
<i>Erk</i>	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
<i>FAT 1</i>	<i>FAT atypical cadherin 1</i>
FCS	Fetales Kälberserum
<i>FGFR</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>
FN	Fibronectin
<i>FP</i>	<i>Foot process</i> (Podozytärer Fußfortsatz)
<i>FP</i>	<i>Forward Primer</i>
<i>Fyn</i>	Tyrosinkinase der <i>Src</i> -Familie
g	Gramm
g	G-Zahl
<i>GAP</i>	<i>GTPase-activating protein</i>
GBM	Glomeruläre Basalmembran
<i>GEF</i>	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanin Tri Phosphat
h	Stunde
<i>HEBS</i>	<i>HEPES-buffered saline solution</i>
<i>HEK</i>	<i>Human Embryonic Kidney (Cells)</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

## Abkürzungsverzeichnis

---

<i>HRP</i>	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig A/G	Immunglobulin A/G
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
<i>LAMB2 Gen</i>	<i>Laminin Subunit Beta 2</i>
<i>LB</i>	<i>Lysogeny broth</i>
<i>LCI</i>	<i>Live Cell Imaging</i>
<i>LMA</i>	<i>Low melting agarose</i>
μ	Mikro
m	Milli
M	Mol/l
<i>mAB</i>	<i>Monoklonaler Antikörper</i>
min	Minuten
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Nano
n	Anzahl
<i>NCK</i>	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein</i>
<i>NEPH</i>	<i>Proteine der Immunglobulin-Superfamilie</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>NPHS1</i>	<i>Gen, das für Nephrin kodiert</i>
<i>NPHS2</i>	<i>Gen, das für Podocin kodiert</i>
N-Terminus	Amino Terminus
p	Pico
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDZ-Domäne	Proteindomäne, die mit anderen Proteinen interagieren kann
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Rac/Ras/Rho	Subfamilien der kleinen GTPasen
<i>RP</i>	<i>Reverse Primer</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
<i>SAM</i>	<i>Sterile-<math>\alpha</math>-motif</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH Domäne	Src-homology, Proteindomäne
<i>Src</i>	<i>Tyrosinkinase Src (cellular sarcoma)</i>
TMB	Transmembrandomäne
<i>TRPC6</i>	<i>Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6</i>
V	Volt
Y	Tyrosin
<i>YFP</i>	<i>Yellow fluorescent protein</i>
<i>ZO-1</i>	<i>Zonula occludens-1-protein</i>

## II Inhaltsverzeichnis

<b>III</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>IV</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Epidemiologie Proteinurischer Nierenerkrankungen .....	1
1.2	Anatomie und Funktion der Niere.....	1
1.3	Der glomeruläre Filter .....	2
1.4	Die glomeruläre Basalmembran .....	3
1.5	Die Podozyten .....	4
1.6	Das Podozytäre Zytoskelett .....	5
1.7	Die glomeruläre Schlitzmembran .....	7
1.8	<i>Nephrin</i> .....	8
1.9	<i>Podocin (NPHS2)</i> .....	11
1.10	<i>NEPH</i> .....	12
1.11	Die <i>Eph</i> -Rezeptoren .....	12
1.11.1	Aufbau der <i>Eph</i> -Rezeptoren.....	13
1.11.2	Aufbau der <i>ephrin</i> -Liganden.....	13
1.11.3	Funktion der <i>Eph</i> -Rezeptoren und <i>ephrin</i> -Liganden.....	14
1.11.4	Signaltransduktion von <i>Eph</i> -Rezeptoren.....	15
1.11.5	Intrazelluläre Signaltransduktion mittels <i>Rho</i> -GTPasen .....	16
1.11.6	Intrazelluläre Signaltransduktion mittels <i>Ras</i> -GTPasen.....	17
1.11.7	Cross Talk .....	17
1.11.8	<i>Eph</i> -Rezeptoren in der Niere.....	18
1.12	Ziele der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material.....	21
2.1.1	Chemikalien .....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3	Geräte.....	22
2.1.4	Software .....	22
2.1.5	Spezielle Materialien.....	23
2.2	Methoden .....	30
2.2.1	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	30
2.2.2	Aufreinigung der DNA mittels Phenol .....	31
2.2.3	Restriktionsenzymverdau .....	31
2.2.4	Ligation .....	31
2.2.5	Transformation.....	32
2.2.6	DNA Präparation mittels Maxiprep-Kit.....	33
2.2.7	Restriktionsenzymverdau zur Amplifizierungskontrolle .....	33
2.2.8	Subklonierung .....	34
2.2.9	PCR und Klonierung <i>Nephrin</i> Signalpeptid in den Vektor pcDNA3V5.....	34
2.2.10	PCR und Klonierung <i>Nephrin</i> Ig 1–2, 3–4, 5–6, 7–9.....	34
2.2.11	Zellkultur .....	35
2.2.12	Western Blot .....	41
2.2.13	<i>Live Cell Imaging</i> .....	43
2.2.14	Auswertung des <i>Live Cell Imagings</i> .....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>48</b>
3.1	Klonierung von rekombinantem <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> .....	48
3.1.1	Expression der <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> in <i>HEK-293T</i> Zellen.....	50
3.1.2	Expression von <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> in <i>COS-7</i> Zellen .....	51
3.2	Effekt von <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> auf die <i>Eph-B2-ephrin-B1</i> vermittelte Interaktion in Podozyten .....	53
3.2.1	Einfluss der Stimulation auf die Dauer der podozytären Adhäsion .....	56



3.2.2	Einfluss der Stimulation auf den Beginn der podozytären Adhäsion.....	57
3.2.3	Einfluss der Stimulation auf das Ende der podozytären Adhäsion .....	58
3.2.4	Einfluss der Stimulation auf die podozytäre Adhäsion zu definierten Zeitpunkten .....	59
3.2.5	Einfluss der Stimulation auf die podozytäre Repulsion .....	60
3.2.6	Einfluss der Stimulation auf das podozytäre Sliding .....	60
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
4.1	Einfluss von <i>Nephrin</i> auf die Adhäsion von Podozyten.....	63
4.2	Einfluss von <i>Nephrin</i> auf die Repulsion von Podozyten.....	66
4.3	Transendozytose von <i>Eph-B2</i> und <i>ephrin-B1</i> .....	68
4.4	Funktionelle Bedeutung der Interaktion der <i>Eph</i> -Rezeptoren mit <i>Nephrin</i> .....	69
4.5	Limitationen der Arbeit.....	73
4.6	Schlussfolgerung.....	74
<b>5</b>	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>91</b>

### III Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Elektronen-mikroskopisches Bild des glomerulären Filters .....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des podozytären Aktin-Zytoskeletts und interagierender Proteine .....	7
Abb. 3: Struktur von <i>Nephrin</i> und der glomerulären Schlitzmembran .....	11
Abb. 4: Funktioneller Aufbau von <i>Eph</i> -Rezeptor und <i>ephrin</i> -Liganden .....	14
Abb. 5: Schematische Darstellung von <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> .....	49
Abb. 6: PCR zur Amplifizierung der <i>Nephrin-Truncations</i> .....	50
Abb. 7: Ganzzelllysate aus <i>HEK-293T</i> Zellen .....	51
Abb. 8: Zellüberstand von <i>COS-7</i> Zellen.....	52
Abb. 9: <i>Live Cell Imaging</i> humaner Podozyten mit Stimulation der podozytären Interaktion .....	55
Abb. 10: Dauer der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im <i>Live Cell Imaging</i> .....	56
Abb. 11: Beginn der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im <i>Live Cell Imaging</i> .....	57
Abb. 12: Ende der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im <i>Live Cell Imaging</i> .....	58
Abb. 13: Adhäsion zum Zeitpunkt 600 min bei Stimulation der podozytären Interaktion im <i>Live Cell Imaging</i> .....	59
Abb. 14: Beginn und Ende der Repulsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im <i>Live Cell Imaging</i> .....	60
Abb. 15: Expression von extrazellulärem <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> Lysate .....	89
Abb. 16: Expression von extrazellulärem <i>Nephrin</i> und <i>Nephrin-Truncations</i> Zellüberstand.....	90

## IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien .....	22
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3: Geräte .....	22
Tabelle 4: Software .....	22
Tabelle 5: Enzyme und Puffer.....	23
Tabelle 6: Antibiotika für Bakterienkultur.....	23
Tabelle 7: Antibiotikastammlösungen .....	23
Tabelle 8: Flüssigmedien .....	24
Tabelle 9: Medien, Bakterien, Kits .....	24
Tabelle 10: Plasmide .....	24
Tabelle 11: Primer.....	25
Tabelle 12: Puffer und Lösungen.....	26
Tabelle 13: Zellkulturmedien .....	26
Tabelle 14: Zellen .....	27
Tabelle 15: Co-Immunopräzipitation.....	27
Tabelle 16: Transfektion Lipofectamin.....	28
Tabelle 17: Puffer & Lösungen Western Blot.....	29
Tabelle 18: Antikörper Western Blot.....	29
Tabelle 19: Marker für DNA und Proteine .....	29
Tabelle 20: Proteineluauation .....	29
Tabelle 21: Reaktionsschritte der Polymerasekettenreaktion .....	30
Tabelle 22: Klonierung <i>Nephrin-Truncations</i> .....	35
Tabelle 23: Stimulation humaner Podozyten, Konzentrationen und Volumina.....	45

## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie Proteinurischer Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen (*CKD*) sind eine bedeutsame Herausforderung weltweiter Gesundheitssysteme (Currie and Delles, 2013, Zhang and Rothenbacher, 2008). Bis zu 16% der erwachsenen Bevölkerung weltweit sind von *CKD* betroffen (Matsushita et al., 2010, Wen et al., 2008, Levey et al., 2007, Hallan et al., 2006, Coresh et al., 2007, Sarnak et al., 2003). Die Problematik chronischer Nierenerkrankungen liegt in ihrer asymptomatischen Natur, wodurch sie häufig erst in einem späten Stadium erkannt werden und damit frühzeitige Interventionsmöglichkeiten verstrichen sind (Zhang and Rothenbacher, 2008). Der renale Verlust von Albumin (Albuminurie) als erstes klinisches Zeichen einer Proteinurie ist ein Marker renaler Schädigung, der häufig schon früher messbar ist als eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Currie and Delles, 2013). Das Vorliegen einer Albuminurie ist der stärkste unabhängige Risikoprädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse und die damit verbundene Mortalität (Agrawal et al., 2009). Die Behandlung einer persistierenden Albuminurie hat sich zu einem therapeutischen Ziel der kardiovaskulären Risikoreduktion im klinischen Alltag entwickelt (Currie and Delles, 2013).

### 1.2 Anatomie und Funktion der Niere

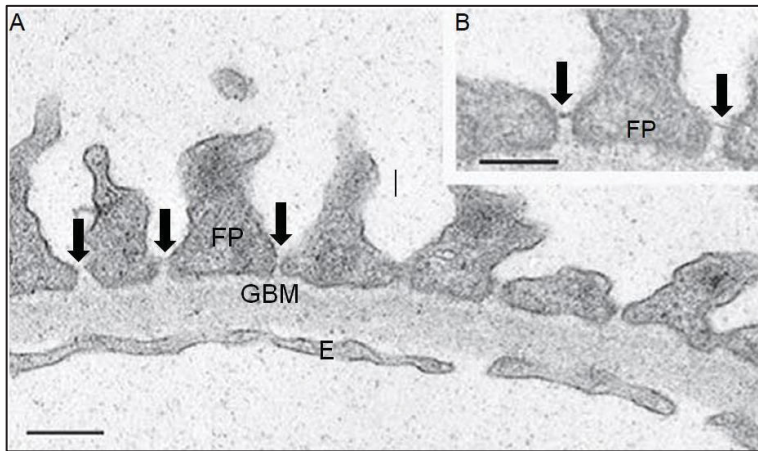
Die zentrale Aufgabe der Nieren ist die Regulation des Wasser-, Säure-Basen- und Salzhaushalts des menschlichen Körpers und die Ausscheidung harnpflichtiger Stoffwechselprodukte. Jede Niere besteht aus circa einer Million Nephronen, die die grundlegende funktionelle Baueinheit bilden. Ein Nephron besteht aus dem Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und dem dazugehörigen Tubulussystem (Tubulus renalis). Das Nierenkörperchen setzt sich aus einem Kapillarknäuel (Glomerulum) und der umgebenden Bowman-Kapsel zusammen (Aumüller, 2010). Jeden Tag produzieren die Nieren 180 Liter Primärharn, der aus abfiltrierter Plasmaflüssigkeit besteht. Im Tubulussystem werden aus dem Primärharn durch eine Vielzahl verschiedener Resorptions- und Sekretionsmechanismen circa zwei Liter Urin pro Tag gebildet (Schmidt, 2010).

### 1.3 Der glomeruläre Filter

Die Aufgabe des glomerulären Filters ist es, den Verlust von Plasmaproteinen über den Urin zu verhindern. Bei Schädigung des glomerulären Filters kommt es zum Verlust von Plasmaproteinen über den Urin (Proteinurie). Die Filtration von Plasmaflüssigkeit und gelösten Substanzen läuft in den renalen Glomeruli ab. Der glomeruläre Filter hält Plasmaproteine größen- und ladungsselektiv zurück, ermöglicht jedoch die Filtration kleiner gelöster Substanzen (z.B. Salze). Durch das Zurückhalten von Plasmaproteinen bleibt der onkotische Druck im Plasma konstant und es kommt nicht zu Flüssigkeitsverschiebungen im Körper (Arkill et al., 2014). Der glomeruläre Filter hat einen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus einem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den viszeralen Epithelzellen mit spezialisierten Fußfortsätzen, den Podozyten. Benachbarte Podozyten bilden zwischen ihren Zellkörpern die glomeruläre Schlitzmembran aus (Deen et al., 2001). Das fenestrierte Kapillarendothel hat 70–100 nm große Poren (Tryggvason et al., 2006). Ihm liegt eine aus Proteoglykanen, Glycosaminoglykanen und Plasmaproteinen bestehende Glykokalyx auf (Haraldsson and Sorensson, 2004). Der glomeruläre Filter differenziert den Transport gelöster Substanzen abhängig von Form, Größe und elektrischer Ladung. Negativ geladene Makromoleküle werden vom glomerulären Filter stärker zurückgehalten als neutrale Makromoleküle, wohingegen positiv geladene Makromoleküle vergleichbarer Größe in größeren Mengen filtriert werden. Dieser ladungsabhängige Unterschied ist auf die negative Ladung der Glykokalyx zurückzuführen (Rennke and Venkatachalam, 1977). Eine Schädigung der Glykokalyx führte im Mausmodell zum Verlust der Ladungsselektivität des glomerulären Filters (Jeansson and Haraldsson, 2006, Jeansson and Haraldsson, 2003).

Aufgrund der niedrigen Wasserpermeabilität von Zellmembranen folgt das glomeruläre Filtrat dem extrazellulären Weg. Dieser führt zuerst durch die Poren des fenestrierten Kapillarendothels, dann über die glomeruläre Basalmembran und zuletzt durch die glomeruläre Schlitzmembran. Im mathematischen Modell der hydraulischen Permeabilität des glomerulären Filters ergibt sich, dass der dominierende hydraulische Widerstand des glomerulären Filters durch die Schlitzmembran gebildet wird (Drumond and Deen, 1994). Durch Schädigung einer der drei beschriebenen Bestandteile des glomerulären

Filters wird dessen Integrität aufgehoben und es entsteht eine Proteinurie (Tryggvason et al., 2006, Braun et al., 2009, Haraldsson and Sorensson, 2004).



**Abb. 1: Elektronen-mikroskopisches Bild des glomerulären Filters**

Bildausschnitt A: Im Querschnitt eines humanen Glomerulums zeigen sich die glomeruläre Schlitzmembran (Pfeile), das fenestrierte Kapillarendothel (E), die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die podozytären Fußfortsätze (FPs), der Maßstab entspricht 250 nm. Bildausschnitt B: Die glomeruläre Schlitzmembran in stärkerer Vergrößerung, der Maßstab entspricht 150 nm (Modifiziert nach Lahdenkari et al., JASN, 2004) (Lahdenkari et al., 2004) nm: Nanometer

### 1.4 Die glomeruläre Basalmembran

Die glomeruläre Basalmembran befindet sich zwischen fenestriertem Kapillarendothel und Podozyten und ist vergleichbar mit einer Gel-Matrix (Robinson and Walton, 1989). Die beiden Hauptbestandteile der glomerulären Basalmembran bilden gewebsspezifische Isoformen von Laminin und Kollagen Typ IV. Die Laminin- und Kollagen Typ IV-Netzwerke sind über Nidogene und die Heperansulfat Proteoglykane Perlekan und Agrin miteinander verbunden (Lennon et al., 2014). Die Bedeutung von Kollagen Typ IV für die Struktur und Funktion der glomerulären Basalmembran zeigt sich anhand des autosomal rezessiven Alport Syndroms, der häufigsten Form hereditärer Glomerulonephropathien. Es manifestiert sich bereits in der Kindheit mit Proteinurie, Hämaturie und progressivem Verlust der glomerulären Filtration bis zum terminalen Nierenversagen. Dem hereditären Alport Syndrom liegen Mutationen des Typ IV Kollagen zugrunde (Mochizuki et al., 1994, Barker et al., 1990). Das hereditäre autosomal rezessive Pierson Syndrom mit einer Mutation im *LAMB2* Gen, welches für die Laminin beta-2 Kette kodiert, führt zu einem kongenitalen nephrotischen Syndrom (Zenker et al., 2004). Die Bedeutung von Heperansulfat Proteoglykanen, als größten Bestandteil der anionischen

Ladung der glomerulären Basalmembran für die Ladungsselektivität des glomerulären Filters, wird diskutiert (Borza, 2016).

### 1.5 Die Podozyten

Podozyten sind hochdifferenzierte viszerale Epithelzellen, die die äußerste Schicht der glomerulären Kapillare bilden. Die Podozyten haben einen großen Zellkörper im Harnraum und sind über ihre primären Fußfortsätze mit der darunter liegenden glomerulären Basalmembran verbunden (McGregor, 1929). Die Ergebnisse von Rodewald und Karnovsky zeigen, dass die interdigitierenden sekundären Fußfortsätze sich um die glomerulären Kapillaren wickeln und 40 nm große Schlitze zwischen benachbarten Fußfortsätzen lassen, die von der glomerulären Schlitzmembran überbrückt werden (Rodewald and Karnovsky, 1974). Die Dichte an Zellorganellen in Podozyten weist auf große anabole und katabole Aktivität hin. Über die metabolische Aktivität zur Aufrechterhaltung ihrer strukturellen und funktionellen Integrität hinaus produzieren Podozyten zusätzlich viele Komponenten der glomerulären Basalmembran (Pavenstadt et al., 2003). Die Oberfläche der podozytären Zellmembran in den sekundären Fußfortsätzen wird in drei unterschiedliche Kompartimente eingeteilt: die apikale Zellmembran oberhalb der podozytären Schlitzmembran, die laterale Zellmembran, an der die podozytäre Schlitzmembran ansetzt und die basale Zellmembran, die die Basis oder Sohle der Fußfortsätze umfasst (Kerjaschki, 2001).

Die basale Zellmembran ist über ein Netz aus verschiedenen Adhäsionsproteinen in der glomerulären Basalmembran verankert (Kerjaschki, 2001). Das Integrin  $\alpha3\beta1$  ist ein wichtiges Adhäsionsprotein und essentiell für die Reifung von Podozyten. Integrin  $\alpha3\beta1$  defiziente Mäuse bilden keine podozytären Fußfortsätze aus. Auf der zytoplasmatischen Seite bindet Integrin  $\alpha3\beta1$  an Paxillin, Talin und Vinculin, die eine Verbindung zum podozytären Aktin-Zytoskelett vermitteln (Kreidberg et al., 1996, Drenckhahn and Franke, 1988). Dystroglykane und Utrophin verbinden Lamine der glomerulären Basalmembran mit dem podozytären Aktin-Zytoskelett (Regele et al., 2000, Raats et al., 2000).

Die laterale Zellmembran verankert die podozytäre Schlitzmembran mit den Podozyten und trennt das basale und apikale Zellkompartiment (Arakawa, 1971, Rodewald and

Karnovsky, 1974, Jefferson et al., 2011). Die glomeruläre Schlitzmembran wird in den folgenden Abschnitten detailliert in ihrer Struktur und Funktion erläutert.

Die apikale Zellmembran wird von einer anionischen Glykokalyx bedeckt, wodurch eine zusätzliche Ladungsselektivität entsteht. Die Glykokalyx besteht hauptsächlich aus Sialoproteinen wie Podocalyxin und Proteoglykanen wie Podoendin (Kerjaschki et al., 1984, Huang and Langlois, 1985, Sawada et al., 1986). Der Verlust von Podocalyxin führt dazu, dass die podozytären Fußfortsätze und die podozytäre Schlitzmembran nicht normal ausgebildet werden können (Takeda et al., 2001).

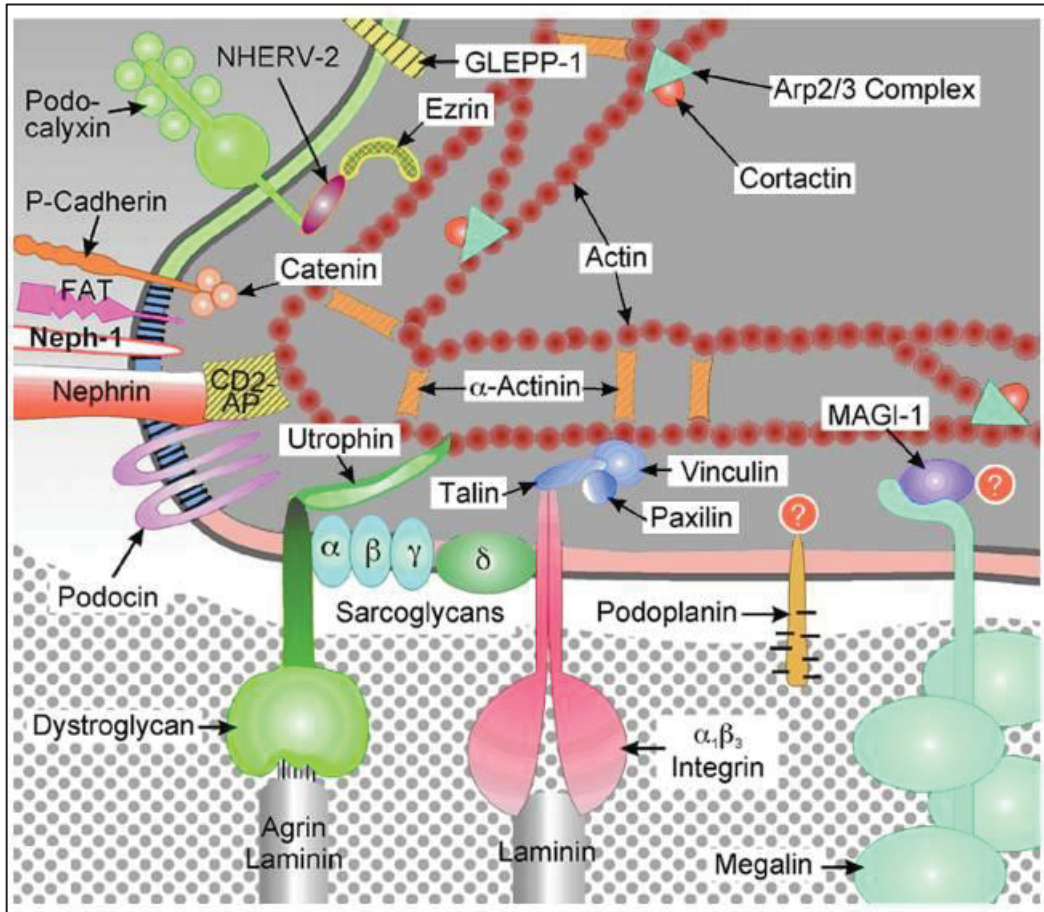
Bislang sind die Mechanismen einer korrekten Positionierung der Podozyten sowie der glomerulären Schlitzmembran noch unzureichend erforscht. Huber und Hartleben konnten zeigen, dass die atypische Protein Kinase C (aPKC) in sich entwickelnden Podozyten in der apikalen Membrandomäne exprimiert wird. Im Verlauf findet eine Translokation der aPKC von der apikalen hin zur basolateralen Membrandomäne statt, diese ist gefolgt von der Ausbildung der podozytären Fußfortsätze und der glomerulären Schlitzmembran. Podozyten-spezifischer *Knockout* der aPKC in Mäusen führt zu strukturellen Fehlbildungen der podozytären Fußfortsätze und zur Fehlanordnung der glomerulären Schlitzmembran mit nephrotischem Syndrom und früher Letalität (Hartleben et al., 2013, Huber et al., 2009). Der Mechanismus der korrekten Positionierung adulter Podozyten im Glomerulum konnte bislang nicht geklärt werden.

### 1.6 Das Podozytäre Zytoskelett

Um die Zell-Zellkontakte der glomerulären Schlitzmembran und die Zell-Matrixkontakte zur glomerulären Basalmembran ausbilden zu können, benötigen Podozyten ein Zytoskelett, welches einerseits Stabilität und andererseits dynamische Flexibilität gewährleistet (Pavenstadt et al., 2003, Faul et al., 2007). Das podozytäre Zytoskelett bildet im Zellkörper und in den primären Fußfortsätzen Mikrotubuli und Intermediärfilamente, wie Vimentin und Desmin, aus. Die komplexe Architektur der sekundären Fußfortsätze wird von streng parallel angeordneten kontraktiven Aktin-Filament-Bündeln und spezifischen Aktin-assoziierten Proteinen bestimmt (Drenckhahn and Franke, 1988, Andrews, 1981, Vasmant et al., 1984). Die Aktin-Filament-Bündel werden von bivalenten Molekülen wie  $\alpha$ -actinin und Dystrophin vernetzt (Faul et al., 2007,



Pavenstadt et al., 2003). Die drei Domänen der Podozyten sind physisch und funktionell mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Kerjaschki, 2001, Asanuma and Mundel, 2003). Störungen einer dieser podozytären Domänen aktiviert eine Reorganisation der Aktin-Filamente und führt zu einer morphologischen Abflachung und Verschmelzung von Fußfortsätzen, dem Fußfortsatz-*Effacement*, mit resultierender Proteinurie (Takeda et al., 2001, Kerjaschki, 2001). Die dynamische Polymerisation, De-polymerisation und Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts wird über eine Vielzahl von Adapter- und Effektorproteinen vermittelt und ermöglicht ein intaktes Zytoskelett bei gleichzeitiger Anpassung an äußere Einflüsse (Zigmond, 1996, Faul et al., 2007, Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003). Infolge podozytärer Schädigung kommt es zur Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, das sich morphologisch durch ein Fußfortsatz-*Effacement* zeigt. Eine normale Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran ist nicht mehr möglich und es kommt in der Folge zu einer Proteinurie (Kretzler et al., 1994, Pavenstadt et al., 2003, Ryan et al., 1975, Fries et al., 1989). Das *Effacement* ist ein fluider und potentiell reversibler Vorgang, der direkt mit der Entwicklung von Proteinurie, klinisch und im experimentellen Modell, korreliert (Tewari et al., 2015, Shirato, 2002).



**Abb. 2: Schematische Darstellung des podozytären Aktin-Zytosketts und interagierender Proteine**

Der latero-basale Anteil eines podozytären Fußfortsatzes mit basaler (rot), lateraler (blau) und apikaler (grün) Membrandomäne, Darstellung der Proteine, die von der glomerulären Basalmembran und von der Schlitzmembran aus mit dem Aktin-Zytoskelett interagieren. Grafik nach Kerjaschki, D. (Kerjaschki, 2001).

## 1.7 Die glomeruläre Schlitzmembran

Die glomeruläre Schlitzmembran wurde 1974 erstmalig von Rodewald und Karnovsky beschrieben als eine poröse, 30–45 nm breite reißverschlussähnliche Struktur zwischen den podozytären Fußfortsätzen, die 4–14 nm große Poren aufweist (Rodewald and Karnovsky, 1974). Die Autoren merkten an, dass diese Größe unterhalb der von Albumin liege. Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich bei der glomerulären Schlitzmembran um hochspezialisierte, interzelluläre Zellkontakte handelt. Zwischen gegenüberliegenden Fußfortsätzen entsteht ein dynamischer Multiproteinkomplex. Eine Vielzahl verschiedener Proteine sind als Signalmoleküle an der Organisation der Schlitzmembran beteiligt. Sie bilden ein intrazelluläres Signalnetzwerk aus, welches mit

dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist (Benzing, 2004, Huber and Benzing, 2005, Tryggvason et al., 2006). Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran ist dabei *Nephrin* (*NPHS1*), dessen extrazelluläre Anteile in der Mitte der Schlitzmembran homophil überlappen (Holzman et al., 1999, Ruotsalainen et al., 1999). Die bereits von Rodewald und Karnovsky beschriebenen Poren für die Filtration liegen im Spaltraum zwischen zwei benachbarten *Nephrin*-Molekülen des gleichen Podozyten (Ruotsalainen et al., 1999, Tryggvason, 1999, Holzman et al., 1999). Die Arbeit von Grahammer et al. zeichnet ein detaillierteres Bild der glomerulären Schlitzmembran. Die Daten zeigen, dass die Schlitzmembran hauptsächlich aus *Nephrin* und *NEPH1* im Verhältnis 1:2,5 besteht. *NEPH1* ist dabei weiter basolateral zur GBM hin exprimiert, wohingegen *Nephrin* weiter apikal zu finden ist. Die Ergebnisse zeigen, dass sich zwischen *NEPH1*-Molekülen die Schlitzmembran mit einer Breite von 25 nm ausbildet, zwischen *Nephrin*-Molekülen ist diese mit 40 nm breiter. Eine jeweils bestehende Varianz der Breite von 10 nm lässt Grahammer vermuten, dass *Nephrin* und *NEPH1* ihre Länge, einem Federmechanismus ähnlich, anpassen können. Dies könne ein Mechanismus zur Verhinderung des Verstopfens des Filters durch Proteine sein (Grahammer et al., 2017). Weitere Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran sind unter anderem *CD2AP*, Podocin (*NPHS2*), *NEPH2*, *NEPH3*, *FAT 1*, *ZO-1*, *NCK1-2*, *TRPC6* (Shih et al., 1999, Boute et al., 2000, Donoviel et al., 2001, Ciani et al., 2003, Itoh et al., 2014, Kurihara et al., 1995, Jones et al., 2006). Die Proteine der glomerulären Schlitzmembran regulieren die Zellpolarität, die Organisation des podozytären Zytoskeletts und das Überleben der Podozyten (Huber and Benzing, 2005). Bereits der Verlust einzelner Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran führt zur Schädigung der Integrität des glomerulären Filters (Donoviel et al., 2001, Kestila et al., 1998). Die Plasmamembran der Podozyten bildet „*lipid rafts*“ aus, die spezielle Signaldomänen darstellen. Die oligomerisierte Form von *Nephrin* ist mit den *lipid rafts* assoziiert (Simons et al., 2001). *Nephrin* und weitere wichtige Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran werden im nächsten Abschnitt genauer beschrieben.

### 1.8 *Nephrin*

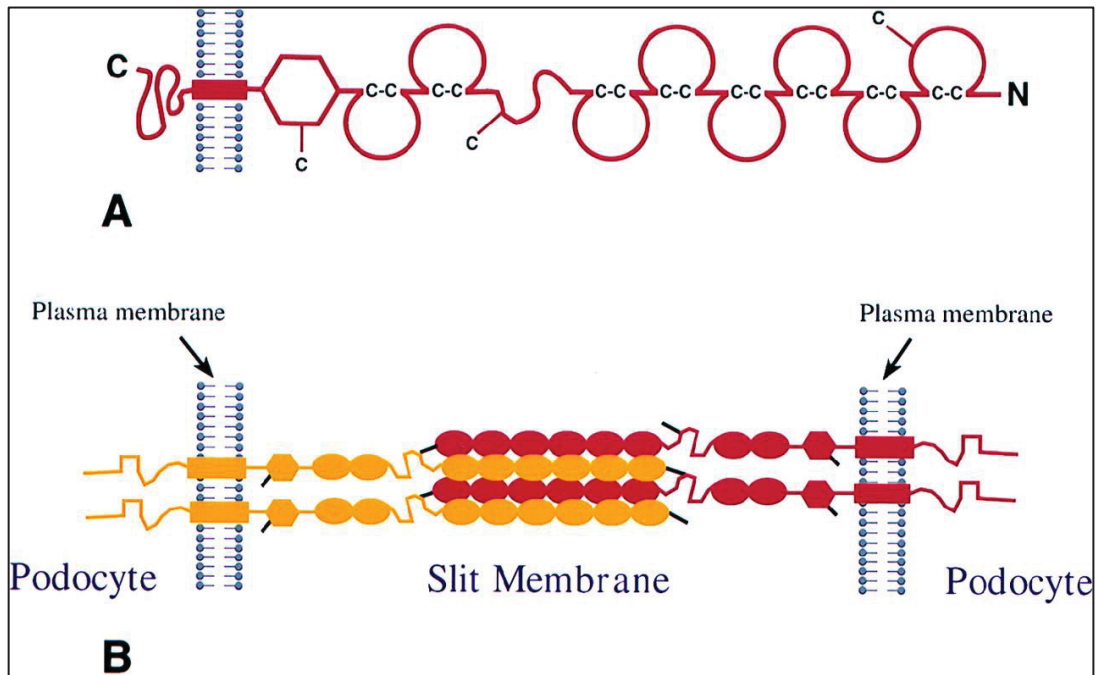
Das kongenitale Nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (*CNF*, *NPHS1*) wurde erstmals 1956 als Krankheitsbild bei Neugeborenen beschrieben (Ahvenainen et al.,

1956). Das Syndrom ist charakterisiert durch eine große Plazenta bei der Geburt, massive intrauterine Proteinurie, frühes Auftreten von Ödemen, komplette Steroid-Resistenz und in den meisten Fällen der Tod innerhalb der ersten zwei Lebensjahre (Hallman et al., 1973). Das autosomal rezessiv vererbte Syndrom hat in Finnland eine Inzidenz von 1:10.000 Geburten (Norio, 1966, Huttunen, 1976). Das hierfür verantwortliche defekte Gen konnte auf Chromosom 19q13.1 identifiziert werden (Kestila et al., 1998, Kestila et al., 1994, Mannikko et al., 1995). Das Genprodukt von *NPHS1*, *Nephrin*, ist ein Typ-I Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches spezifisch in der podozytären Schlitzmembran exprimiert wird (Kestila et al., 1998, Holzman et al., 1999). Mittlerweile konnte die Expression von *Nephrin* darüber hinaus auch in der humanen Beta-Zelle des Pankreas, in der humanen Plazenta sowie im ZNS von Nagetieren gezeigt werden (Palmen et al., 2001, Yun et al., 2015, Putaala et al., 2000, Putaala et al., 2001). Nierenbiopsien von Kindern mit *CNF* zeigten kein *Nephrin* und keine glomeruläre Schlitzmembran (Petrakka et al., 2000). Im Mausmodell für *CNF* durch *Knockout* des *Nephrin*-Gens (*NPHS1*) zeigt sich ein Fußfortsatz-Effacement und keine Ausbildung einer glomerulären Schlitzmembran (Putala et al., 2001). Die intravenöse Injektion von monoklonalem Anti-*Nephrin*-Antikörper bei Mäusen führt zu massiver Proteinurie (Topham et al., 1999). Die mRNA-Expression für *Nephrin* ist signifikant erniedrigt bei *Minimal-Change*-Glomerulonephritis (Furness et al., 1999). Die *Nephrin*-Expression zeigt sich in humanen Biopsien bei diabetischer Nephropathie reduziert. Doublie et al. gehen davon aus, dass glykiertes Albumin und Angiotensin II zur Herunterregulation der *Nephrin*-Expression beitragen (Doublie et al., 2003). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass *Nephrin* entscheidend für die Entwicklung der podozytären Schlitzmembran und für das Aufrechterhalten der selektiven Permeabilität des glomerulären Filters ist (Kerjaschki, 2001).

Das 185 kDa schwere *Nephrin* besteht aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne. Der N-terminale-extrazelluläre Anteil besteht aus sechs aufeinander folgenden Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer *Spacer*-Domäne, zwei weiteren Immunglobulin-ähnlichen Domänen und einer Fibronectin Typ III-Domäne. Jedes Immunglobulin-Motiv enthält zwei Cysteinreste, die Disulfidbrücken ausbilden und damit die globuläre oder ellipsoide Struktur der Immunglobulin-Motive formen. Die Immunglobulin-Motive sind vom C2-Typ, der charakteristisch für Proteine der Zell-Zell- oder Zell-

Matrix-Interaktion ist. Die Länge des extrazellulären Anteils von *Nephrin* beträgt ~35 nm (Tryggvason, 1999, Chothia and Jones, 1997). Der intrazelluläre Anteil von *Nephrin* enthält neun Tyrosine, die abhängig von ihrem Phosphorylierungszustand die Signaltransduktion durch Adapter- und Signalmoleküle vermitteln (Benzing, 2004). Der Tyrosinphosphorylierungszustand von *Nephrin* ist dabei über die Interaktion mit intrazellulären Adapterproteinen wie *NCK* entscheidend für die Ausbildung der podozytären Fußfortsätze und die Integrität der glomerulären Schlitzmembran (Jones et al., 2006, Jones et al., 2009, New et al., 2013). Die Tyrosinphosphorylierung an den spezifischen *NCK*-Bindungsstellen wird von der *Src*-Kinase *Fyn* vermittelt (Verma et al., 2006, Yu et al., 2001). Die Deletion von *Fyn* führt zur Verminderung der Tyrosinphosphorylierung von *Nephrin* und zur Vergrößerung der podozytären Fußfortsätze (Verma et al., 2003).

Die Transfektion von *HEK-293T* Zellen und murinen Podozyten mit *Nephrin*-cDNA führt zu deren Adhäsion. Die hierbei beobachteten homophilen Interaktionen zwischen extrazellulären Anteilen von *Nephrin* finden in *trans*-Position (die *Nephrin*-Anteile befinden sich nicht in derselben Zelle) statt. Die homophilen Interaktionen können mittels Antikörpern gegen den extrazellulären Anteil von *Nephrin* dissoziiert werden. Die Bindungsaffinität wird von der vorliegenden  $Ca^{2+}$ -Konzentration beeinflusst und nimmt mit steigender  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu (Khoshnoodi et al., 2003). *Nephrin* ist homolog zu Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulin-Superfamilie, denen Bedeutung bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen zugeschrieben wird. Über die Homodimerisation von *Nephrin* und *NEPH1* hinaus konnte ihre Kolokalisation in den interzellulären Verbindungen zwischen den podozytären Fußfortsätzen nachgewiesen werden. *Nephrin* und *NEPH1* bilden hierbei *cis*-Heterooligomere (*Nephrin* und *NEPH1* befinden sich in derselben Zelle) aus (Barletta et al., 2003, Gerke et al., 2003). Saleem konnte 2002 zeigen, dass *Nephrin* und Podocin mit Aktin-Filamenten besonders an deren Spitzen im Bereich der podozytären Fußfortsätze kolokalisieren und funktionsfähige Aktin-Polymere für ihre intrazelluläre Positionierung benötigen (Saleem et al., 2002a).



**Abb. 3: Struktur von *Nephrin* und der glomerulären Schlitzmembran**

A: Struktur des Proteins *Nephrin*: Von N-Terminus beginnend mit 6 IgG-Domänen, einer *Spacer*-Domäne, 2 IgG-Domänen, einer Fibronectin Typ III-Domäne, einer Transmembrandomäne, intrazellulärer C-Terminus mit 9 Tyrosinresten

B: Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran durch sich überlagernde *Nephrin*-Moleküle zwischen benachbarten Fußfortsätzen, Länge des extrazellulären Anteils von *Nephrin* ~35 nm. nach Ruotsalainen, V., et al. Copyright (1999) National Academy of Science, nm: Nanometer

### 1.9 *Podocin* (*NPHS2*)

Das Protein *Podocin* ist das 42 kDa große Genprodukt von *NPHS2*. Das *NPHS2*-Gen ist bei Patienten mit autosomal-rezessivem steroid-resistenten nephrotischen Syndrom mutiert, welches sich bereits in der frühen Kindheit mit massiver Proteinurie zeigt und rasch progredient zum terminalen Nierenversagen führt (Boute et al., 2000, Schwarz et al., 2001, Roselli et al., 2002). Das membranständige *Podocin* gehört zur *raft*-assoziierten Familie der Stomatin-Proteine und hat eine haarnadel-förmige Struktur. In den *lipid rafts* bildet *Podocin* Homooligomere aus und scheint als Gerüstprotein zu fungieren (Schwarz et al., 2001). *Podocin*-defiziente Mäuse entwickeln bereits pränatal eine Proteinurie und sterben innerhalb weniger Tage nach der Geburt (Roselli et al., 2004). Elektronenmikroskopisch zeigen sich eine Fusion der podozytären Fußfortsätze, das Fehlen der glomerulären Schlitzmembran und eine Herunterregulation der Expression von *Nephrin* (Roselli et al., 2004). Huber et al. konnten 2001 zeigen, dass *Podocin* mit dem intrazellulären Anteil von *Nephrin* interagiert und dass Veränderungen der *Nephrin-Podocin*-Interaktion zur Entstehung von Proteinurie beitragen (Huber et al.,

2001). *Podocin* ist eine Voraussetzung für die Rekrutierung von *Nephrin* in die *lipid rafts* (Huber et al., 2003). Die Mutationen des *NPHS2* an R138Q und R138X führen dazu, dass *Podocin Nephrin* nicht in die *lipid rafts* rekrutieren kann. Darüber hinaus interagiert *Podocin* intrazellulär mit *CD2AP* und ist mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert (Schwarz et al., 2001, Saleem et al., 2002a). Diese Ergebnisse zeigen, dass *Podocin* essentiell für die intakte Ausbildung und Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran ist.

### 1.10 *NEPH*

Donoviel konnte 2001 *NEPH1* als strukturverwandtes Protein zu *Nephrin* identifizieren (Donoviel et al., 2001). Sellin konnte zeigen, dass die Proteinfamilie *NEPH*, die Transmembranproteine *NEPH1*, *NEPH2* und *NEPH3* umfasst und alle drei in der humanen Niere und in humanen Podozyten exprimiert werden. Die *NEPH*-Proteine besitzen eine kurze C-Terminale intrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine N-Terminale extrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre Domäne von *NEPH* besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Motiven (Gerke et al., 2003, Sellin et al., 2003). *NEPH1* und *2* bilden jeweils eine extrazelluläre Homodimerisierung und eine Heterodimerisierung mit dem extrazellulären *Nephrin* aus (Gerke et al., 2003, Gerke et al., 2005). Zusätzlich besitzt *NEPH1* die Fähigkeit, wie *Nephrin* intrazellulär mit der C-terminalen Domäne von *Podocin* zu interagieren (Sellin et al., 2003). Nach dem Modell von Grahammer et al. bildet *NEPH1* die weiter basolateral gelegene und schmalere Schicht der Schlitzmembran aus (Grahammer et al., 2017). Der *Knockout* von *NEPH1* in Mäusen führt zu massiver Proteinurie und unterstreicht damit die Bedeutung der *NEPH*-Familie für die Funktion der glomerulären Schlitzmembran (Donoviel et al., 2001, Grahammer et al., 2017).

### 1.11 Die *Eph*-Rezeptoren

Die 1987 von Hirai erstmalig beschriebenen *Eph*-Rezeptoren sind nach der Zelllinie *Erythropoietin-producing human hepatocellular carcinoma* benannt, aus dessen cDNA sie transkribiert wurden (Hirai et al., 1987). Die *Eph*-Rezeptoren stellen die größte Gruppe in der Familie der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) dar. *Eph*-Rezeptoren binden bevorzugt ihre *ephrin*-Liganden. Das menschliche Genom codiert für neun *Eph-A-*

Rezeptoren, die wechselnd fünf *ephrin-A*-Liganden binden und fünf *Eph-B*-Rezeptoren, die wechselnd drei *ephrin-B*-Liganden binden. Darüber hinaus können einzelne *Eph-B*-Rezeptoren auch *ephrin-A*-Liganden binden und umgekehrt (Pasquale, 2010).

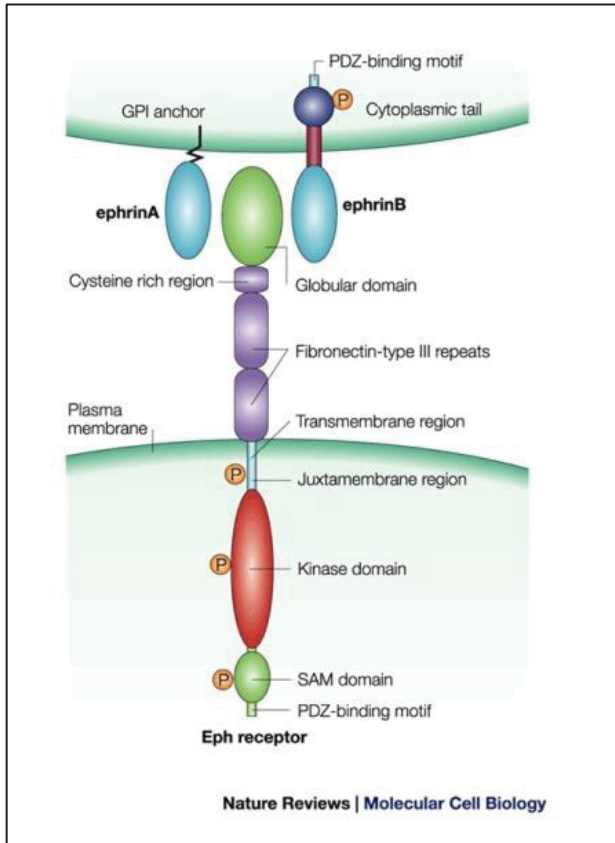
### 1.11.1 Aufbau der *Eph*-Rezeptoren

Die transmembranären *Eph*-Rezeptoren bestehen aus einem extra- und einem intrazellulären Anteil (Abb. 4). Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei Fibronectin Typ III-Domänen, einer Cystein-reichen Region und einer konservierten N-terminalen globulären Domäne. Die globuläre Domäne dient dabei als *ephrin*-Liganden-Bindungsdomäne in *trans*-Position. Die Cystein-reiche Region, die aus *EGF-like*-Motiven besteht, ermöglicht die Bildung von Clustern, die sich aus multiplen *Eph-ephrin* Komplexen zusammensetzen. Die Fibronectin Typ III-Domänen dienen der Bindung von ephrinen in *cis*-Position (Labrador et al., 1997, Himanen et al., 1998, Himanen et al., 2001, Himanen et al., 2007). Der intrazelluläre Anteil von *Eph*-Rezeptoren enthält eine Tyrosin-Kinase-Domäne, eine *SAM*-Domäne und ein *PDZ*-Bindungsmotiv. Die *SAM*-Domäne ist eine Protein-Interaktions-Domäne, die die Homodimerisation und Oligomerisation der Rezeptoren vermittelt. Das *PDZ*-Bindungsmotiv vermittelt die Organisation von Protein-Komplexen auf der Plasmamembran (Pasquale, 2008).

### 1.11.2 Aufbau der *ephrin*-Liganden

Beide Liganden-Gruppen besitzen eine *Eph*-Rezeptor-Bindungs-Domäne, die über ein Verbindungssegment (*linker segment*) mit der Zellmembran verbunden ist (Abb. 4). Die Länge des Verbindungssegments kann durch alternatives *Splicing* variiert werden. Die *ephrin-A*-Liganden werden von einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran fixiert, können aber auch zur Aktivierung eines *Eph-A*-Rezeptors auf Entfernung gelöst werden (Bartley et al., 1994, Wykosky et al., 2008). *Ephrin-B*-Liganden besitzen zusätzlich zur *Eph*-Rezeptor-Bindungs-Domäne eine Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne mit *PDZ*-Bindungsmotiv (Kullander and Klein, 2002).





**Abb. 4: Funktioneller Aufbau von *Eph*-Rezeptor und *ephrin*-Liganden**

Schematische Darstellung einer *Eph*-exprimierenden Zelle, die mit den beiden verschieden aufgebauten *ephrin*-Liganden der gegenüberliegenden Zelle interagiert. Der *Eph*-Rezeptor besitzt intrazellulär eine Tyrosin-Kinase-Domäne, eine *Sam*-Domäne (*SAM domain*) und ein *PDZ*-Bindungsmotiv (*PDZ-binding motif*). Der extrazelluläre Anteil besteht aus zwei Fibronectin Typ III-Domänen, einer Cystein-reichen Region und einer konservierten N-terminalen globulären Domäne. Der *ephrin-A*-Ligand ist mit einem GPI-Anker in der Plasmamembran befestigt. Der *ephrin-B*-Ligand besitzt einen intrazellulären Anteil mit *PDZ*-Bindungsmotiv. (nach Kullander and Klein, 2002) *SAM*: sterile alpha motif

### 1.11.3 Funktion der *Eph*-Rezeptoren und *ephrin*-Liganden

Die *Eph*-Rezeptoren haben diverse Funktionen, unter anderem einen weitreichenden Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett, Zell-Substrat-Adhäsion, interzelluläre Verbindungen, die Zell-Morphologie und Zell-Bewegungen (Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007, Pasquale, 2005). Die *Eph*-Rezeptoren regulieren das Zellverhalten während der Embryogenese und der Entwicklung (Batlle et al., 2002, Pasquale, 2008, Solanas and Batlle, 2011). Auch in allen adulten Organen werden *Eph*-Rezeptoren in organ-spezifischen Mustern exprimiert (Hafner et al., 2004). Die synaptische Plastizität im Hippocampus wird von *Eph*-Rezeptoren reguliert (Gao et al., 1998). Die Expression von *Eph*-Rezeptoren und *ephrin*-Liganden ist erhöht bei Verletzungen des Zentralen Nervensystems. Du et al. konnten zeigen, dass *Eph*-Rezeptoren am Wachstum von

Axonen, zellulärem *Remodelling* und Narbenbildung beteiligt sind (Du et al., 2007). *Eph*-Rezeptoren und ihre *ephrin*-Liganden sind im zentralen Nervensystem an der topographischen Anordnung von Axonen beteiligt. Durch Gradienten-abhängige Adhäsionen und Repulsionen vermitteln sie Axonen ein *Neural Guiding*. *Neural Guiding* bezeichnet den Prozess der topographischen Anordnung von neuronalen Zellen in der embryonalen Entwicklung (Triplett and Feldheim, 2012, Feldheim and O'Leary, 2010, Pasquale, 2008). *Eph*-Rezeptoren sind in allen wesentlichen Arten von Tumorzellen vorhanden und sind wichtig für Wachstum von Tumoren sowie deren Angiogenese (Ireton and Chen, 2005, Noren et al., 2004).

### 1.11.4 Signaltransduktion von *Eph*-Rezeptoren

Eine besondere Eigenschaft der *Eph*-Rezeptoren ist ihre bidirektionale Signaltransduktion. Bei Interaktion zwischen *Eph*-Rezeptor und *ephrin*-Ligand gegenüberliegender Zellen kommt es zur Signaltransduktion in beide Zellen (Vorwärts- und Rückwärtssignaltransduktion) (Pasquale, 2005). Interaktionen zwischen *Eph*-Rezeptor und *ephrin*-Liganden auf derselben Zelle (*cis*-Interaktion) führen zur Runterregulation der Signaltransduktion (*Silencing*) (Dudanova and Klein, 2011, Falivelli et al., 2013). Die Interaktion in *trans*-Position führt zur Oligomerisation von *Eph*-Rezeptor und *ephrin*-Ligand, sogenannten *Eph*-Rezeptor-Clustern (Himanen et al., 2010, Seiradake et al., 2010). Dabei werden auch nicht *ephrin*-gebundene *Eph*-Rezeptoren in die *Eph*-Rezeptor-Cluster eingeschlossen (Wimmer-Kleikamp et al., 2004). Die Cluster umfassen dabei sowohl *Eph-A*-Rezeptoren als auch *Eph-B*-Rezeptoren (Janes et al., 2011). Die Positionierung der *Eph*-Rezeptor-Cluster auf der äußeren Plasmamembran wird dabei vom Aktin-Zytoskelett gesteuert und hat großen Einfluss auf die Signaltransduktion der Rezeptoren (Salaita and Groves, 2010). Die Nähe der geclusterten *Eph*-Rezeptoren führt zu ihrer Auto-Phosphorylierung. Durch Autophosphorylierung an zwei Tyrosinen in der juxtamembranären Domäne werden die Kinase-Domäne aktiviert und Phosphotyrosin-Stellen zur Bindung von SH2-Domänen von Signalmolekülen freigegeben (Binns et al., 2000). Die intrazelluläre Signaltransduktion der *Eph*-Rezeptoren läuft über eine Vielzahl verschiedener Signalwege, hierzu gehören Mitglieder der Familien der *Rho*-GTPasen, der *Ras*-GTPasen und der *Akt*-Kinasen. Nach Bindung mit einem *Eph*-Rezeptor kommt es zur *ephrin-B*-Phosphorylierung durch *Src*-Kinasen (Cowan and

Henkemeyer, 2001, Palmer et al., 2002). Dies schafft Bindungsstellen für die SH2-Domänen von Signalproteinen. Hierüber sind die *ephrin-B*-Liganden an Entwicklungsprozessen des zentralen Nervensystems wie zum Beispiel *Axon Pruning*, Synapsen-Formierung und der Morphogenese von dendritischen Dornen beteiligt (Segura et al., 2007, Xu and Henkemeyer, 2009). *Axon Pruning* ist ein Prozess während der Entwicklung des ZNS, bei dem es zur Reorganisation von bereits bestehenden axonalen Verbindungen kommt (Nguyen and Lichtman, 1996).

### 1.11.5 Intrazelluläre Signaltransduktion mittels *Rho*-GTPasen

Aus der Familie der *Rho*-GTPasen sind *RhoA*, *Rac1* und *Cdc42* an der Signaltransduktion beteiligt (Pasquale, 2008, Pasquale, 2010). Über *RhoA* regulieren die *Eph*-Rezeptoren die Formation von Stressfasern und fokalen Adhäsionen und die Kontraktion des Aktomyosin-Zytoskeletts (Pasquale, 2010). *Rac1* und *Cdc42* vermitteln die Formation der protrusiven Strukturen wie Lamellopodien und Filopodien (Heasman and Ridley, 2008). Steht das Verhältnis von *RhoA*-Aktivierung zu *Rac1/Cdc42* zugunsten von *RhoA*, überwiegen repulsive Effekte und vermitteln Zell-Fortsatz-Rückzug und die Inhibition der Zell-Migration/-Invasion (Ogawa et al., 2006). Die bidirektionale Signaltransduktion bei *Eph-ephrin*-Interaktionen führt zur Transendozytose von Rezeptor und Ligand, die durch *Rac1* und *Cbl1* vermittelt wird. *Rac1* vermittelt dabei die Internalisierung des *Eph-ephrin*-Komplexes in beide Zellen. Die Endozytose-Komplexe enthalten vollständige Proteine, dies unterstreicht, dass eine Transendozytose stattgefunden hat (Zimmer et al., 2003, Marston et al., 2003, Pitulescu and Adams, 2010). Zimmer und Marston konnten darüber hinaus keine Kolokalisation von *Eph*-Rezeptor-Clustern mit typischen Markern der Endozytose wie Clathrin und Caveolin feststellen. Zimmer folgert daraus, dass die Transendozytose der *Eph-B2*-Rezeptoren der Phagozytose oder Makropinozytose ähnelt (Zimmer et al., 2003). Die Inhibition der *Eph-B2*-Endozytose führt zur Verzögerung der Zell-Repulsion (Zimmer et al., 2003). Die Konvertierung von Adhäsion in Zell-Repulsion kann auch durch die Aktivierung von Metalloproteasen aus der *ADAM*-Familie betrieben werden. Metalloproteasen prozessieren dabei *ephrin*-Liganden nach Bindung mit dem *Eph*-Rezeptor und vermitteln auf diesem Weg repulsives *Axon Guiding* (Georgakopoulos et al., 2006, Hattori et al., 2000, Yumoto et al., 2008). Ein weiterer Weg zur Internalisierung und Degradation der *Eph*-Rezeptoren wird

von der Ubiquitin Ligase *Cbl1* vermittelt (Walker-Daniels et al., 2002, Fasen et al., 2008).

### 1.11.6 Intrazelluläre Signaltransduktion mittels *Ras*-GTPasen

Über die *Ras*-GTPasen können *Eph*-Rezeptoren unter anderem die Aktivität des *Ras*-Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (*MAPK*)-Signalwegs regulieren. Über diesen Signalweg werden viele physiologische Prozesse reguliert. Dazu gehören: Zell-Proliferation, -Überleben, -Differenzierung, -Adhäsion und -Migration (McKay and Morrison, 2007, Bush and Soriano, 2010). *Eph*-Rezeptoren können die Aktivität von GTPasen mittels aktivierender *guanine nucleotide exchange factors* (*GEF*) und deaktivierender *GTPase-activating proteins* (*GAP*) regulieren. Dabei werden die *GEF* und *GAP* tyrosin-phosphoryliert, ubiquitiniert oder abgebaut (Pasquale, 2008, Pasquale, 2010). Die Signaltransduktion der *Eph*-Rezeptoren inhibiert in vielen Fällen auch die Aktivität des *Ras-Erk*-Signalwegs oder unterdrückt die Aktivierung durch andere Rezeptortyrosinkinasen. In Tumorzellen können *Eph-A*-Rezeptoren durch Inhibition des *Ras-Erk*-Signalwegs dessen tumorfördernde Wirkung unterdrücken (Miao et al., 2001, Macrae et al., 2005). Poliakov konnte 2008 zeigen, dass in stabil transduzierten *HEK-293T* Zellen der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (*FGFR*) ungebundene *Eph-B2*-Rezeptoren phosphorylieren und damit verhindern kann, dass *ephrin-B1* mit ihm interagieren kann. Dies führt zur Inhibition der sonst durch die *Ras-MAPK* vermittelte Trennung und Repulsion der Zellen (Poliakov et al., 2008).

### 1.11.7 Cross Talk

Über die für *Eph*-Rezeptoren charakteristische bidirektionale Signaltransduktion hinaus können *Eph*-Rezeptoren und ihre *ephrin*-Liganden unabhängig voneinander und/oder in Zusammenarbeit mit anderen Zellmembran-Kommunikations-Systemen in die Signaltransduktion eingreifen (Pasquale, 2008). Larsen konnte zeigen, dass der aktivierte *Epidermal Growth Factor Rezeptor* (*EGFR*) die Expression von *Eph-A2*-Rezeptoren in Tumorzelllinien induziert. Die Liganden-abhängige-Aktivierung von *Eph-A2* inhibiert die von *EGFR* induzierte Tumorzellen-Motilität (Larsen et al., 2007). Darüber hinaus interagieren *Eph*-Rezeptoren unter anderem mit *Wnt*-Rezeptoren, E-cadherin, Integrinen, Claudinen und NMDA-Rezeptoren (Arvanitis and Davy, 2008, Kida et al., 2007,

Schmitt et al., 2006, Clevers and Batlle, 2006, Wimmer-Kleikamp and Lackmann, 2005, Pasquale, 2005, Yamaguchi and Pasquale, 2004, Konstantinova et al., 2007, Litterst et al., 2007). Diese Ergebnisse unterstreichen, dass *Eph*-Rezeptoren mit ihrer Umgebung Informationen austauschen.

### 1.11.8 *Eph*-Rezeptoren in der Niere

Ogawa konnte 2006 zeigen, dass *Eph-B2* und *ephrin-B1* in medullären Tubuluszellen exprimiert werden (Ogawa et al., 2006). Die Interaktion von *Eph-B2* und *ephrin-B1* führt zur Tyrosinphosphorylierung von *Eph-B2*. *Ephrin-B1* stimuliert durch die Aktivierung von *RhoA* und Inaktivierung von *Rac1* die über fokale Adhäsionen vermittelte Zell-Retraktion. Die Interaktion von *Eph-B2* und *ephrin-B1* reguliert dabei die parazelluläre Permeabilität im Tubulus (Ogawa et al., 2006). Im humanen Glomerulum konnte die Expression des *Eph-B4*-Rezeptors und des *ephrin-B1*-Liganden gezeigt werden (Wnuk et al., 2012, Hashimoto et al., 2007). Der *Eph-B4*-Rezeptor scheint eine protektive Rolle im Mausmodell der mesangiolytischen Thy 1.1 Nephritis zu haben. Die Behandlung mit einem Inhibitor der *Eph-B4*-Phosphorylierung führte zur Ausbildung von glomerulären Aneurysmen, podozytärer Schädigung und zum Verlust von Podozyten (Wnuk et al., 2012). Hashimoto konnte 2007 zeigen, dass Immuno-Gold-Partikel für den *ephrin-B1*-Liganden hauptsächlich in der glomerulären Schlitzmembran lokalisiert sind und ein kontinuierliches Muster entlang der glomerulären Kapillarschlinge bilden. Mittels „*dual-labeling*“-Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass *ephrin-B1* mit zwei Bestandteilen der glomerulären Schlitzmembran, *Nephrin* und *CD2AP*, kolokalisiert. In Ratten führt die Behandlung mit einem Anti-*Nephrin*-Antikörper (ANA) zu einer ANA-Nephropathie, diese zeigte eine starke Reduktion der *ephrin-B*-Expression. Die RNA-Interferenz von *ephrin-B1* in kultivierten Podozyten führt zur Dislokation von *CD2AP*. Hashimoto sieht diese Ergebnisse als Hinweis darauf, dass *ephrin-B1* über die korrekte Positionierung des *CD2AP*-Adapters für die Erhaltung der glomerulären Schlitzmembran von Bedeutung ist. Die ähnliche Kinetik der mRNA-Expression von *ephrin-B1* und *Eph-B2* in der ANA-induzierten Nephropathie lässt Hashimoto vermuten, dass *Eph-B2* das Gegenstück zu *ephrin-B1* darstellt (Hashimoto et al., 2007). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte die Expression von *Eph-B1*, *Eph-B2* und *Eph-B3* in humanen Podozyten gezeigt werden (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation).

Poliakov konnte 2008 zeigen, dass es in stabil mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* transduzierten *HEK-293T*-Zellen nach Interaktion zur Repulsion der gegenüberliegenden Zellen kommt (Poliakov et al., 2008). Der podozytenspezifische *Knockout* von *ephrin-B1* in Mäusen führt zu einer veränderten Podozyten-Morphologie mit Fußfortsatz-*Effacement*, einer veränderten Positionierung von essentiellen Schlitzmembran-Proteinen (u.a. *Nephrin* und *NEPH1*) und einer Proteinurie (Fukusumi et al., 2018). Der genaue Mechanismus der Positionierung und Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran bleibt bislang unklar.

### 1.12 Ziele der Arbeit

Chronische Nierenerkrankungen sind ein bedeutsames Problem weltweiter Gesundheitssysteme (Currie and Delles, 2013). Der glomeruläre Filter hat einen dreischichtigen Aufbau, bestehend aus einem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den viszeralen Epithelzellen mit spezialisierten Fußfortsätzen, den Podozyten. Zwischen den sekundären Fußfortsätzen benachbarter Podozyten bildet sich die glomeruläre Schlitzmembran aus (Deen et al., 2001). Bei Schädigung des glomerulären Filters kommt es zum Verlust von Plasmaproteinen über den Urin (Proteinurie) (Arkill et al., 2014). *Nephrin* ist ein Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran (Kestila et al., 1998). Die im humanen Glomerulum exprimierten *Eph*-Rezeptoren haben diverse Funktionen, unter anderem einen weitreichenden Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett, Zell-Substrat-Adhäsion, interzelluläre Verbindungen, die Zell-Morphologie und Zell-Bewegungen (Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007, Pasquale, 2005). *Eph*-Rezeptoren haben in der Niere Einfluss auf die Morphologie von Podozyten und die Anordnung der Proteine, die die glomeruläre Schlitzmembran ausbilden (Fukusumi et al., 2018). Der genaue Mechanismus der Positionierung der Podozyten sowie der glomerulären Schlitzmembran bleibt bislang unklar. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-B2 – ephrin-B1* vermittelte Interaktion humaner Podozyten zu untersuchen.

Hieraus ergeben sich nachfolgenden Fragestellungen:

1. Hat rekombinantes extrazelluläres *Nephrin* Einfluss auf die Interaktion zwischen *Eph-B2-ephrin-B1*-exprimierenden Podozyten?
2. Haben die rekombinanten *Truncations* des extrazellulären *Nephrins* Einfluss auf die Interaktion zwischen *Eph-B2/ephrin-B1*-exprimierenden Podozyten?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
2-Propanol 99,8 %	VWR Int., Darmstadt (DE)
Agarose, low gelling temperature	Sigma, Steinheim (DE)
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe (DE)
<i>Albumin bovine serum protease free</i> (BSA)	VWR Int., Darmstadt (DE)
Ammoniumsulfat	Biomol, Hamburg (DE)
<i>Bromphenol Blue</i>	Sigma, Steinheim (DE)
Calciumchlorid Dihydrat p.A. ( $CaCl_2$ )	Merck, Darmstadt (DE)
<i>Complete Mini</i>	Roche, Mannheim (DE)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Di-Natriumphosphat-Heptahydrat ( $Na_2HPO_4$ )	Merck, Darmstadt (DE)
EDTA (Ethylenediamine-Tetraacetid-disodium salt dihydrat)	Sigma, Steinheim (DE)
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol 99,9 %	Merck, Darmstadt (DE)
Ethidium Bromid Lösung (250 ug/ml)	Roth, Karlsruhe (DE)
Fluka Luminol 09253	Sigma, Steinheim (DE)
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt (DE)
Glycerol	Sigma, Steinheim (DE)
Glycin, Blotting Grade	Roth, Karlsruhe (DE)
Glykogen	Roth, Karlsruhe (DE)
HEPES Puffersubstanz	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt (DE)
Kaliumhydrogenphosphat ( $KH_2PO_4$ )	Merck, Darmstadt (DE)
Methanol	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natriumacetat ( $C_2H_3NaO_2$ )	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid ( $NaCl$ )	AppliChem, Darmstadt (DE)
Natrium orthovanadate ( $Na_2VO_3$ )	Sigma, Steinheim (DE)
Nonidet-P40 substitute (NP-40)	US Biological, Salem (USA)
p-Coumaric acid C-9008	Sigma, Steinheim (DE)
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Steinheim (DE)
Phenol	Sigma, Steinheim (DE)
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe (DE)
Rotipuran®, Wasserstoffperoxid 30 %, p.a.	Roth, Karlsruhe (DE)
Sodium dodecyl Sulfat (SDS)	Biomol, Hamburg (DE)
Temed 99 % p.a.	Roth, Karlsruhe (DE)
Tris Puffran®, p.a.	Roth, Karlsruhe (DE)
Triton® X-100	Sigma, Steinheim (DE)



Trispuffer Hydrochlorid	Sigma, Steinheim (DE)
-------------------------	-----------------------

**Tabelle 1: Chemikalien**

ug: Mikrogramm, ml: Milliliter

**2.1.2 Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Hersteller
<i>Corning Incorporated 12 Well Cell Culture Plate</i>	Corning Incorporated, Corning (USA)
<i>Corning Incorporated Cell Culture Dish 100 mm x 20 mm Style</i>	
<i>Lab-Tek Chambered Coverglass w/cvr</i>	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
Nitrozellulosemembran	Protan Whatman, Dassel (DE)
<i>Nunc™ EasyFlask™, 25 cm<sup>2</sup></i>	Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
<i>Nunc™ EasyFlask™, 75 cm<sup>2</sup></i>	

**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

cm: Zentimeter, mm: Millimeter

**2.1.3 Geräte**

Gerätename	Hersteller
<i>Axiobserver Z1-Mikroskop</i>	Carl Zeiss, Oberkochen (DE)
<i>PTC-200 Peltier Thermal Cycler</i>	MJ Research, Waltham (USA)
<i>Julabo F25</i>	Julabo, Seelbach (DE)
<i>Tempcontrol 37-2 digital CO<sub>2</sub> Controller</i>	Visitron Systems, Puchheim (DE)

**Tabelle 3: Geräte**

**2.1.4 Software**

Programm	Aufgabe	Entwickler
<i>Visi View 2.0.4</i>	Videomikroskopie	Visitron Systems, Puchheim (DE)
<i>Incubation Remote Control 2.0.5</i>	Überwachung von Temperatur und CO <sub>2</sub>	PeCon GmbH, Erbach (DE)
<i>Julabo Easy Temp Professional 3.00</i>	Temperatursteuerung	Julabo, Seelbach (DE)
<i>ImageJ 1.50g</i>	Bildbearbeitung <i>Live Cell Imaging</i>	National Institute of Health (USA)
<i>AlphaView 3.3.1.0</i>	Bildverarbeitung	Proteinsimple, San Jose (USA)
<i>R Studio 1.0.143</i>	Statistik	RStudio Inc.

**Tabelle 4: Software**

## 2.1.5 Spezielle Materialien

### 2.1.5.1 Herstellung und Vervielfältigung rekombinanter DNA

Enzyme und Puffer	Hersteller
<i>Accu Prime™ Taq DNA Polymerase System</i>	Invitrogen, Darmstadt (DE)
<i>Accu Prime 10x PCR Buffer II</i>	
<i>Alkaline Phosphatase Calf Intestinal (CIP)</i> 10.000 U/ml	New England BioLabs, Frankfurt (DE)
<i>Buffer for T4 DNA Ligase with 10 mM ATP</i>	
<i>Purified BSA 100x (10 mg/ml)</i>	
<i>NE-Buffer 1-4, 10x Concentrate</i>	
<i>Restriktionsenzyme</i>	
<i>T4 DNA Ligase (400.000 U/ml)</i>	

**Tabelle 5: Enzyme und Puffer**

mg: Milligramm, ml: Milliliter, U: Units

Antibiotika für Bakterienkultur	Hersteller
Ampicillin Na-Salt, research grade	Serva Electrophoresis, Heidelberg (DE)
Kanamycin A Monosulfate	Sigma, Steinheim (DE)
Tetracyclin Hydrochloride Minimum 95 % (HLC)	

**Tabelle 6: Antibiotika für Bakterienkultur**

Antibiotikastammlösungen	Endkonzentration
Ampicillin Lösung	10 mg/ml in aqua dest
Kanamycin Lösung	0,5 mg/ml in aqua dest
Tetracyclin	1 mg/ml (0,1 g in 50 aqua dest + 50 ml Ethanol lösen)

**Tabelle 7: Antibiotikastammlösungen**

g: Gramm, mg: Milligramm, ml: Milliliter

Flüssigmedien	Endkonzentration
LB Medium	2 g LB Broth Base/100 ml pH 7
LB Medium + Ampicillin	2 g LB Broth Base/100 ml 100 µg/ml Ampicillin
LB Medium + Kanamycin	2 g LB Broth Base/100 ml

LB Medium + Tetracyclin	50 µg/ml Kanamycin 2 g LB Broth Base/100ml 25 µg/ml Ampicillin 7,5 µg/ml Tetracyclin
-------------------------	---

**Tabelle 8: Flüssigmedien**

g: Gramm, µg: Mikrogramm, ml: Milliliter

Medien, Bakterien, Kits	Hersteller
<i>LB Agar Luria Bertani Agar powder</i>	Sigma, Steinheim (DE)
<i>LB Broth Base (Lennox L Broth Base)</i>	
<i>One Shop®TOP10 Chemically Competent Cells</i>	Invitrogen, Darmstadt (DE)
<i>Ultracom MC1061 E.coli</i>	
<i>Ultracom MC1061 P3 E.coli</i>	
<i>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Venlo (NL)

**Tabelle 9: Medien, Bakterien, Kits**

Plasmid	Herkunft
CDM <i>glepp cey</i>	Prof. Dr. Sellin, Uniklinik Düsseldorf
CDM <i>Nephrin</i> Wildtyp	
CDM CD16.7	Prof. Dr. Walz, Uniklinik Freiburg
pcDNA3V5 [ <i>Podocin</i> ]	

**Tabelle 10: Plasmide**

PCR Produkt	Rückwärtsprimer	Sequenz	Vorwärtsprimer	Sequenz
<i>Nephrin cey</i>	ne_cegBAMNOT_RP	5'GCG	<i>Nephrin</i> MLU Hind FP1	5'CGC
		GGG GCC		GGG ACG
		GCC GCC		CGT AAG
		GGA TCC		CTT ATG
		AGC AGG		GCC CTG
		GGC AGC		GGG
<i>Nephrin</i> Signalpeptid	neSPRPbsunotnew	5'GCG	<i>Nephrin</i> MLU Hind FP1	5'CGC
		GGG GCG		GGG ACG
		GCC GCC		CGT AAG
		CCT AAG		CTT ATG
		GGC AGG		GCC CTG
		GCC CAG		GGG
<i>Nephrin</i> Ig1-2	neIg1-2bg2_RP	AAG CC 3'	<i>Nephrin</i> MLU	ACG3'
		5'GCG		5'CGC

		GGG AGA Hind FP1		GGG ACG
		TCT CCC		CGT AAG
		AAG ATA		CTT ATG
		ATA ATG		GCC CTG
		3'		GGG
				ACG3'
<i>Nephrin</i> Ig3-4	neIg3-4cegbamnot	5'GCG	neIg3-4	5'CGC
		GGG GCG mlubsu_FP		GGG ACG
		GCC GCC		CGT CCT
		GGA TCC		TAG GCG
		GTC ACG		GGA TCT
		TTA GTT		TGG GAT
		GG-3'		CTG CAT
				CC-3'
<i>Nephrin</i> Ig5-6	neIg5-6 cegBAM_NOT	5'GCG	neIg5-6	5'CGC
		GGG GCG bsuFPnew		GGG CCT
		GCC GCC		TAG GCG
		GGA TCC		GGT TTC
		TGG AGG		CCC CAA
		GCA CGA		CTA AC3'
		AT3'		
<i>Nephrin</i> Ig7-9	ne_cegBAMNOT_RP	5'GCG	neIg7-9	5'CGC
		GGG GCC bsuFPnew		GGG ACG
		GCC GCC		CGT CCT
		GGA TCC		TAG GCG
		AGC AGG		GGG CTC
		GGC AGC		CCA CCA
		CC3'		TCC GT3'

**Tabelle 11: Primer**

der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg (DE), Konzentration der Primer 100 pmol/μl  
 FP: forward primer, Ig: Immunglobulin, μl: Mikroliter, pmol: Picomol, RP: reverse primer

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

**Tabelle 12: Puffer und Lösungen**

g: Gramm, ml: Milliliter, M: Molar

### 2.1.5.2 Zellkultur

Zellkulturmedien	Hersteller
DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , L- Glutamin, very low endotoxin	Biochrom, Berlin (DE)
DMEM mit 1,0 g/l Glucose, 3,7 g/l NaHCO <sub>3</sub> , L- Glutamin, very low endotoxin	
FBS (Fetal Bovine Serum) Superior	
Trypsin/EDTA-Solution 0,05 % / 0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca <sup>++</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	
VLE RPMI 1640 Medium w 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> w stable glutamine very low endotoxin	
VLE RPMI 1640 Medium, w 2.0 g/l NaHCO <sub>3</sub> , w/o L-Glutamine, w/o Phenol red	InvivoGen Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA)
L-Glutamin 200 mM, low endotoxin	
Puromycin 18,37 mM	
Insulin-Transferrin-Selenium (100x)Gibco® (ITS)	

**Tabelle 13: Zellkulturmedien**

g: Gramm, l: Liter, mM: Millimolar

Zellen	Herkunft
<i>COS-7</i>	ATCC, Manassas (USA)
<i>HEK-293T</i> (human embryonic kidney cells)	ATCC, Manassas (USA)
Humane Podozyten	Prof. M.A. Saleem (Bristol, UK)
Humane Podozyten AB 8/13 II pQxCIP <i>ephrin-B1 CFP</i>	Dr. E. Königshausen, J. Hoffacker
Humane Podozyten AB 8/13 II pQxCIP <i>Eph-B2-YFP</i>	Dr. E. Königshausen, J. Hoffacker

Tabelle 14: Zellen

### 2.1.5.3 Co-Immunopräzipitation

Puffer	Endkonzentrationen
Lysis Puffer	20 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 1 mM EDTA 1 mM Natrium-ortho-vanadat ( $Na_3VO_4$ ) Complete Mini® (1 Tbl./50 ml) 4,4 µl/ml PMSF (10 mg/ml in 100 % Isopropanol)
2-fach HEPES-buffered saline solution (HEBS)	16,4 g/l NaCl 11,9 g/l HEPES acid 0,21 g/l $Na_2HPO_4$ pH 7,05 mit 5 M NaOH
2-fach Laemmli + DTT	100 mM Tris-HCl (pH 6,8) 69 mM SDS 1,09 M Glycerol 1,4 mM Bromphenol blau auf 500 ml mit A.d auffüllen 8,6 mM DTT
Calciumchlorid	0,25 M $CaCl_2$
PBS	pH 7,4 137 mM NaCl 2,65 mM KCl 4,29 mM $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$ (Heptahydrat) 1,47 mM $KH_2PO_4$
Protein G Sepharose - Glutathione Sepharose® 4B in 20 % Ethanol	Sigma Aldrich, Steinheim (DE)

Tabelle 15: Co-Immunopräzipitation

g: Gramm, mg: Milligramm, l: Liter, ml: Milliliter, µl: Mikroliter, M: Molar, mM: Millimolar

Reagenz	Hersteller
<i>Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DNK)
<i>Opti-MEM® I Reduced Serum Medium</i>	Thermo Fisher Scientific, Roskilde (DNK)

Tabelle 16: Transfektion Lipofectamin

#### 2.1.5.4 Western Blot und Entwicklung

Puffer und Lösungen	Endkonzentration
BSA	5 % Albumin bovine serum protease free in Proteinwaschpuffer
ECL Lösung A	H <sub>2</sub> O 100 mM Tris pH 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 mM Coumaric acid
ECL Lösung B	H <sub>2</sub> O 100 mM Tris pH 8,5 1,5 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Laufpuffer	191,8 mM Glycin 3,46 mM SDS 23,93 mM Tris Base
Proteinwaschpuffer	170 ml 1 M Tris HCL 340 ml 5 M NaCl 17 ml Tween 20
Sammelgelpuffer	(pH 6,9) 484 mM Tris HCl 16 mM Tris Base 14 mM SDS
Transferpuffer	383,6 mM Glycin 49,52 mM Tris Base 20 % Methanol
Lösung für ein Trenngel 10 %	1,5 ml Rotiphorese 0,75 ml Wasser 2,25 ml Trenngelpuffer 45 µl 10 % APS 7,5 µl Temed
Lösung für ein Sammelgel 10 %	267,5 ml Rotiphorese 567,75 ml Wasser 832,5 ml Sammelgelpuffer 20 µl 10 % APS 2,5 µl Temed
Trenngelpuffer	(pH 8,8) 360 mM Tris HCl

1140 mM Tris Base  
14 mM SDS

**Tabelle 17: Puffer & Lösungen Western Blot**  
mM: Millimolar, ml: Milliliter, µl: Mikroliter

Antikörper	Konzentration	Inkubation	Hersteller
EphB1(5F10) <i>Mouse mAB</i>	1 : 1000	4 °C ü.N.	Cell Signaling Technology, Danvers (USA)
<i>Anti-human IgG HRP, polyclonal produced in chicken</i>	1 : 500	4 °C ü.N.	Sigma, Steinheim (DE)
<i>Polyclonal-Anti-rabbit-Nephrin (H-300)</i>	1 : 500	4 °C ü.N.	Santa Cruz Technology, Dallas (USA)

**Tabelle 18: Antikörper Western Blot**  
ü.N.: über Nacht, °C: Grad Celsius

Marker	Hersteller
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range (11-190 kDa)</i> <i>100 bp DNA Ladder</i> <i>α-DNA- BstE II Digest</i>	New England BioLabs, Ipswich (USA)

**Tabelle 19: Marker für DNA und Proteine**  
bp: Basenpaar, kDa: Kilo Dalton

Puffer	Endkonzentrationen
PBS	pH 7,4 137 mM NaCl 2,65 mM KCl 4,29 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Heptahydrat) 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 % NP-40
Tris Base	2 M
Tris Base	pH 7,4 1M
Eluationspuffer	pH 2,5 50 mM Glycin
Econo-Column (Chromatographie Säule)	Bio Rad, München (DE)

**Tabelle 20: Proteineluotion**  
M: Molar, mM: Millimolar



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren der Molekularbiologie, um spezifische Sequenzen von DNA zu amplifizieren. Das Prinzip der Kettenreaktion (engl. *chain reaction*) bewirkt, dass mit jedem neuen Zyklus der Reaktion die Anzahl der Produkte exponentiell ansteigt. Für eine PCR werden DNA, 2 Primer, Puffer und *DNA Taq Polymerase* benötigt. Primer sind spezifische Nukleotidsequenzen, die sich an die DNA anlagern und der *DNA Taq Polymerase* als Ansatz- und Endpunkt dienen. Für jede PCR wurden 2 spezifische Primer verwendet. Ein Vorwärtsprimer markierte das 3'-OH-Ende und ein Rückwärtsprimer das jeweilige 5'-P-Ende der zu amplifizierenden Sequenz. Für eine PCR wurden 100 ng DNA, jeweils 0,5 µl von beiden Primern (Konzentration 100 pmol/µl), 1 µl *Accu Prime™ Taq DNA Polymerase*, 5 µl *Accu Prime 10x PCR Buffer II* in einem 200 µl PCR-Reaktionsgefäß angesetzt und mit HPLC a.d. auf 50 µl aufgefüllt. Der verwendete *Thermo Cycler* wurde entsprechend „Tabelle 21: Reaktionsschritte der Polymerasekettenreaktion“ programmiert.

Reihenfolge	Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	300 s
2	Denaturierung	95 °C	30 s
3	Annealing	58 °C	30 s
4	Elongation	68 °C	60 s / Kilo-Basenpaar
5	Zurück zu Schritt 2 14x		
6	Finales Verlängern	68 °C	120 s
7	Kühlen	4 °C	∞

**Tabelle 21: Reaktionsschritte der Polymerasekettenreaktion**

°C: Grad Celsius, s: Sekunden

5 µl des PCR-Produktes wurden auf 1 % Agarose Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen, um die Größe zu überprüfen. Zusätzlich wurden 10 µl der 100 bp *DNA Ladder* aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese (90 V, 20 – 30 min) wurde die Produktgröße ermittelt.

### 2.2.2 Aufreinigung der DNA mittels Phenol

Die Phenolextraktion diente der Aufreinigung der DNA. Es wurden Salze und Enzym-Reste entfernt. Dem PCR-Produkt wurden 50 µl Phenol hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wurde 5 min bei 20.817 g zentrifugiert. Es bildeten sich eine Phenol-Phase unten und das PCR-Produkt in einer Phase darüber. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein neues 500 µl Reaktionsgefäß gegeben. Zur Fällung der DNA wurden 5 µl 3 M Natriumacetat, 150 µl eiskaltes 100 % Isopropanol und 1 µl Glykogen hinzugegeben und gut durchmischt. Das Gemisch inkubierte 2 h bei -20 °C. Beim anschließenden Zentrifugieren (20.817 g / 15 min) wurde die DNA pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und im Anschluss wieder in a.d. aufgenommen.

### 2.2.3 Restriktionsenzymverdau

Um das *Insert* mit dem Vektor ligieren zu können, wurde es zunächst mit Restriktionsenzymen verdaut. Das *Insert* wurde mit jeweils 0,3 µl von 2 spezifischen Restriktionsenzymen (vgl. Tabelle 5: Enzyme und Puffer), 3 µl NE-Buffer 1–4 (ausgewählt nach Herstellerangaben) und 0,4 µl Purified BSA 100x über Nacht bei 37 °C verdaut. Der Ansatz wurde hierzu mit HPLC a.d. auf 30µl aufgefüllt.

### 2.2.4 Ligation

Der Vektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen wie das *Insert* verdaut. Hierzu wurde ein Ansatz aus 1,5 µg Plasmid-DNA, jeweils 1 µl von 2 spezifischen Restriktionsenzymen, 3 µl NE-Buffer 1–4 (ausgewählt nach Herstellerangaben) mit HPLC a.d. auf 30 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde 3 h bei 37 °C durchgeführt. Nach 2,5 h wurde 1 µl *Alkaline Phosphatase Calf Intestinal* (CIP) hinzugegeben, um eine Religation des Vektors zu verhindern.

Im nächsten Schritt wurden jeweils 15 µl *Insert* und Vektor auf 1,5 % *Low-Melting-Agarose* (LMA) aufgetragen. Bei max. 85 V lief die Elektrophorese ca. 30 min. Die Elektrophorese trennte die DNA-Fragmente nach Größe und Ladung auf. Kleinere Fragmente wandern schneller, größere Fragmente langsamer. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich Marker verwendet, die Vergleichsbanden lieferten. Unter UV-Licht

wurden im Anschluss die sichtbaren Banden nach Größenkontrolle durch die Marker (siehe Tabelle 15) herausgeschnitten und jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Die LMA wurde auf 70 °C erhitzt, um sie pipettierbar vorliegen zu haben.

Für die Ligation wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen eine Kontrolle und eine Ligation angesetzt. Im Kontrollgefäß befanden sich 2 µl LMA des Vektors, 0,4 µl T4 DNA Ligase, 5 µl Buffer for T4 DNA Ligase und 35 µl HPLC a.d. Der Ansatz wurde gut durchmischt und 21 µl in das Ligationsgefäß gegeben. Dem Ligationsgefäß wurde im Anschluss 4 µl LMA *Insert* hinzugegeben. Die beiden Reaktionsgefäße wurden für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

### 2.2.5 Transformation

Die Transformation ist ein Verfahren der Molekularbiologie, bei der freie rekombinante DNA in kompetente Bakterien nicht viral eingeschleust wird. Die kompetenten Bakterien wachsen und vermehren dabei die eingebrachte DNA. Diese trägt Antibiotikaresistenzen. Bei erfolgreicher Transformation ermöglicht es den Bakterien, auf antibiotika-beimpften Agarplatten zu wachsen (Griffiths AJF, 1999).

5 µl Ligation aus Vektor und *Insert* sowie der Kontrolle wurden in 50 µl Ultracom MC1061 E.coli oder Ultracom MC1061 P3 E.coli transformiert. Das Gemisch inkubierte 15 min auf Eis, im Anschluss 5 min bei 37 °C und noch einmal auf Eis bis zum Ausstreichen auf die antibiotika-beimpften Agarplatten.

Im nächsten Schritt wurde die transformierte Ligation auf die eine und die Kontrolle auf die andere Hälfte einer antibiotika-beimpften LB-Agarplatte ausgestrichen. Es wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Auswahl der Antibiotika richtete sich nach dem verwendeten Vektor (vgl. Tabelle 6). Die Transformation war erfolgreich, wenn zwei Bedingungen erfüllt waren:

1. Keine Kolonien sind auf der Kontrollseite gewachsen
2. Kolonien sind auf der Ligationsseite gewachsen

Einzelne gewachsene Kolonien wurden mit einer Filterspitze isoliert und Mini-Kulturen angelegt. In 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz (vgl. Tabelle 8)

wurde mindestens 8 h bei 37 °C und 220 U/min inkubiert. Durch Vermehrung der Bakterien trübte sich das Medium.

Im Anschluss wurden 300 µl der Bakterien-Kultur in 200 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz (vgl. Tabelle 8: Flüssigmedien) 8 h bei 37 °C und 220 U/min inkubiert.

### **2.2.6 DNA Präparation mittels Maxiprep-Kit**

Zur Präparation der in Bakterienzellen amplifizierte DNA wurde ein „QIAGEN-tip 500“ Maxiprep-Kit der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben verwendet. Im ersten Schritt wurden die Bakterienzellen bei 5346 g für 15 min (Zentrifugation hier immer bei 4 °C) pelletiert und dann in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Lysis Puffer wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 10 ml Puffer 3 zur Proteinfällung hinzugegeben, 15 min auf Eis inkubiert und für 1 h bei 5346 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die im Kit enthaltenen Säulen zur Aufreinigung der DNA wurden zunächst mit 10 ml QBT- Puffer equilibriert und dann mit dem DNA-Gemisch gefüllt. Es wurde zweimal mit 30 ml QC-Puffer die DNA aufgereinigt. Die DNA wurde durch Zugabe von 15 ml QF-Puffer aus der Säule gelöst. Nach Zugabe von 10,5 ml 100 % Isopropanol wurde kräftig geschüttelt und für 1 h bei 5346 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abdekantiert und das Pellet mit 5 ml 70 % Ethanol bei 5346 g für 1 h gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 200 µl a.d. aufgenommen.

### **2.2.7 Restriktionsenzymverdau zur Amplifizierungskontrolle**

Nach Abschluss der DNA-Präparation mittels Maxiprep-Kit wurde die erhaltene Plasmid-DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut, um die Größe der DNA-Fragmente zu kontrollieren. Hierzu wurde ein Ansatz aus 1,5 µg DNA, jeweils 1 µl von 2 spezifischen Restriktionsenzymen, 3 µl NE-Buffer 1–4 (ausgewählt nach Herstellerangaben) mit HPLC a.d. auf 30 µl aufgefüllt. Der Verdau wurde 1 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde eine Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel durchgeführt. Durch Hinzunahme eines Markers wurde die Größe der verdauten Plasmid-DNA kontrolliert.

### 2.2.8 Subklonierung

Die Subklonierung ist ein molekular biologisches Verfahren, um vorhandene DNA-Fragmente in einen anderen Vektor zu klonieren (Struhl, 2001). Hierzu werden Ursprungs- und Zielvektor mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut. Das DNA-Fragment wird im Anschluss mit dem Zielvektor ligiert. Die folgenden Schritte sind in Transformation 2.2.5 und DNA Präparation mittels Maxiprep-Kit in 2.2.6 beschrieben.

### 2.2.9 PCR und Klonierung *Nephrin* Signalpeptid in den Vektor pcDNA3V5

Zur Herstellung der 130 Basenpaare großen Signalpeptids wurde mit spezifischen *Primern* (vgl. Tabelle 11) mittels PCR aus dem Plasmid CDM *Nephrin* Wildtyp das Signalpeptid amplifiziert. Das erhaltene DNA-Fragment wurde mittels Phenolextraktion (vgl. 2.2.2) aufgereinigt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit den Enzymen MLU I und NOT I über Nacht verdaut. Im Anschluss wurde das Signalpeptid als Insert in den ebenfalls MLU I und NOT I verdauten Vektor pcDNA3V5 kloniert. Nach Abschluss der Ligation wurde das Plasmid transformiert und in Mini-Kultur gefolgt von Maxi-Kultur amplifiziert.

### 2.2.10 PCR und Klonierung *Nephrin* Ig 1–2, 3–4, 5–6, 7–9

Zur Herstellung der *Nephrin-Truncations* wurden mit spezifischen Primern (vgl. Tabelle 11) mittels PCR aus dem Plasmid CDM *Nephrin* Wildtyp die Immunglobulin-Anteile des extrazellulären *Nephrins* amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden mittels Phenolextraktion (vgl. 2.2.2) aufgereinigt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde mit den Enzymen Hind III und Bgl II über Nacht verdaut. Im Anschluss wurden die Fragmente als *Insert* in den BSU36 und NOT I (vgl. Tabelle 5: Enzyme und Puffer) verdauten Vektor pcDNA3V5 neSP kloniert. Nach Abschluss der Ligation wurden die Plasmide transformiert und in Mini-Kultur gefolgt von Maxi-Kultur amplifiziert. Im nächsten Schritt wurde das Fragment mit den Restriktionsenzymen Hind III/BamH I verdaut und in den Hind III/Bgl II verdauten Vektor CDM [glepp] c $\gamma$  subkloniert. Die Sequenz aller mittels PCR hergestellten Plasmide wurden durch „*double sequencing*“ qualitativ überprüft.

<i>Truncation</i>	<b>Größe (bp)</b>	<b>Klonierung Restriktionsenzym</b>	<b>Subklonierung Enzyme Vektor</b>	<b>Subklonierung Enzyme <i>Insert</i></b>
Ig 1–2	1041	Hind III/Bgl II	Hind III/Bgl II	Hind III/BamH I
Ig 3–4	615	Hind III/Bgl II	Hind III/Bgl II	Hind III/BamH I
Ig 5–6	612	Hind III/Bgl II	Hind III/Bgl II	Hind III/BamH I
Ig 7–9	975	Hind III/Bgl II	Hind III/Bgl II	Hind III/BamH I

**Tabelle 22: Klonierung *Nephrin-Truncations***

PCR zur Amplifizierung der Fragmente, Restriktionsenzymverdau und anschließende Klonierung in Vektor. bp: Basenpaar, Ig: Immunglobulin

## 2.2.11 Zellkultur

### 2.2.11.1 Humane Podozyten

#### Kultivierung humaner Podozyten

Für die Experimente wurden immortalisierte humane Podozyten vom Typ AB 8/13 II verwendet, die aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. A. Saleem (Bristol, UK) stammen. Die Podozyten waren bereits mit einem temperatur-sensitiven SV40-T Gen transfiziert. Die Zellen proliferierten bei einer Temperatur von 33 °C. Bei einer Temperatur von 37,5 °C gingen die Podozyten in den Zellzyklusarrest und differenzierten zu reifen Podozyten. Dabei exprimierten sie Marker von *in vivo* differenzierten Podozyten (Saleem et al., 2002b).

Die Podozyten wurden in Vorarbeiten stabil mit einem Fusionsprotein aus dem *Eph-B2*-Rezeptor und dem gelb fluoreszierenden Protein *YFP* bzw. aus dem Liganden *ephrin-B1* mit dem blau fluoreszierenden Protein *CFP* transduziert. Es wurden humane Podozyten AB8/13 II pQxCIP *ephrin B1 CFP* und humane Podozyten AB8/13 II pQxCIP *Eph B2 YFP* verwendet. Diese Zellen wurden von Julius Hoffacker aus dieser Arbeitsgruppe hergestellt und sind in dessen Dissertation beschrieben.

Für die Kultivierung der Podozyten wurden T25- und T75-Flaschen verwendet. Entsprechend der Zelldichte wurden die stabil transduzierten humanen Podozyten alle zwei bis drei Tage passagiert. Eine Zellzahl von 2600 pro  $\text{cm}^2$  wurde angestrebt.

Für die stabil transduzierten humanen Podozyten wurde VLE RPMI 1640 Medium (vgl. Tabelle 13: Zellkulturmedien) verwendet. Es wurden 10 % FBS und 1 % ITS dem Nährmedium hinzugefügt. Zur Selektion wurde dem Medium beim Passagieren Puro-mycin (0,92 mM) hinzugefügt.

### **Passagieren humaner Podozyten**

Das Nährmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Für die enzymatische Reaktion der Ablösung wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  mit Trypsin inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von mindestens der doppelten Menge Medium gestoppt (Herstellerangaben). Die Zell-Medium-Suspension wurde in ein Flacon überführt und für 5 min bei 269 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Die Zellen wurden in neue Flaschen pipettiert und geschwenkt, um eine optimale Verteilung zu gewährleisten. Bei 33 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  wurden die Podozyten im Zellkultur-Inkubator inkubiert.

### **Ausdifferenzierung humaner Podozyten**

Der hitze-sensitive *Promoter* ist bei einer Temperatur von 37,5 °C nicht mehr aktiv und die humanen Podozyten beginnen mit der Ausdifferenzierung. Für die Versuche wurden 11–14 Tage ausdifferenzierte Podozyten verwendet. In diesem Zustand exprimieren sie podozytenspezifische Marker (Saleem et al., 2002b). Zur Ausdifferenzierung wurde eine Zellzahl von 2600 Zellen pro  $\text{cm}^2$  angestrebt.

Das Aussäen der humanen Podozyten für die Ausdifferenzierung begann mit dem Absaugen des Mediums, Spülen mit PBS und Trypsinierung analog zum Procedere des Passagierens (vgl. Passagieren humaner Podozyten). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet resuspendiert. In einer Neubauerkammer wurde die Konzentration der Zell-Medium-Suspension manuell bestimmt. Anschließend

wurde die Suspension entsprechend verdünnt, um eine Konzentration von 25.000 Zellen/ $\mu\text{l}$  zu erhalten. Mit jeweils 1 ml Zellsuspension wurden die Wells einer 6-well-Platte befüllt. Es wurde zusätzliches Nährmedium hinzugeben. Auf die Zugabe von Puromycin zur Selektion wurde bei diesen stabil transduzierten Zellen verzichtet, um die Ausdifferenzierung nicht zu beeinflussen. Für die Ausdifferenzierung wurden die Zellen bei 37,5 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Das Nährmedium wurde alle 2 Tage gewechselt.

### 2.2.11.2 HEK-293T Zellen

#### Passagieren von Zellen

Die verwendeten *HEK-293T* Zellen wurden unter der Sterilbank alle 2 Tage passagiert. Für die Kultivierung wurde ein Nährmediengemisch bestehend aus 50 % DMEM mit 4,5 g/l Glucose und 50 % DMEM mit 1,0 g/l Glucose verwendet. Die Nährmedien wurden im Voraus jeweils mit 10 % FBS versetzt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese initial mikroskopisch beurteilt. Das Medium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS Dulbecco gespült. Das PBS wurde abgesaugt und 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Das Trypsin löste während der 5 minütigen Inkubation bei 37 °C die Zellen von der Schale. Nach Zugabe von 5–8 ml Nährmediengemisch (DMEM) wurde jeweils 1 ml in eine neue Corning-Schale gegeben. In diese Corning-Schale wurden zusätzlich 9 ml Nährmedium pipettiert.

Erfolgte das Passagieren für eine Transfektion, so wurde nur DMEM mit 1,0 g/l Glucose verwendet. Die Splittingrate wurde so gewählt, dass die Zellen für die Transfektion einzeln vorlagen.

#### Transfektion

Die Transfektion ist ein Verfahren der Zellbiologie, bei der Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht wird. Es wurde die gängige Calcium-Phosphat-Methode verwendet. Die Zellen wurden am Abend vorher für die Transfektion passagiert. Zunächst wurden 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Im nächsten Schritt wurde 500  $\mu\text{l}$  0,25 M Calciumchlorid addiert. Dem Gemisch wurden unter vortexen 500  $\mu\text{l}$  2-fach HEBS (vgl. Tabelle 15: Co-Immunopräzipitation) beigemischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach 6–8 h erfolgte



ein Medium-Wechsel. Hierzu wurde das Medium abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden erneut 10 ml DMEM Medium mit 1,0 g/l Glucose (vgl. Tabelle 13: Zellkulturmedien) dazugegeben.

### **Zellernte und Co-Immunopräzipitation**

Spätestens 24 h nach der Transfektion wurden die transient transfizierten *HEK-293T* Zellen geerntet. Zuerst wurde das Medium abgesaugt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit 5 ml 4 °C PBS von der Platte gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Es wurde 5 min bei 620 g und 4 °C zentrifugiert.

Die Co-Immunopräzipitation wurde im Anschluss an die Zellernte durchgeführt. Ziel dieses Versuchsaufbaus war es, Interaktionen der transfizierten Proteine zu detektieren.

Die Überstände wurden bis auf die Pellets abgesaugt. Die Pellets wurden größenabhängig mit 200 – 400 µl Lysis Puffer (vgl. Tabelle 15: Co-Immunopräzipitation) resuspendiert und dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 15 min bei 20.800 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß für die Co-Immunopräzipitation überführt. 10 % des Überstandes wurden für die Lysate verwendet und in neue, 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Im nächsten Schritt wurde den Lysaten die gleiche Menge 2-fach Laemmli + DTT hinzugefügt. Die Lysate wurden 5 min bei 95 °C gekocht.

Den Reaktionsgefäßen für die Co-Immunopräzipitation wurden jeweils 1 µl Antikörper (vgl. Tabelle 18: Antikörper Western Blot) hinzugefügt und dann bei 4 °C 60 min auf einem Überkopfschwenker inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß mit 30 µl Protein G Sepharose bei 4 °C 60 min auf einem Überkopfschwenker weiter inkubiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 960 g und 4 °C wurden die Proben 3 Mal mit je 800 µl Lysis-Puffer gewaschen. Zwischen jedem Waschvorgang wurde erneut 3 min bei 960 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschen wurde 1 min bei 17.950 g und 4 °C zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde abgenommen und dem Pellet 30 µl 2-fach Laemmli + DTT hinzugefügt. Analog zu den Lysaten wurden die Co-IP Proben im letzten Schritt auch 5 min bei 95 °C gekocht. Durch das Erhitzen auf

95 °C wurden die thermoinstabilen Wasserstoffbrückenbindungen gespalten, die an der Ausbildung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine beteiligt sind (Berg JM, 2002). Das zugesetzte Dithiothreitol (DTT) führte zur Reduktion der Sulfhydryl-Gruppen und verhinderte damit die Ausbildung von Disulfidbrücken in der Aminosäurekette (Cleland, 1964).

### **2.2.11.3 COS-7 Zellen**

#### **Passagieren von COS-7 Zellen**

Die verwendeten COS-7 Zellen wurden unter der Sterilbank alle 2 Tage passagiert. Für die Kultivierung wurde DMEM mit 4,5 g/l Glucose (vgl. Tabelle 13: Zellkulturmedien) als Nährmedium verwendet. Das Nährmedium wurde im Voraus mit 10 % FBS versetzt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese initial mikroskopisch beurteilt und danach das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml PBS Dulbecco gespült. Das PBS wurde abgesaugt und 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Das Trypsin löste während der 5-minütigen Inkubation bei 37 °C die Zellen von der Schale. Nach Zugabe von 5–8ml Nährmedium wurde jeweils 1 ml in eine neue Corning-Schale gegeben. In diese Corning-Schale wurde zudem 9 ml Nährmedium pipettiert.

Erfolgte das Passagieren für eine Transfektion, so wurden 12 ml Medium verwendet, da die Zellen im Anschluss 7 Tage ohne Mediumwechsel inkubierten. Die Splittingrate wurde so gewählt, dass die Zellen für die Transfektion einzeln vorlagen.

#### **Transfektion von COS-7 Zellen**

Zur Herstellung von rekombinantem Protein für das *Live Cell Imaging* mit humanen Podozyten wurden die COS-7 Zellen am Tag nach der Aussaat mittels der Lipofectamin-Methode transfiziert. Unter der Sterilbank wurde für jede ausgesäte Corning-Schale 5 µg entsprechende Plasmid-DNA in ein gemeinsames steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 50 µl Optimem-Medium pro Schale hinzugegeben. In einem weiteren sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 15 µl Lipofectamin und 50 µl Optimem-Medium pro Schale zusammengeführt. Nach 5-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die beiden Gemische in ein gemeinsames steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden

100  $\mu\text{l}$  des Transfektionsgemisches auf jede Schale gegeben. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert.

### **Proteinernte mittels Chromatographie-Säule**

Am 7. Tag nach der Transfektion wurde der Überstand der *COS-7* Zellen geerntet. Die Plasmid-DNA enthielt jeweils die Kodierung der Aminosäuresequenz für ein Signalpeptid, welches die Ausschleusung des Proteins aus der Zelle bewirkte (Coleman et al., 1985). Da das Protein keine Transmembrandomäne enthielt, wurde es in den Überstand der *COS-7* Zellen sezerniert. Initial wurden von jeder Schale 50  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen und mit 50  $\mu\text{l}$  2-fach Laemmli + DTT 5 min bei 95 °C gekocht. Der gesamte Überstand wurde abgenommen, in 50 ml Flacons gepoolt und 20 min bei 4 °C und 2500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 50 ml Flacons überführt. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  Protein-G-Sepharose zu 38 ml Überstand gegeben. Die verwendete Protein-G-Sepharose wurde im Voraus drei Mal mit PBS (vgl. Tabelle 20: Proteinelution) gewaschen. Die 50 ml Flacons wurden über Nacht bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert.

Es wurden 50  $\mu\text{l}$  Aliquotes von jedem 50 ml Flacon abgenommen und mit 50  $\mu\text{l}$  2-fach Laemmli + DTT 5 min bei 95 °C gekocht. Die 50 ml Flacons wurden 15 min bei 4 °C und 1100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet in a.d. aufgelöst und in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße gepooled. Die Protein-G-Säule wurde vorbereitet und mit 500  $\mu\text{l}$  Protein G befüllt. Die Säule wurde mit dem 10-fachen Waschpuffervolumen gewaschen. Das Protein-G-gebundene-rekombinante-Protein wurde in die Protein-G-Säule pipettiert, wodurch es ebenfalls zu einer Bindung mit dem in der Säule befindlichen Protein G kam. Hier wurde das Prinzip der Affinitätschromatographie genutzt, bei dem es zu einer Bindung zwischen stationärer Phase in der Säule (hier Protein G) und mobiler Phase (hier Protein-G-gebundenes-rekombinantes-Protein), die der Säule hinzugefügt wird, kommt (Porath et al., 1975). Zur Kontrolle der Säule wurde eine Probe des „Flow Throughs“ gewonnen. Zur Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurde die Chromatographie-Säule mit dem 10-fachen Waschpuffervolumen gewaschen. Für die Proteinelution wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 10  $\mu\text{l}$  2 M Tris-Base zur Neutralisation des pH-Wertes des Elutionsgemisches vorbereitet. Die Elution der re-

kombinanten Proteine von der Chromatographie-Säule in die vorbereiteten Reaktionsgefäße wurde mit 4 ml Elutionspuffer durchgeführt. Im Anschluss wurde die Proteinabsorption der Eluate im Photometer bestimmt. Die Reaktionsgefäße mit dem eluierten Protein wurden bei -80 °C gelagert. Das eluierte Protein wurde mittels *Western Blot* überprüft.

### **Dialyse von rekombinantem Protein**

Das eluierte rekombinante Protein wurde gegen das für das *Live Cell Imaging* verwendete Nährmedium (VLE RPMI 1640 Medium, w 2.0 g/l  $NaHCO_3$ , w/o L-Glutamine, w/o Phenol red) dialysiert. Hierdurch wurde gewährleistet, dass die nach der Stimulation beobachteten Effekte im *Live Cell Imaging* auf das rekombinante Protein zurückzuführen sind. Hierzu wurde das rekombinante Protein in eine Dialysemembran-Tasche gegeben und dann für 2 h bei 4 °C gegen 300 ml des Mediums dialysiert. Anschließend wurde das dialysierte rekombinante Protein in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zur Erreichung der für die Stimulation notwendigen Konzentration wurde das dialysierte rekombinante Protein verdünnt, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.12 Western Blot**

Der *Western Blot* ist ein biochemisches Verfahren, um spezifische Proteine eines Proteinkomplexes aus Zelllysaten zu identifizieren. Die drei wichtigen Elemente hierbei sind zunächst die Auftrennung der Proteine nach Größe und Ladung (Gelelektrophorese), gefolgt von der Übertragung der Proteine auf eine feste Membran (Blotting) und schließlich die Markierung der Zielproteine durch einen spezifischen Primär- und Visualisierung durch einen Sekundärantikörper (Mahmood and Yang, 2012).

### **Gelelektrophorese nach Laemmli**

Die von Laemmli 1970 erstmalig beschriebenen *SDS-Page* (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine Gelelektrophorese, bei der Proteine nach Größe aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Durch Anlegen einer Spannung wanderten die Proteine in Richtung der Anode. Ihre Wandergeschwindigkeit ist abhängig von der Größe und der Ladung. Für die Gelelektrophorese werden SDS-Page-Gele benötigt, die aus Sammelgel und Trenngel bestehen (vgl. Tabelle 17: Puffer & Lösungen Western

Blot). Beim Gießen der Gele wurde ein Kamm eingeschoben, der beim Aushärten Taschen für das Laden der Proben ließ. Nach Herausziehen des Kamms wurden die Gele in die entsprechende Halterung geklemmt und der Elektrophorese-Tank mit Laufpuffer gefüllt. Zur Größenkontrolle wurde der *Prestained Protein Marker* (vgl. Tabelle 19: Marker für DNA und Proteine) zusätzlich zu den Proben geladen. Die geladenen Volumina der Proben lagen zwischen 5  $\mu\text{l}$  und 20  $\mu\text{l}$ . Die Gelelektrophorese wurde bei 2 Gelen in der ersten Phase 30 min bei 70 V und in der zweiten Phase mit 40 mA für 1,5 h eingestellt.

### **Blotting**

Beim *Western Blotting* wurden die Proteine durch eine horizontal angelegte Spannung aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Blot lief bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für circa 1,5 h in einem Methanol-haltigen Transferpuffer (vgl. Tabelle 17: Puffer & Lösungen Western Blot). Nach Abschluss des Western Blots wurde die Membran für 1 h bei 37 °C oder bei 4 °C über Nacht mit 5 % Bovinem Serum Albumin (BSA) inkubiert, um die unspezifischen freien Antikörperbindungsstellen zu blockieren.

### **Antikörperbindung**

Zur Markierung der in der Membran vorliegenden Proteine wurden spezifische Antikörper verwendet, die sich selektiv an die gesuchten Proteine banden. Die jeweilige Verdünnung der Antikörper erfolgte in Waschpuffer. Die Inkubation wurde abhängig vom jeweiligen Antikörper entweder bei Raumtemperatur oder bei 4 °C für die vom Hersteller empfohlene Inkubationszeit durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer für 5 min auf dem Shaker gewaschen, um unspezifische Bindungen und freie Antikörperreste zu entfernen.

Um die Visualisierung der Komplexe aus Protein und gebundenem Antikörper zu ermöglichen, wurde ein zweiter Antikörper verwendet. Der Sekundärantikörper richtete sich hierbei gegen den  $F_c$ -Teil des Primärantikörpers. Bei der Auswahl des Sekundärantikörpers war die Art des Tieres zu beachten, von dem der Primärantikörper stammte (z.B. Maus). Die Sekundärantikörper waren mit dem Enzym *Horseradish-Peroxidase*

(HRP) konjugiert. Die HRP katalysierte die Reduktion von Peroxiden wie z.B. Wasserstoffperoxid. Bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid entstehen Wasser und 2 freie Protonen (Veitch, 2004).

Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte nach Herstellerangaben zumeist für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Shaker. Nach Inkubation wurde erneut dreimal mit Waschpuffer jeweils 5 min gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteine wurden die Membranen mit 2 ml ECL-Lösung benetzt. Die ECL-Lösung wurde aus ECL-Lösung-A und ECL-Lösung-B zu jeweils 50 % hergestellt. Die ECL-Lösung enthielt Wasserstoffperoxid, welches von der HRP reduziert wurde. Die freien Protonen führen dazu, dass Luminol angeregt wird. Luminol emittiert blaue Lichtquanten beim Rückfall in den Grundzustand. Im Imager werden diese Quanten von einer Fotokamera detektiert (Kricka, 1991). Die Aufnahme-Zeit der Kamera richtete sich nach der zu erwartenden Stärke der Chemolumineszenz.

### **2.2.13 *Live Cell Imaging***

Die Fluoreszenz-Mikroskopie lebender Zellen ist ein wesentlicher Bestandteil der modernen Zellbiologie geworden. Durch die Markierung von „proteins of interest“ erlaubt sie es nahezu jeden zellulären Prozess unter dem Mikroskop zu erforschen (Ettinger and Wittmann, 2014).

Für die Experimente wurden die Interaktionen zwischen verschiedenen stabil transduzierten humanen Podozyten im *Live Cell Imaging* ausgewertet. Die von Julius Hoffacker in Vorarbeiten stabil transduzierten humanen Podozyten wurden nach der Ausdifferenzierung in Co-Kulturen gebracht.

Die Medien wurden bei beiden Zellreihen abgesaugt und mit PBS gespült. Nach Trypsinierung wurde die Reaktion gestoppt und zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in Nährmedium resuspendiert und dann im Verhältnis 1:1 vermischt. Die Zellen wurden in eine Chamber-Slide mit 2 Kammern ausgesät und für 24 h bei 37,5 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In einer Kammer wurden 25.000 und in der anderen Kammer wurden 50.000 Zellen ausgesät.

Das Medium wurde nach 24 h abgenommen und durch 1 ml Nährmedium zum Mikroskopieren (VLE RPMI 1640 Medium, w 2.0 g/l  $NaHCO_3$ , w/o L-Glutamine, w/o Phenol red mit 2 mM L-Glutamin und 1 % ITS, vgl. Tabelle 13: Zellkulturmedien) ersetzt.

Die Interaktion der stabil transduzierten humanen Podozyten wurde unter einem Axioobserver Z1-Mikroskop von Zeiss für 12 h beobachtet. Die Temperatur wurde mit einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler bei 37 °C und die  $CO_2$ -Konzentration bei 5 % gehalten. Die Kontrolleinheiten Tempcontrol 37-2 digital und  $CO_2$  Controller übertragen permanent Temperatur und  $CO_2$  an den Computer und wurden dort mit der Software Incubation Remote Control von PeCon dokumentiert.

Es wurde manuell in 20-facher Vergrößerung eine Stelle gesucht, an der eine Interaktion zwischen mit *Eph-B2-YFP* und *ephrin-B1-CFP* stabil transduzierten humanen Podozyten zu erwarten war. Der Ausschnitt wurde vom Mikroskop in die Mikroskopier-Software VisiView von Visitron übertragen. In diesem Ausschnitt wurden 73 Aufnahmen im zeitlichen Abstand von jeweils 10 min gemacht. Der Versuchsaufbau sah vor, dass zu jedem Zeitpunkt eine Brightfield-Aufnahme mit einer Belichtungszeit von 2000 ms und jeweils eine Aufnahme mit blauer und gelber Fluoreszenz-Lampe mit einer Belichtungszeit von jeweils 3000 ms ausgelöst wurden.

Nach einer Stunde wurden die stabil transduzierten humanen Podozyten mit dialysiertem rekombinantem Protein stimuliert. Die Konzentration der Proteine wurde äquivalent zu ihrem Molekulargewicht berechnet.

<b>Rekombinantes Protein</b>	<b>Konzentration in ng/ml</b>	<b>Volumen in <math>\mu</math>l</b>
<i>Nephrin c<math>\epsilon</math><math>\gamma</math></i>	10	16,1
<i>Nephrin Ig 1–2 c<math>\epsilon</math><math>\gamma</math></i>	4	70,5
<i>Nephrin Ig3–4 c<math>\epsilon</math><math>\gamma</math></i>	4	13,2
<i>Nephrin Ig5–6 c<math>\epsilon</math><math>\gamma</math></i>	4	6,25
<i>Nephrin Ig7–9 c<math>\epsilon</math><math>\gamma</math></i>	5	17,4

CD16.7 cεγ	5	50
------------	---	----

**Tabelle 23: Stimulation humaner Podozyten, Konzentrationen und Volumina**

Ig: Immunglobulin, ng: Nanogramm, ml: Milliliter, µl: Mikroliter

Die entstandenen 73 Bilder wurden jeweils in einem Stack gespeichert und im Anschluss mit dem Programm *ImageJ* gefärbt und zu einem *Overlay* gebracht. Aus dem *Overlay*-Stack wurde eine *Avi-Movie*-Datei als *Time Lapse* Video mit einer Bildrate von *12 frames per second* erstellt, die dann die Bewegungen und Interaktionen der stabil transduzierten humanen Podozyten innerhalb der 12 h zeigte.

### 2.2.14 Auswertung des *Live Cell Imagings*

Die Interaktionen der Zellen wurden standardisiert und randomisiert ausgewertet.

1. Die Zellen wurden nach *Eph-B2*-Rezeptor (gelb) und *ephrin-B1*-Ligand (blau) aufgeteilt und jeweils durchnummeriert.
2. Interaktionen, die bereits bei Start des *Live Cell Imagings* bestanden, wurden nicht ausgewertet.
3. Mögliche Interaktionen wurden definiert als:

**Adhäsion:** Die Adhäsion ist charakterisiert durch die Berührung zweier gegenüberliegender Zellen bestehend aus einem Rezeptor-Liganden-Paar. Hierbei ist der Austausch von Vesikeln zwischen den Zellen sichtbar.

**Repulsion:** Es ist ein Impuls der Abstoßung zwischen einem zuvor in Adhäsion stehenden Rezeptor-Liganden-Paar sichtbar. Im Anschluss ist keine Berührung der Zellen mehr identifizierbar.

**Sliding:** Das Sliding ist charakterisiert durch eine aneinander entlang driftende Bewegung eines Rezeptor-Liganden-Paars.

**Tod *YFP*:** Der Tod *YFP* ist charakterisiert durch das im Video erkennbare Platzen eines humanen Podozyten, der den *Eph-B2* Rezeptor (gelb) exprimiert.



Tod *CFP*: Der Tod *CFP* ist charakterisiert durch das im Video erkennbare Platzen eines humanen Podozyten, der den *ephrin*-B1-Liganden (blau) exprimiert.

4. Interaktionen wurden im zeitlichen Abstand von 60 min für 12 Zeitpunkte ausgewertet. Der erste ausgewertete Zeitpunkt wurde nach 60 min festgesetzt.
5. Die Ergebnisse wurden zeitlich geordnet in tabellarischer Form protokolliert und statistisch ausgewertet. Hierbei wurden der Beginn, die Länge und das Ende der Interaktionen analysiert.

Die Daten zu Beginn, Dauer und Ende einer Adhäsion sowie zum Zeitpunkt von Repulsion und Sliding zwischen den *Nephrin-Truncations* und der Kontrolle wurden mittels eines *Mann-Whitney-U-Tests* statistisch geprüft. Der *Mann-Whitney-U-Test* ist ein Rangsummentest und dient zum Vergleich der Mediane von zwei unverbundenen Stichproben. Die Stichprobenumfänge ( $n$ ) müssen hierbei nicht identisch sein und eine Normalverteilung ist nicht notwendig (Mann and Whitney, 1947). Die Durchführung des *Mann-Whitney-U-Tests* erfolgte mit der Statistiksoftware *RStudio*. Hierzu wurden die Daten der Auswertung in *RStudio* implementiert und der Test für jedes Konstrukt im Vergleich zur Kontrolle mit dem Befehl

$$\text{wilcox.test(Data\$Beginn} \sim \text{Data\$Konstrukt)}$$

ausgeführt. *Beginn* ist die zu untersuchende Variable, die zweite Variable *Konstrukt* markiert die Gruppenzugehörigkeit. *Data* entspricht der Variablen, in der die Daten hinterlegt sind. Der *Mann-Whitney-U-Test* entspricht dem Aufbau des *Wilcox Tests*, jedoch entfällt hier die Funktion *paired=TRUE* (Wickham and Golemund, 2017).

Mittels des *Pair Wise McNemar Tests* wurden zu den definierten Zeitpunkten Unterschiede zwischen den verschiedenen Interaktionstypen Adhäsion, Repulsion und Sliding statistisch geprüft. Der *Pair Wise McNemar Test* kann bei zwei verbundenen Stichproben genutzt werden, dabei werden diese auf ein Alternativmerkmal verglichen (Mc, 1947). Die Nullhypothese besagt hier, dass die beiden Stichproben in ihrer Häufigkeitsverteilung übereinstimmen (Weiß, 1999). Der Test wurde ausgewählt, da hier der Vergleich von zwei verschiedenen Interventionen (Stimulationen) zu einem vorher definier-

ten Zeitpunkt erfolgen sollte. Die Durchführung des *Pair Wise McNemar Tests* erfolgte mit der Statistiksoftware *RStudio*. Hierzu wurden die Daten der Auswertung in *RStudio* implementiert und der Test für jeden der 12 betrachteten Zeitpunkte mit dem Befehl

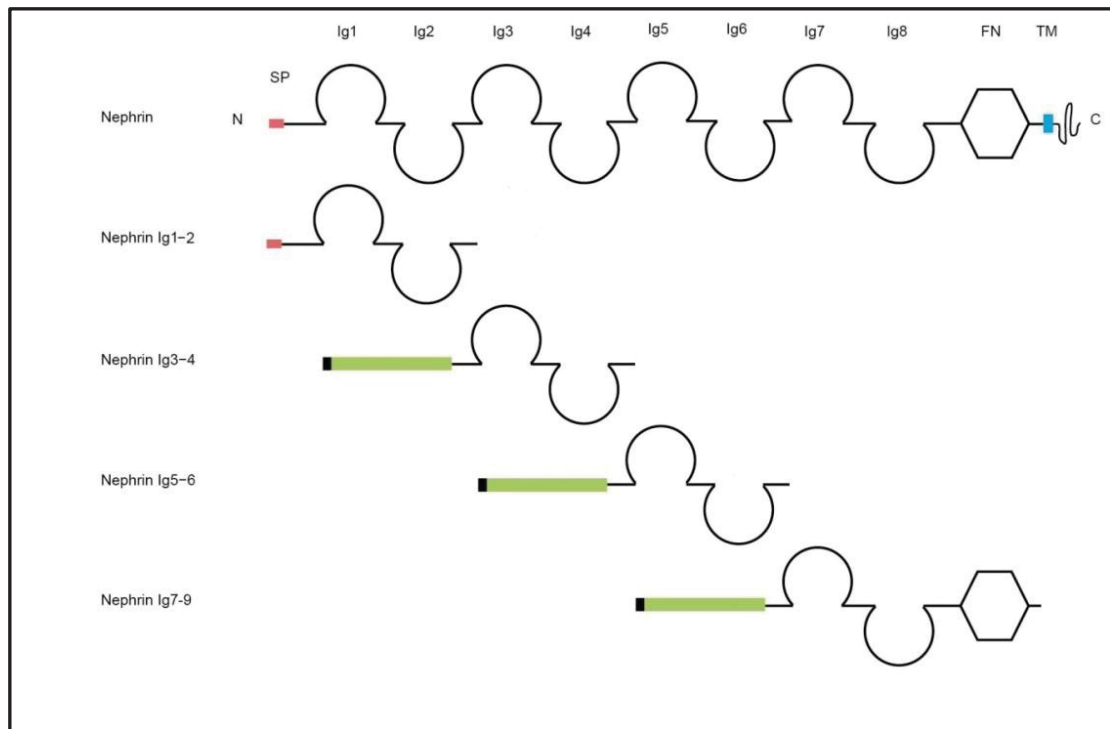
```
PT = pairwiseMcnemar(x = Data$result, g = Data$peptide, block = Data$Exp, test =  
"permutation" method = "fdr", digits = 3)
```

durchgeführt. *Data* ist die Variable, die alle Daten enthält. *Result* ist die zu untersuchende Variable, *Peptide* beschreibt die Zugehörigkeit zu einem der Konstrukte und *Exp* enthält die Nummerierung der zu untersuchenden Variablen innerhalb der Gruppe (Wickham and Grolemond, 2017).

### 3 Ergebnisse

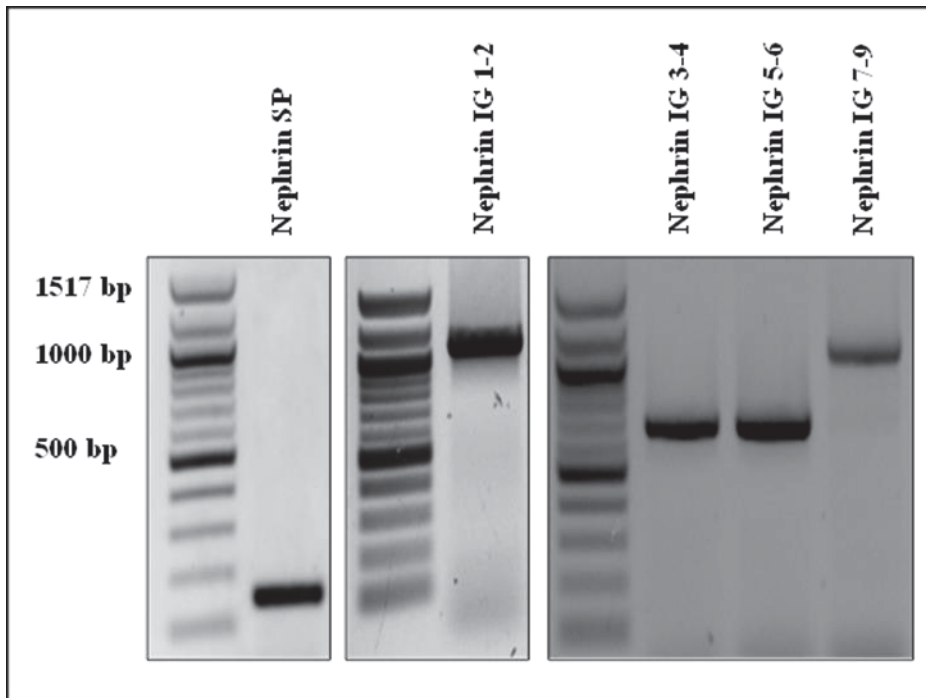
#### 3.1 Klonierung von rekombinantem *Nephrin* und *Nephrin-Truncations*

Der genaue Mechanismus der Positionierung der Podozyten zueinander sowie der glomerulären Schlitzmembran zwischen benachbarten Podozyten ist bislang unklar. Im Vorfeld konnte der Einfluss der *Eph-ephrin*-Interaktion auf die Positionierung neuraler Zellen gezeigt werden (Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007, Pasquale, 2005). *Eph*-Rezeptoren werden in der glomerulären Schlitzmembran exprimiert (Khoshnoodi and Tryggvason, 2001). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte die Expression von *Eph-B1*, *Eph-B2* und *Eph-B3* in humanen Podozyten nachgewiesen werden (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation). Ebenfalls konnte in der hiesigen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass humanes *Nephrin* mit den *Eph-B1*- und *Eph-B2*-Rezeptoren interagiert (Dissertation von Nils Haep). *Eph-B2* ist dabei der mit dem *ephrin-B1*-Liganden interagierende Rezeptor (Hashimoto et al., 2007). Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von humanem *Nephrin* auf die *Eph-B2* – *ephrin-B1* vermittelte Interaktion humaner Podozyten zu untersuchen. Hierfür wurden rekombinantes extrazelluläres *Nephrin*, *Nephrin*-Fragmente oder ein Kontrollprotein während des *Live Cell Imagings* von stabil mit dem Fusionsprotein *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* transduzierten humanen Podozyten hinzugegeben. Im ersten Schritt wurde der gesamte extrazelluläre Anteil von *Nephrin* sowie überlappende Fragmente des extrazellulären *Nephrins* (*Truncations*), die Immunglobulin-Domänen Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6 und Ig 7–9, als Plasmid-DNA mittels PCR amplifiziert. Hierbei ist zu beachten, dass die Fibronectin Domäne von *Nephrin*, die auf die Immunglobulin Domäne Ig 8 folgt, aus Gründen der besseren Übersicht und Anschaulichkeit im Weiteren als Immunglobulin-Domäne Ig 9 bezeichnet wird. Alle Konstrukte, die den N-terminalen Anteil von *Nephrin* aufweisen, enthalten das originale Signalpeptid. Die C-terminalen IgG-Domänen wurden mit dem C-Terminus von *CH<sub>2</sub>* und *CH<sub>3</sub>* des humanen *IgG<sub>1</sub>* gekoppelt. Die Kodierung der Plasmid-DNA für die Aminosäuren Sequenz für ein Signalpetid bewirkte die Ausschleusung des Proteins aus der Zelle (Coleman et al., 1985). Die Kontrolle der DNA-Sequenzen aus der PCR erfolgte mittels Sequenzierung. Zusätzlich wurde die Größe der DNA-Sequenzen mittels Gelelektrophorese bestätigt. Anschließend wurden die Plasmide in den CDM c $\epsilon$  $\gamma$ -Vektor kloniert (vgl. 2.2.10).



**Abb. 5: Schematische Darstellung von *Nephrin* und *Nephrin-Truncations***

Schematische Darstellung des extrazellulären Anteils von *Nephrin*, bestehend aus einem Signalpeptid, gefolgt von 8 Ig-Domänen, einer Fibronectin (FN)-Domäne und einer Transmembrandomäne (TM) (vgl. Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). Die Vorhersage der Immunglobulin (Ig) sowie Fibronectin (FN)-Domänen erfolgte mittels des SMART Vorhersage Programms der Universität Heidelberg (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), es folgt darunter die schematische Darstellung der für das *Live Cell Imaging* hergestellten *Nephrin-Truncations*, bestehend aus dem Signalpeptid sowie den jeweiligen Ig-Domänen: *Nephrin* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9. Hierbei ist zu beachten, dass die Fibronectin-Domäne von *Nephrin*, welche auf die Immunglobulin-Domäne Ig 8 folgt, aus Gründen der besseren Übersicht und Anschaulichkeit im Weiteren als Immunglobulin-Domäne Ig 9 bezeichnet wird. Alle Konstrukte, die den N-terminalen Anteil von *Nephrin* aufweisen (rotes Kästchen), enthalten das *Nephrin*-Signalpeptid (SP). Die C-terminalen IgG-Domänen bzw. FN-Domänen wurden mit dem C-Terminus von  $CH_2$  und  $CH_3$  des humanen  $IgG_1$  (grüne Box) gekoppelt. Modifiziert nach (Gerke et al., 2003)



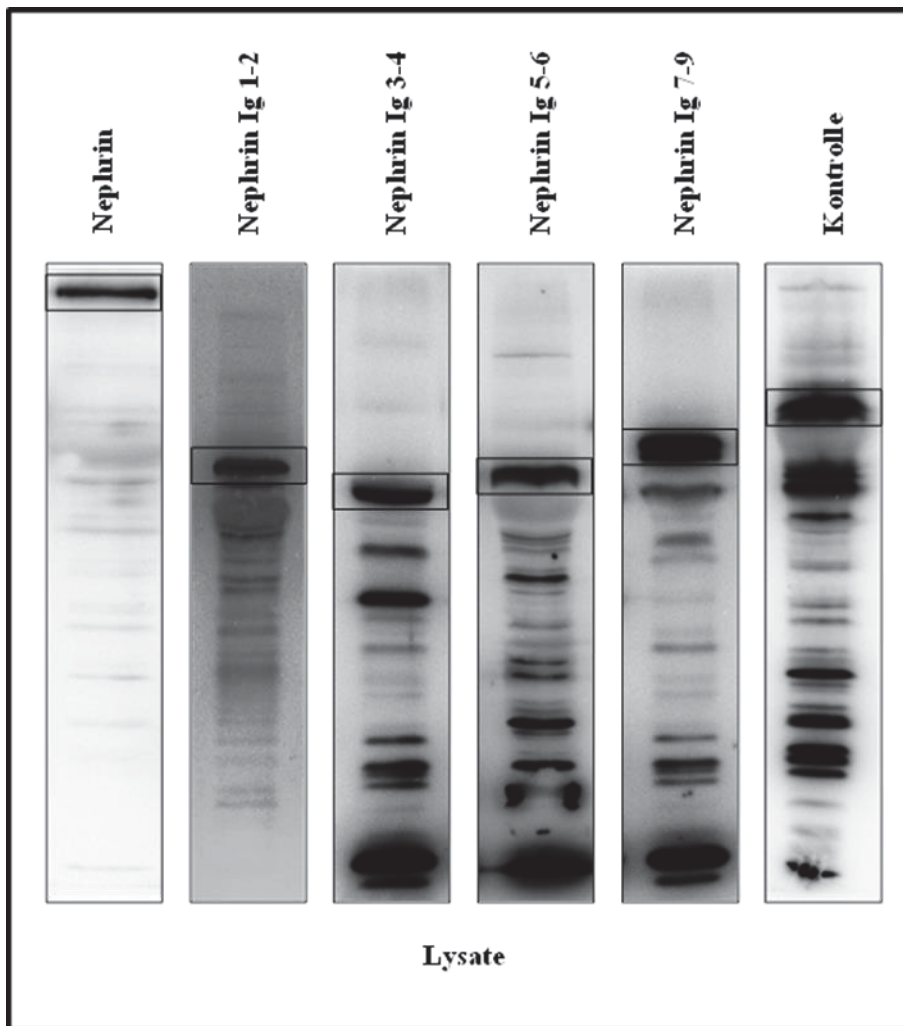
**Abb. 6: PCR zur Amplifizierung der *Nephrin-Truncations***

Mittels PCR wurden mit spezifischen *Primern* DNA-Sequenzen für die entsprechenden *Nephrin-Truncations* hergestellt. Mittels Gelelektrophorese erfolgte die Kontrolle der DNA-Sequenzen nach Größe. Abgebildet sind von links nach rechts: das *Nephrin*-Signalpeptid (130 bp), *Nephrin* Ig 1–2 (1041 bp), *Nephrin* Ig 3–4 (615 bp), *Nephrin* Ig 5–6 (612 bp), *Nephrin* Ig 7–9 (975 bp). Die Größenkontrolle erfolgte mittels 100 bp DNA Ladder-Marker. Im Anschluss wurde die DNA-Sequenz als *Insert* in den Plasmid-Vektor CDM *ceγ* kloniert. bp: Basenpaar, Ig: Immunglobulin

### 3.1.1 Expression der *Nephrin* und *Nephrin-Truncations* in *HEK-293T* Zellen

Durch Hinzugabe von rekombinantem extrazellulären *Nephrin* und *Nephrin-Truncations* während des *Live Cell Imaging*s von stabil mit den Fusionsproteinen *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* transduzierten humanen Podozyten, sollte der Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin*-vermittelten Zellinteraktionen untersucht werden. Vor Beginn der *Live Cell Imaging*-Untersuchungen musste erst gezeigt werden, dass die klonierten Plasmide (vgl. 2.2.10) nach Transfektion tatsächlich für extrazelluläres *Nephrin* und die *Nephrin-Truncations* codieren. Hierzu exprimierten *HEK-293T* Zellen den extrazellulären Anteil von *Nephrin*, die *Nephrin-Truncations* *Nephrin* Ig 1–2, *Nephrin* Ig 3–4, *Nephrin* Ig 5–6, *Nephrin* Ig 7–9 und die Kontrolle. Nach Zellernte und *SDS-Page*-Gelelektrophorese wurde im *Western Blot* gegen Anti-Human-IgG gefärbt (vgl. 2.2.12). Es zeigte sich, dass extrazelluläres *Nephrin* (141 kDa), *Nephrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephrin* Ig 5–6 (49 kDa), *Nephrin* Ig 7–9 (65 kDa)

und die Kontrolle (57 kDa) korrekt von *HEK-293T* Zellen exprimiert werden (vgl. Abb. 7).



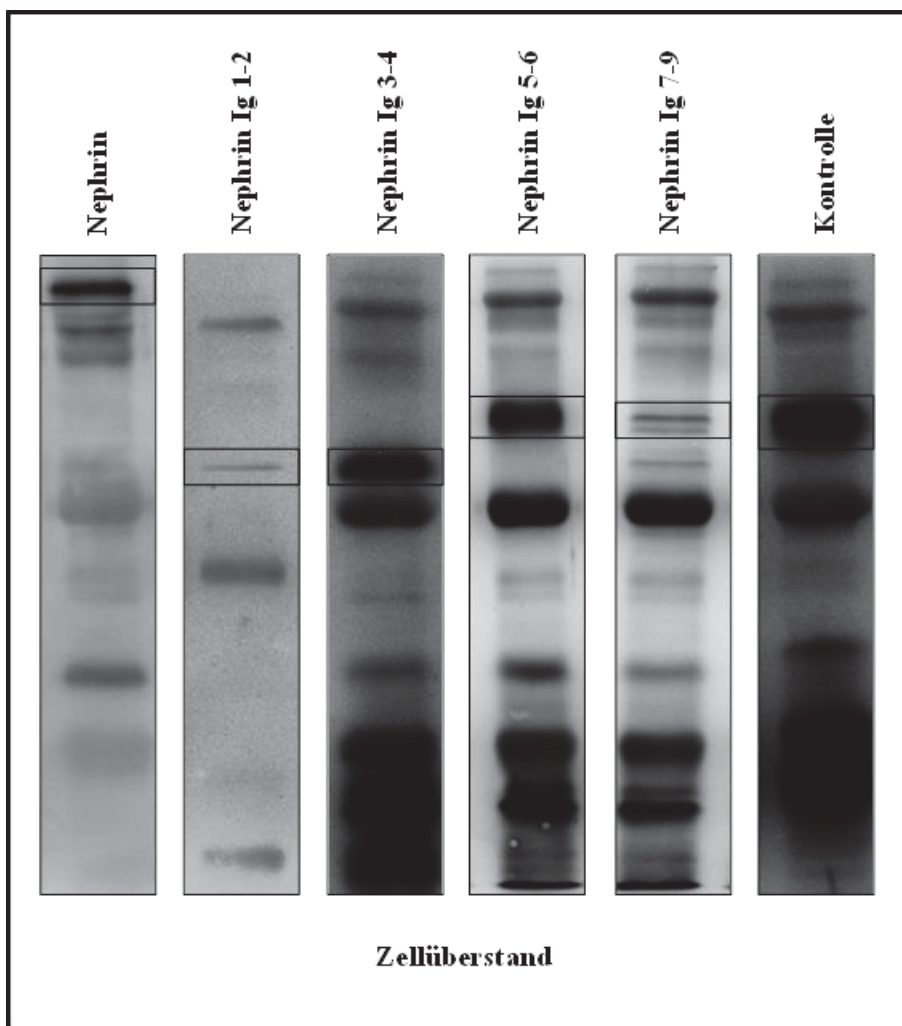
**Abb. 7: Ganzzelllysate aus *HEK-293T* Zellen**

*HEK-293T* Zellen wurden mit der Plasmid-DNA des rekombinanten extrazellulären *Nephrens*, den *Nephrin-Truncations* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9 sowie der Kontrolle transfiziert und exprimierten rekombinantes extrazelluläres *Nephrin* (141 kDa), *Nephrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephrin* Ig 5–6 (49 kDa), *Nephrin* Ig 7–9 (65 kDa) und die Kontrolle (57 kDa), nach Zellernte wurde im *Western Blot* gegen anti-Human-IgG gefärbt. Die Größenkontrolle erfolgte mittels *Prestained Protein Marker, Broad Range (11–190kDa)*. Alle Konstrukte werden von *HEK-293T* Zellen in korrekter Größe exprimiert. Die vollständigen Blots finden sich im Anhang Abb. 15. Ig: Immunglobulin, kDa: Kilodalton

### 3.1.2 Expression von *Nephrin* und *Nephrin-Truncations* in *COS-7* Zellen

Im Anschluss stellte sich die Frage, ob die von *HEK-293T* Zellen exprimierten Proteine von *COS-7* Zellen exprimiert und in den Überstand sezerniert werden. Hierzu wurden *COS-7* Zellen mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* sowie die *Nephrin-Truncations* *Nephrin* Ig 1–2, *Nephrin* Ig 3–4, *Nephrin* Ig 5–6, *Nephrin* Ig 7–9 und der

Kontrolle transfiziert. Nach 7 Tagen wurde der Zellüberstand mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Korrektheit des eluierten Proteins im Western Blot gezeigt. Es zeigte sich beim Färben gegen anti-Human-IgG, dass die rekombinanten Proteine extrazelluläres *Nephrin* (141 kDa), *Nephrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephrin* 5–6 (49 kDa), *Nephrin* 7–9 (65 kDa) und die Kontrolle (57 kDa) von *COS-7* Zellen regelrecht in den Überstand sezerniert werden. Das gewonnene Protein wurde zur Stimulation der Zellen im *Live Cell Imaging* aliquotiert und bei -80 °C gelagert. In Abbildung 7 ist die Expression der rekombinanten Proteine in *HEK-293T* Zellen und in *COS-7* Zellen dargestellt.



**Abb. 8: Zellüberstand von *COS-7* Zellen**

*COS-7* Zellen wurden mit der Plasmid-DNA des rekombinanten extrazellulären *Nephrins*, den *Nephrin-Truncations* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9 sowie der Kontrolle transfiziert. Die *COS-7* Zellen sezernierten die rekombinanten Proteine in den Überstand. Die Zellernte wurde nach 7 Tagen durchgeführt, gefolgt von der Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie. Im Western Blot wurde anschließend gegen anti-Human-IgG gefärbt. Die Größenkontrolle erfolgte mittels *Prestained Protein Marker*,

*Broad Range (11–190 kDa)*. Hierbei zeigte sich, dass die rekombinanten Proteine extrazelluläres *Nephrin* (141 kDa), *Nephrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephrin* Ig 5–6 (49 kDa), *Nephrin* Ig 7–9 (65 kDa) und die Kontrolle (57 kDa) von *COS-7* Zellen korrekt in den Überstand sezerniert werden. Die vollständigen Western Blots finden sich im Anhang Abb. 16. Ig: Immunglobulin, kDa: Kilodalton

### **3.2 Effekt von *Nephrin* und *Nephrin-Truncations* auf die *Eph-B2-ephrin-B1* vermittelte Interaktion in Podozyten**

Khoshnoodi konnte 2003 den Einfluss von *Nephrin* auf die Adhäsion humaner Podozyten zeigen (Khoshnoodi et al., 2003). Um die Fragestellung zu klären, ob *Nephrin* die *Eph-ephrin*-vermittelte Interaktion humaner Podozyten beeinflusst, wurden *Live Cell Imaging*-Untersuchungen durchgeführt. Den *Eph-B2*-Rezeptor bzw. *ephrin-B1*-Liganden exprimierende humane Podozyten wurden zur Ausdifferenzierung gebracht. Der *Eph-B2*-Rezeptor war als Fusionsprotein mit dem gelb-fluoreszierenden Protein *YFP* und der *ephrin-B1*-Ligand war mit dem blau-fluoreszierenden Protein *CFP* in die Zelle transduziert. In Co-Kultur von *Eph-B2*-Rezeptor und *ephrin-B1*-Liganden exprimierenden Zellen wurden im *Live Cell Imaging* die Zell-Zell-Interaktionen untersucht. Hierzu wurden über 720 min jeweils im Abstand von 10 min *YFP* und *CFP*-Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Aus den *CFP*- und *YFP-Merge*-Bildern wurden im Anschluss *Time Lapse* Videos erstellt.

Abb. 9 zeigt *Merge*-Bilder der Stimulation im *Live Cell Imaging* durch extrazelluläres *Nephrin*, durch *Nephrin-Truncations* und durch die Kontrolle jeweils zu 6 Zeitpunkten. Nach Beginn des *Live Cell Imagings* zeigten sich Interaktionen zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimierenden Podozyten. Hierbei kam es zur Transendozytose des Fusionsproteins *Eph-B2-YFP* in die *ephrin-B1-CFP* exprimierenden Podozyten und umgekehrt. Bei der Interaktion der Zellen wurden Adhäsionen, Repulsion und Sliding (ein Aneinandergleiten von Zellen) definiert. Adhärente Zellen konnten sich im Verlauf durch Repulsion oder Sliding erneut trennen. Ebenfalls beobachtet wurde der „Zelltod“ einer der interagierenden Podozyten, der sich durch das im Video erkennbare Platzen eines humanen Podozyten charakterisierte. Im Folgenden werden die zeitlichen Interaktionsverläufe der *Merge*-Bilder beschrieben. Die Auswertung erfolgte standardisiert und randomisiert.

Bei der Stimulation mit dem Kontrollprotein zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (vgl. Abb. 9 „con“) insgesamt sieben Interaktionen. Bei vier Interaktionen kam es



initial zu einer Adhäsion, die 60 min bis 180 min andauerte und jeweils von einer Repulsion der interagierenden Zellen gefolgt war. Bei zwei Interaktionen zeigte sich nach initialem Kontakt unvermittelt eine Repulsion der interagierenden Zellen. Es wurde zusätzlich ein Sliding mit einer Länge von 180 min beobachtet.

Bei der Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (vgl. Abb. 9 „*Nephrin*“) insgesamt fünf Interaktionen. Hierbei kam es bei vier Interaktionen zu einer initialen Adhäsion mit einer Dauer von 180 bis 660 min. Drei von vier Adhäsionen endeten mit einer Repulsion der interagierenden Zellen. Bei der vierten Interaktion dauerte die Adhäsion über das Ende des *Time Lapse* Videos hinaus an. Bei der fünften Interaktion kam es zu einem Sliding, welches 120 min dauerte.

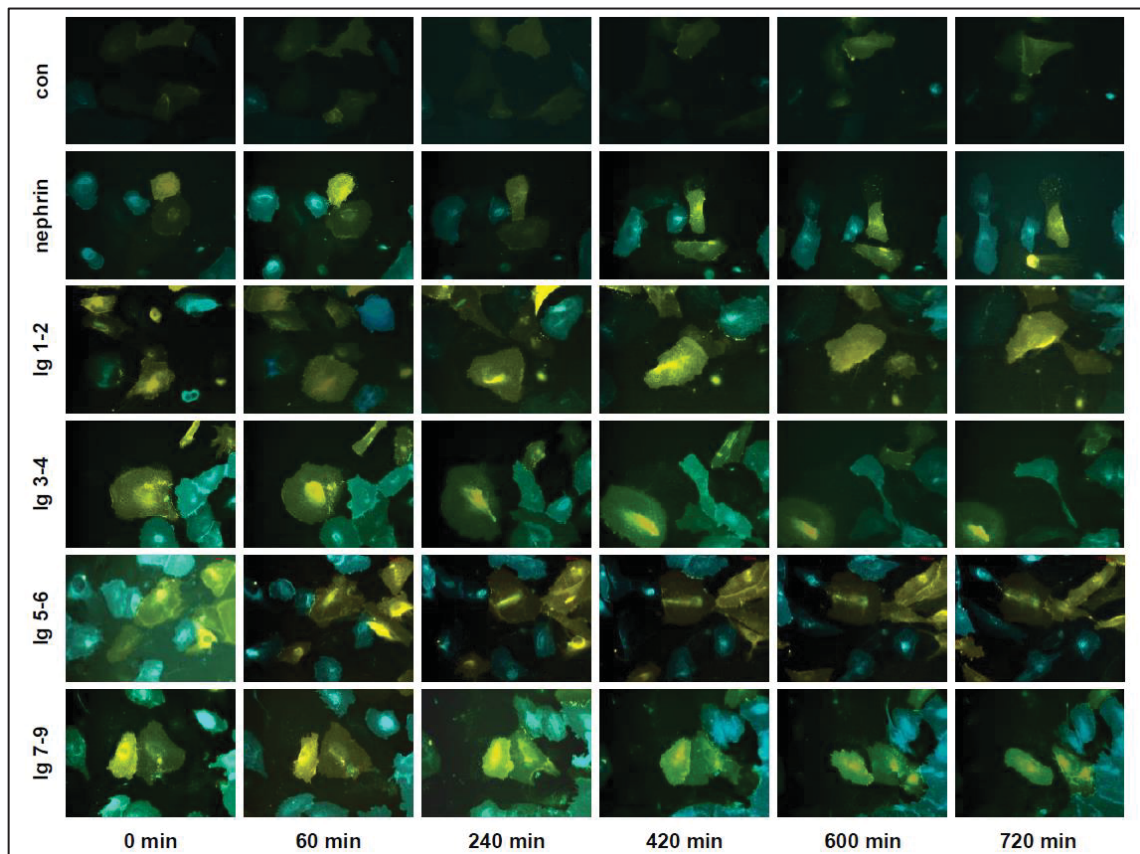
Bei der Stimulation mit der *Nephrin Truncation* Ig 1–2 zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (vgl. Abb. 9 „Ig 1–2“) insgesamt neun Interaktionen. Hierbei kam es bei 8 Interaktionen zu einer initialen Adhäsion. Die Dauer variierte zwischen 180 min und 600 min. Die eine Hälfte der Adhäsionen endete mit einer Repulsion, bei der anderen Hälfte der Adhäsionen dauerte diese über das Ende des *Time Lapse* Videos hinaus an. Bei einer Interaktion kam es nach initialem Kontakt unvermittelt zu einer Repulsion der interagierenden Zellen.

Bei der Stimulation mit der *Nephrin Truncation* Ig 3–4 zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (Abb. 9 „Ig 3–4“) insgesamt drei Interaktionen. Die erste Interaktion benachbarter Podozyten führte zu einer Adhäsion, die 180 min andauerte und mit einer Repulsion endete. Nach einer Latenzzeit kam es zu einer erneuten Adhäsion der beiden Zellen, die ebenfalls 180 min andauerte und erneut mit einer Repulsion endete. Die dritte Interaktion begann mit einer 120 min andauernden Adhäsion, die in Sliding überging, welches über das Ende des *Time Lapse* Videos hinausging.

Bei der Stimulation mit der *Nephrin Truncation* Ig 5–6 zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (Abb. 9 „Ig 5–6“) insgesamt sieben Interaktionen. Bei allen Interaktionen kam es zu einer initialen Adhäsion, die 120 bis 480 min andauerte. Fünf dieser Adhäsionen endeten mit einer Repulsion der interagierenden Zellen. Eine weitere Adhäsion dauerte bis über das Ende des *Time Lapse* Videos hinaus an. Bei der siebten Adhäsion kam es nach einer Repulsion, die nach 180 min stattfand, zu einer Interaktions-

freien Zeit von 420 min und anschließend zu einer erneuten Adhäsion. Diese hielt dann über das Ende des *Time Lapse* Videos hinaus an.

Bei der Stimulation mit der *Nephrin Truncation* Ig 7–9 zeigten sich im betrachteten *Time Lapse* Video (Abb. 9 „Ig 7–9“) insgesamt acht Interaktionen. Initial kam es bei allen Interaktionen zu einer Adhäsion, die 120 bis 660 min andauerte. Fünf Adhäsionen dauerten über das Ende des *Time Lapse* Videos an. Eine Adhäsion wurde durch eine Repulsion der interagierenden Podozyten beendet. Bei zwei Adhäsionen kam es zum durch ein optisch sichtbares „Platzen“ der Podozyten definierten Zelltod einer der interagierenden Podozyten. Es kam hierbei bei der einen Interaktion zum Zelltod des *ephrin-B1* exprimierenden Podozyten nach 180 min Adhäsion und bei der anderen Adhäsion zum Zelltod des *Eph-B2* exprimierenden Podozyten nach 300 min.

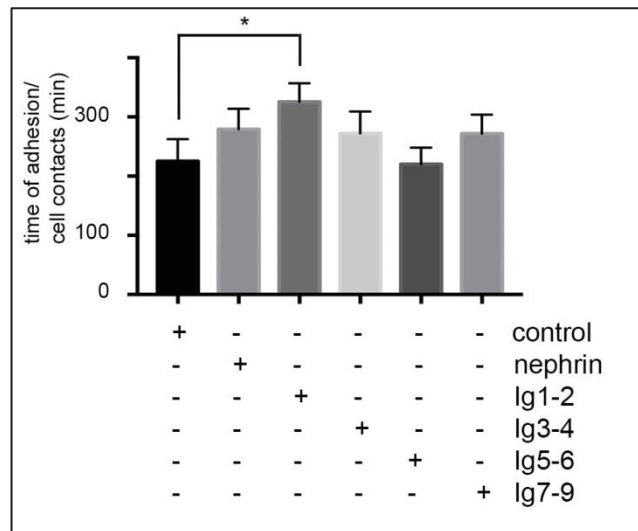


**Abb. 9: Live Cell Imaging humaner Podozyten mit Stimulation der podozytären Interaktion**  
 Die Abbildung zeigt *Live Cell Imaging*-Aufnahmen humaner Podozyten, die den *Eph-B2*-Rezeptor (*YFP*, gelb) bzw. den *ephrin-B1*-Liganden (*CFP*, blau) exprimierten. Die Interaktion der humanen Podozyten wurde im *Live Cell Imaging* zum Zeitpunkt 60 min durch Hinzugabe von extrazellulärem *Nephrin*, den *Nephrin-Truncations*, *Nephrin* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9 oder der Kontrolle stimuliert. Abgebildet sind Aufnahmen der Zeitpunkte 0 min, 60 min, 240 min, 420 min, 600 min und 720 min. Dargestellt sind *Merge*-Bilder aus *YFP*- und *CFP*-Fluoreszenz-Aufnahmen. Im zeitlichen Verlauf zeigten sich Interaktio-

nen zwischen gegenüberliegenden Podozyten, bei denen es zur Transendozytose des Fusionsproteins *Eph-B2-YFP* in die *ephrin-B1-CFP* exprimierenden Podozyten und umgekehrt kam. Es folgt eine Phase der Adhäsion, eine Repulsion oder ein Sliding der Podozyten aneinander entlang. Ebenfalls beobachtet wurde der Zelltod einer der interagierenden Podozyten in zeitlicher Folge der Interaktion, der sich durch ein „Platzen“ dieses Podozyten präsentierte. Ig: Immunglobulin, min: Minuten

### 3.2.1 Einfluss der Stimulation auf die Dauer der podozytären Adhäsion

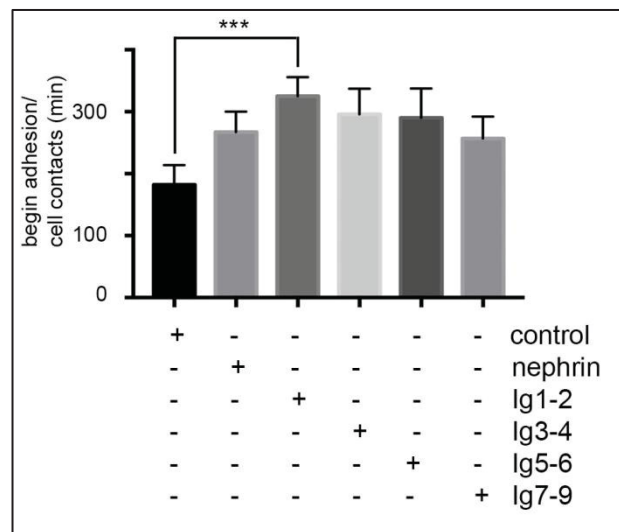
Durch Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* kommt es zu einer längeren Dauer der Adhäsion interagierender Podozyten im *Live Cell Imaging*. Die Dauer der Adhäsion war bei Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 signifikant (*Nephrin* Ig 1–2 300 min; Kontrolle 120 min;  $p= 0,021$ ) länger als in der Kontrolle. Bei Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* Ig 3–4, Ig 5–6 und Ig 7–9 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Dauer der podozytären Adhäsion.



**Abb. 10: Dauer der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im *Live Cell Imaging***  
*Live Cell Imaging* von humanen Podozyten, die stabil *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* exprimierten, über 720 min, Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* bzw. *Nephrin-Truncations* 60 min nach Beginn. Im Diagramm zeigt sich die zeitliche Dauer der Adhäsion interagierender Podozyten in min. Die Stimulation der podozytären Interaktion mit *Nephrin* Ig 1–2 (*Nephrin* Ig 1–2 300 min; Kontrolle 120 min;  $p= 0,021$ ) führte zu einer signifikant längeren Dauer der Adhäsion im *Live Cell Imaging* als in der Kontrolle (n= 40 *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig 1–2/28 *Nephrin* Ig 3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig7–9/28 Kontrolle) (\*: $p \leq 0,05$ ). Ig: Immunglobulin, min: Minuten, n: Anzahl

### 3.2.2 Einfluss der Stimulation auf den Beginn der podozytären Adhäsion

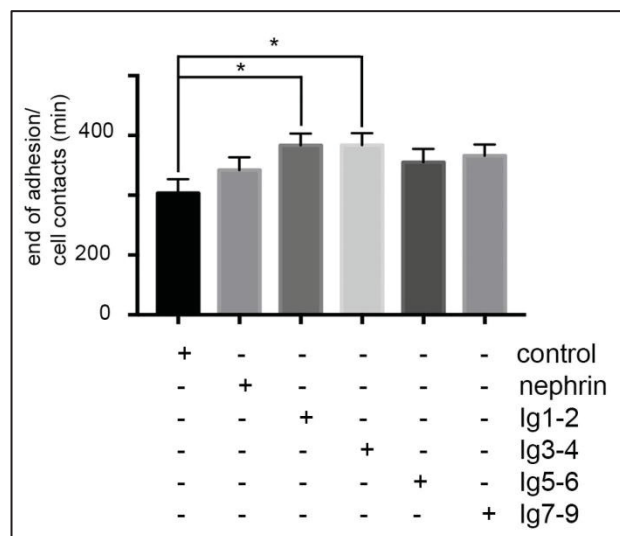
Die Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* hat Einfluss auf den Zeitpunkt des Beginns der Adhäsion interagierender Podozyten im *Live Cell Imaging*. Bei Stimulation der Podozyten mit *Nephrin* Ig 1–2 war der Beginn der Adhäsion signifikant später (*Nephrin* Ig 1–2 300 min; Kontrolle 120 min;  $p = 0,0009$ ) als in der Kontrolle. Bei Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* Ig 3–4, Ig 5–6 und Ig 7–9 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Beginns der podozytären Adhäsion.



**Abb. 11: Beginn der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im *Live Cell Imaging***  
*Live Cell Imaging* von humanen Podozyten, die stabil *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* exprimierten, über 720 min, Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* bzw. *Nephrin-Truncations* 60 min nach Beginn. Im Diagramm zeigt sich der Zeitpunkt des Beginns der Adhäsion interagierender Podozyten (min nach Beginn des *Live Cell Imagings*). Die Stimulation der podozytären Interaktion mit *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* führte zu einem späteren Beginn der podozytären Adhäsion. Die Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 (*Nephrin* Ig 1–2 300 min; Kontrolle 120 min;  $p = 0,0009$ ) führt zu einem signifikant späteren Beginn der Adhäsion im *Live Cell Imaging* als in der Kontrolle ( $n = 40$  *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig 1–2/28 *Nephrin* Ig 3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig 7–9/28 Kontrolle) (\*\*\*: $p \leq 0,001$ ). Ig: Immunglobulin, min: Minuten, n: Anzahl

### 3.2.3 Einfluss der Stimulation auf das Ende der podozytären Adhäsion

Die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* hat Einfluss auf den Zeitpunkt des Endes der Adhäsion interagierender Podozyten. Der Zeitpunkt des Endes der Adhäsion war bei *Nephrin* Ig 1–2 (*Nephrin* Ig 1–2 600 min; Kontrolle 420 min;  $p = 0,012$ ) und *Nephrin* Ig 3–4 (*Nephrin* Ig 3–4 660 min; Kontrolle 420 min;  $p = 0,013$ ) signifikant später. Bei Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* Ig 5–6 und Ig 7–9 zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Endes der podozytären Adhäsion ( $n = 40$  *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig1–2/28 *Nephrin* Ig3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig7–9/28 Kontrolle).

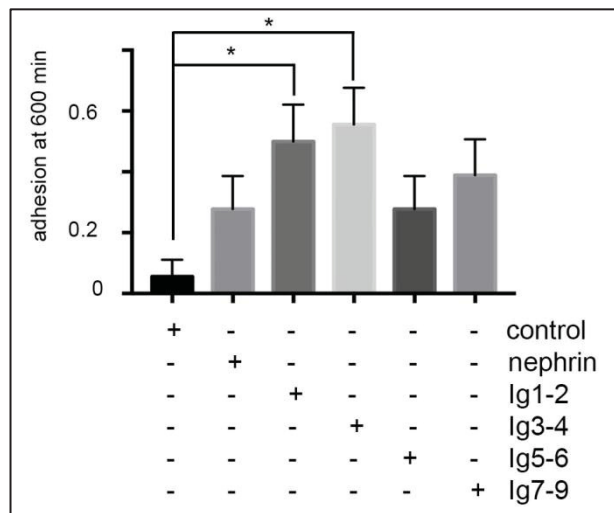


**Abb. 12: Ende der Adhäsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im *Live Cell Imaging***

*Live Cell Imaging* von humanen Podozyten, die stabil *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* exprimierten, über 720 min, Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* bzw. *Nephrin-Truncations* 60 min nach Beginn. Im Diagramm zeigt sich der Zeitpunkt des Endes der Adhäsion interagierender Podozyten (min nach Beginn des *Live Cell Imagings*). Die Stimulation der podozytären Interaktion mit *Nephrin* Ig 1–2 (*Nephrin* Ig 1–2 600 min; Kontrolle 420 min;  $p = 0,012$ ) und *Nephrin* Ig 3–4 (*Nephrin* Ig 3–4 660 min; Kontrolle 420 min;  $p = 0,013$ ) führte zu einem signifikant späteren Ende der Adhäsion im *Live Cell Imaging* als in der Kontrolle ( $n = 40$  *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig 1–2/28 *Nephrin* Ig 3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig 7–9/28 Kontrolle) (\*: $p \leq 0,05$ ). Ig: Immunglobulin, min: Minuten, n: Anzahl

### 3.2.4 Einfluss der Stimulation auf die podozytäre Adhäsion zu definierten Zeitpunkten

Die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* hat Einfluss auf die Adhäsion der interagierenden Podozyten zu definierten Zeitpunkten während des *Live Cell Imagings*. Zum Zeitpunkt 600 min nach Beginn des *Live Cell Imagings* zeigte sich signifikant mehr Adhäsion bei Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 (*Nephrin* Ig 1–2 0,43; Kontrolle 0,14;  $p = 0,035$ ) und *Nephrin* Ig 3–4 (*Nephrin* Ig 3–4 0,61; Kontrolle 0,14;  $p = 0,035$ ) als in der Kontrolle. Die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* Ig 5–6 und Ig 7–9 zeigten keine signifikanten Veränderungen der Adhäsion zum Zeitpunkt 600 min.

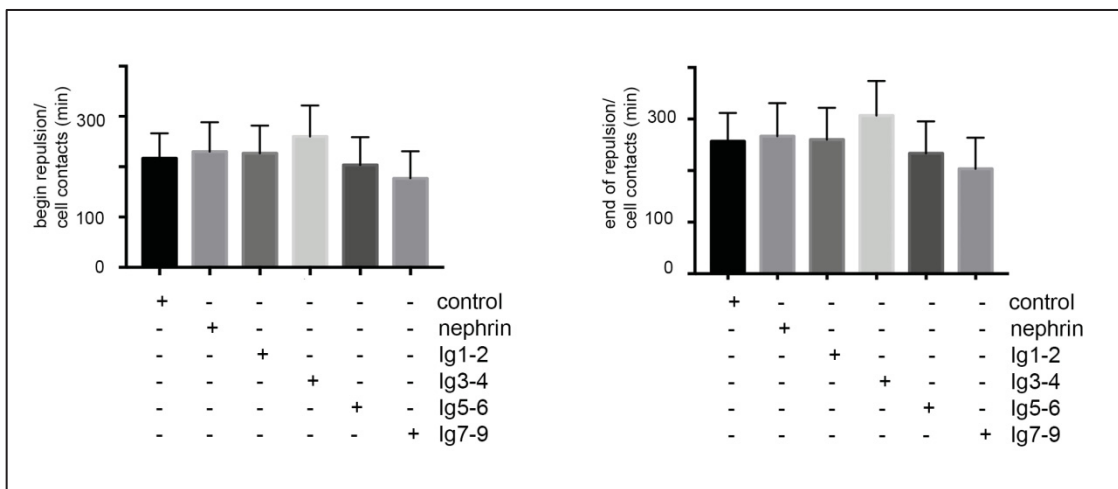


**Abb. 13: Adhäsion zum Zeitpunkt 600 min bei Stimulation der podozytären Interaktion im *Live Cell Imaging***

*Live Cell Imaging* von humanen Podozyten, die stabil *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* exprimierten, über 720 min, Stimulation mit rekombinantem extrazellulärem *Nephrin* bzw. *Nephrin-Truncations* 60 min nach Beginn. Im Diagramm zeigt sich der Anteil der podozytären Interaktionen, die zum Zeitpunkt 600 min in Adhäsion sind, an allen Interaktionen. Die Stimulation der podozytären Interaktion mit *Nephrin* Ig 1–2 ( $p = 0,035$ ) und *Nephrin* Ig 3–4 ( $p = 0,035$ ) führte zum Zeitpunkt 600 min zu signifikant mehr Adhäsion im *Live Cell Imaging* als in der Kontrolle ( $n = 40$  *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig 1–2/28 *Nephrin* Ig 3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig 7–9/28 Kontrolle) (\*: $p \leq 0,05$ ). Ig: Immunglobulin, min: Minuten, n: Anzahl

### 3.2.5 Einfluss der Stimulation auf die podozytäre Repulsion

Im nächsten Schritt wurden der Einfluss der Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* auf die Repulsion interagierender Podozyten untersucht. Die Stimulation der podozytären Interaktion mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* hat keinen signifikanten Einfluss auf den Zeitpunkt des Beginns der Repulsion interagierender Podozyten im *Live Cell Imaging*. Ebenfalls zeigt sich kein signifikanter Unterschied in dem Ende der Repulsion interagierender Podozyten im *Live Cell Imaging*.



**Abb. 14: Beginn und Ende der Repulsion bei Stimulation der podozytären Interaktion im *Live Cell Imaging***

*Live Cell Imaging* von humanen Podozyten, die stabil *Eph-B2-YFP* bzw. *ephrin-B1-CFP* exprimierten, über 720 min, Stimulation mit rekombinatem extrazellulärem *Nephrin* bzw. *Nephrin-Truncations* 60 min nach Beginn. Im Diagramm links zeigt sich der Zeitpunkt des Beginns der Repulsion interagierender Podozyten. Die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* führt zu keiner signifikanten Änderung des Beginns der Repulsion interagierender Podozyten. Im Diagramm rechts zeigt sich der Zeitpunkt des Endes der Repulsion interagierender Podozyten. Die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* führt zu keiner signifikanten Änderung des Endes der Repulsion interagierender Podozyten (n = 40 *Nephrin*/33 *Nephrin* Ig 1–2/28 *Nephrin* Ig 3–4/18 *Nephrin* Ig 5–6/32 *Nephrin* Ig 7–9/28 Kontrolle). Ig: Immunglobulin, min: Minuten, n: Anzahl

### 3.2.6 Einfluss der Stimulation auf das podozytäre Sliding

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin-Truncations* auf das Sliding interagierender Podozyten untersucht. Das Sliding ist charakterisiert durch eine aneinander entlang driftende Bewegung eines interagierenden Rezeptor-Liganden-Paars. Die Dauer des Slidings ist dabei variabel. Es wurden Zeiträume zwischen 60 min und 360 min für ein Sliding beobachtet. Bei insge-

samt 179 ausgewerteten Zell Interaktionen kam es bei elf Interaktionen zu einem Sliding. Ebenfalls konnte der Zelltod einer der interagierenden Zellen in zeitlicher Folge der Interaktion beobachtet werden. Es kam bei insgesamt 179 ausgewerteten Zell-Interaktionen in 21 Fällen zum Absterben einer der interagierenden Zellen. Der Zelltod war fast ausschließlich nach vorheriger Adhäsion zu beobachten. Die Dauer der vorangegangenen Adhäsion war hierbei variabel. Aufgrund der geringen Anzahl der beobachteten Slidings und Zelltode in Relation zur Gesamtzahl der Interaktionen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.



## 4 Diskussion

Chronische Nierenerkrankungen sind ein bedeutsames Problem weltweiter Gesundheitssysteme (Currie and Delles, 2013). Der renale Verlust von Albumin (Albuminurie) als frühestes klinisch messbares Zeichen einer Proteinurie ist ein Marker renaler Schädigung, der häufig schon eher messbar ist als eine konkrete Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (Currie and Delles, 2013). Die Albuminurie ist hierbei Ausdruck der Schädigung des glomerulären Filters, der dreischichtig aus fenestriertem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran, den Podozyten und der zwischen ihnen ausgebildeten glomerulären Schlitzmembran aufgebaut ist. Podozytäre Schädigung zeigt sich in vielen Erkrankungen der humanen Niere, unter anderem bei Minimal Change Glomerulonephritis, fokal segmentaler Glomerulosklerose und diabetischer Nephropathie (Asanuma, 2015). Die genauen Mechanismen der Positionierung der Podozyten zueinander sowie der glomerulären Schlitzmembran, die sich zwischen ihren sekundären Fußfortsätzen ausbildet, blieben bislang unklar. In anderen Organsystemen hat die *Eph-ephrin*-Interaktion großen Einfluss auf die Positionierung von spezialisierten Zell-Zell-Kontakten (Egea and Klein, 2007, Himanen et al., 2007, Pasquale, 2005). *Ephrin-B1* konnte im humanen Glomerulum nachgewiesen werden und kolokalisiert mit *Nephrin*, dem Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran. *Eph-B2* ist dabei der mit dem *ephrin-B1*-Liganden interagierende Rezeptor (Hashimoto et al., 2007). Die Expression des *Eph-B1*-, *Eph-B2*- und *Eph-B3*-Rezeptors im humanen Glomerulum konnte im Vorfeld durch die eigene Arbeitsgruppe gezeigt werden (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin* vermittelte Interaktion humaner Podozyten im *Live Cell Imaging* zu zeigen. Hierfür exprimierten humane Podozyten den *Eph-B2*-Rezeptor bzw. den *ephrin-B1*-Liganden und wurden während des *Live Cell Imagings* mit extrazellulärem *Nephrin* und seinen *Truncations* stimuliert. Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die Stimulation mit den extrazellulären *Nephrin*-Immunglobulindomänen Ig 1–2 die Adhäsion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimierenden humanen Podozyten verlängert. Dieser Effekt wird von den Immunglobulindomänen Ig 1–2 vermittelt. Die Stimulation der *Eph-ephrin* vermittelten Interaktionen mit *Nephrin* Ig 1–2 führt zu einem späteren Beginn der Adhäsionen im

*Live Cell Imaging*. Durch Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 und *Nephrin* Ig 3–4 wird das Ende der *Eph-ephrin* vermittelten Adhäsionen verzögert. Ebenfalls kommt es durch Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 und *Nephrin* Ig 3–4 zu vermehrten Adhäsionen zum Zeitpunkt 600 min im *Live Cell Imaging*. Bei Stimulation mit dem gesamten extrazellulären *Nephrin* konnte keine signifikante Beeinflussung der Adhäsion gezeigt werden. Es war kein Einfluss von extrazellulärem *Nephrin* und seinen *Truncations* auf die *Eph-ephrin*-vermittelte Repulsion humaner Podozyten sichtbar.

#### 4.1 Einfluss von *Nephrin* auf die Adhäsion von Podozyten

In der Literatur ist beschrieben, dass die Expression von *Nephrin* in *HEK-293T* Zellen und in murinen Podozyten zu deren Adhäsion führt (Khoshnoodi et al., 2003). Bei physiologischer  $Ca^{2+}$  Konzentration sind die beschriebenen Adhäsionen um das zweifache erhöht (Khoshnoodi et al., 2003). Der Verlust von *Nephrin* führt zu einem fehlenden Ausbilden der Schlitzmembran, einem podozytären *Effacement* und massiver Proteinurie (Putala et al., 2001). *Eph*-Rezeptoren regulieren durch gradienten-abhängige Adhäsionen und Repulsionen die topographische Anordnung von Zellen (Feldheim and O'Leary, 2010, Triplett and Feldheim, 2012, Pasquale, 2008). Ziel dieser Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob *Nephrin* die Interaktion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* zugunsten von Adhäsionen beeinflusst.

Die Stimulation mit den Immunglobulin Domänen *Nephrin* Ig 1–2 zeigte signifikant längere Adhäsionen als die Kontrolle. Es kommt zu einem signifikant späteren Beginn und Ende der Adhäsion im *Live Cell Imaging* durch Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2. Zum Zeitpunkt 600 Minuten kommt es zu signifikant mehr Adhäsionen nach Stimulation mit *Nephrin* Ig 1–2 als in der Kontrolle.

Zusätzlich zeigte sich auch bei Stimulation mit den Immunglobulin-Domänen *Nephrin* Ig 3–4 ein signifikanter Einfluss auf das Adhäsionsverhalten humaner Podozyten. Die Stimulation mit *Nephrin* Ig 3–4 führt zu einem späteren Ende der Adhäsionen im *Live Cell Imaging* sowie zu einer signifikant vermehrten Adhäsion zum Zeitpunkt 600 Minuten. Eine signifikante Verlängerung der Adhäsion durch Stimulation mit *Nephrin* Ig 3–4 zeigte sich nicht.

Hieraus ist zu schließen, dass die Immunglobulin-Domänen *Nephrin* Ig 1–2 und *Nephrin* Ig 3–4 das Adhäsionsverhalten humaner Podozyten beeinflussen. Dies geschieht möglicherweise über die direkte Interaktion mit dem *Eph-B2* Rezeptor und seinem korrespondierenden *ephrin-B1* Liganden, die eine Bindung von *Eph-B2* und *ephrin-B1* verhindert. Diese Ergebnisse unterstreichen die bereits beschriebene adhäsive Wirkung von *Nephrin* auf *HEK-293T* Zellen und murine Podozyten (Khoshnoodi et al., 2003). Aus den Ergebnissen lässt sich ebenfalls schließen, dass die Interaktionsstelle zwischen *Nephrin* und *Eph-B2* und *ephrin-B1* im Bereich *Nephrin* Ig 1–4 liegt.

Im Gegensatz hierzu konnte bei 40 untersuchten Interaktionen mit dem gesamten extrazellulären *Nephrin* kein signifikanter Unterschied für das Adhäsionsverhalten der Podozyten im Vergleich zur Kontrolle aufgezeigt werden (vgl. Abb. 10 – Abb. 13). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits im Vorfeld in Co-Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass *Nephrin* mit dem *Eph-B2*-Rezeptor interagiert. Die Interaktion findet dabei mit dem extrazellulären Anteil von *Nephrin* statt (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation). In Zusammenschau der im Vorfeld gezeigten Interaktion zwischen extrazellulärem *Nephrin* und dem *Eph-B2*-Rezeptor und dem hier gezeigten Effekt von *Nephrin* Ig 1–2 wäre der Einfluss von extrazellulärem *Nephrin* auf die *Eph-ephrin*-vermittelte Adhäsion humaner Podozyten zu erwarten. Dem steht entgegen, dass im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis gilt es in weiteren Untersuchungen durch eine Erhöhung der Versuchszahl zu verifizieren.

Fukusumi konnte zeigen, dass die Koexpression von *ephrin-B1* und *Nephrin* in *HEK-293T* Zellen zu deren Interaktion führt. Bei dieser *cis*-Interaktion wird die Interaktionsstelle zwischen *Nephrin* und *ephrin-B1* in den basalen Domänen beider Proteine angegeben. Bei *Nephrin* befindet sich die Interaktionsstelle innerhalb der Immunglobulin-Domäne Ig 8 (Fukusumi et al., 2018).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit weisen allerdings darauf hin, dass sich die Interaktionsstelle von *Nephrin* für die Interaktion mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* innerhalb der *Nephrin* Immunglobulin-Domänen Ig 1-4 befindet. Beim Vergleich der Ergebnisse gilt es zu berücksichtigen, dass in dem von Fukusumi verwendeten Modell ausschließ-

lich die Interaktion zwischen *Nephrin* und dem *ephrin-B1*-Liganden in *HEK-293T* Zellen in Überexpression überprüft wird. Das Ziel dieser Arbeit war es jedoch, den Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin*-vermittelte Interaktion humaner Podozyten zu untersuchen, sodass neben dem *ephrin-B1*-Liganden auch der korrespondierende *Eph-B2* Rezeptor zu betrachten war. Aufgrund des Rezeptor-Liganden-Verhältnisses von *Eph-B2* und *ephrin-B1* ist davon auszugehen, dass die Interaktion primär zwischen *Nephrin* und *Eph-B2* stattfindet. Daher ist es denkbar, dass die von Fukusumi beschriebene Interaktion zwischen *Nephrin* und *ephrin-B1* von der Interaktion zwischen *Eph-B2* und *Nephrin* überlagert wird. Zur Verifizierung dieser Annahme sollte analog zum Vorgehen von Fukusumi in Zell Adhäsionsassays überprüft werden, ob die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Interaktionsstelle von *Nephrin* spezifisch für *Eph-B2* oder *ephrin-B1* ist. Im Anschluss sollte zur weiteren Validierung eine Deletion der Gensequenz der beschriebenen Interaktionsstelle erfolgen. In Zell Adhäsionsassays zwischen dem mutierten *Nephrin* und dem *Eph-B2*-Rezeptor bzw. dem *ephrin-B1*-Liganden sollte dann aufgrund fehlender Interaktion die Interaktionsstelle bestätigt werden.

Ein weiterer Unterschied zwischen dem Versuchsaufbau von Fukusumi und dem dieser Untersuchung ist, dass Fukusumi die *cis*-Interaktion zwischen *Nephrin* und *ephrin-B1* überprüft. Die von uns durchgeführte Stimulation mit freiem extrazellulärem *Nephrin* entspricht jedoch am ehesten einer *trans*-Interaktion. Für die *Eph*-Rezeptoren ist beschrieben, dass diese ihre *ephrin*-Liganden in *cis*- und *trans*-Position in unterschiedlichen Domänen binden. Die globuläre Domäne des *Eph*-Rezeptors dient dabei als *ephrin*-Liganden-Bindungsdomäne in *trans*-Position. Die Fibronectin Typ III-Domänen dienen zur Bindung von *ephrin* in *cis*-Position (Labrador et al., 1997, Himanen et al., 1998, Himanen et al., 2001, Himanen et al., 2007). Für andere Oberflächenrezeptoren wie z.B. *Ly49A* ist die Interaktionsstelle in *cis*- und *trans*-Position identisch, jedoch ist für die *cis*-Interaktion eine Konformationsänderung des Rezeptors notwendig (Held and Mariuzza, 2011).

Homophile *Nephrin*-Interaktionen in *trans*-Position können durch Antikörper gegen die Immunglobulin Domänen *Nephrin* Ig 1–2 unterbunden werden (Khoshnoodi et al., 2003). Heterophile Interaktionen zwischen *Nephrin* und NEPH1 können über unterschiedliche Ig Domänen beider Proteine vermittelt werden (Gerke et al., 2003). Ob

*Nephrin* für die *cis*- und *trans*-Interaktion mit seinen Bindungspartnern dieselbe Interaktionsstelle nutzt, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Erweiternd könnte daher überprüft werden, ob *Nephrin ephrin-B1* an unterschiedlichen Interaktionsstellen bindet, abhängig davon, ob die Interaktion in *cis*- oder *trans*-Position stattfindet.

Sollte die Interaktionsstelle für die *cis*- und *trans*-Interaktion von *Nephrin* mit *ephrin-B1* identisch sein und sich in den basalen Domänen beider Proteine befinden, müsste es bei *trans*-Interaktion aufgrund der deutlich unterschiedlichen Größen von *Nephrin* (1241 AS davon 1033 AS extrazellulär) und *ephrin-B1* (346 AS davon 210 AS extrazellulär) zu einer Konformationsänderung von *Nephrin* kommen, damit eine Interaktion möglich ist (Lin et al., 1999, Tryggvason, 1999). Zur Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran ist eine Überlappung zweier gegenüberliegender *Nephrin*-Moleküle notwendig, daher erscheint solch eine Konformationsänderung nicht plausibel (Wartiovaara et al., 2004).

#### **4.2 Einfluss von *Nephrin* auf die Repulsion von Podozyten**

Poliakov konnte 2008 zeigen, dass es in stabil mit dem *Eph-B2*-Rezeptor bzw. dem *ephrin-B1*-Liganden transduzierten *HEK-293T* Zellen nach Interaktion zur Repulsion der gegenüberliegenden Zellen kommt. Die Interaktion von *Eph-B2* exprimierenden Zellen untereinander führte nicht zur Repulsion, sondern teilweise zu einer Adhäsion und nur zu einem transienten Kollabieren der Zellfortsätze. Bei Interaktion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* gegenüberliegender Zellen kam es zur Repulsion sowie einem Kollabieren der Zellfortsätze und einer Abrundung der Zelle. Durch Phosphorylierung des ungebundenen *Eph-B2*-Rezeptors wird die Interaktion mit *ephrin-B1* verhindert. Dies führt zur Inhibition der sonst durch den *Ras-MAPK*-Signalweg vermittelten Trennung und Repulsion der Zellen (Poliakov et al., 2008).

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden *Live Cell Imaging* Untersuchungen mit humanen Podozyten, die stabil mit dem *Eph-B2-YFP*- bzw. *ephrin-B1-CFP*-Fusionskonstrukt transduziert waren, durchgeführt. Hier zeigte sich nach Interaktion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimierenden Podozyten eine Repulsion der interagierenden Zellen (Doktorarbeit von Julius Hoffacker). In den eigenen Untersuchungen konnte die be-

schriebene Repulsion nach Interaktion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimierenden Podozyten ebenfalls beobachtet werden.

Die Stimulation der podozytären Interaktion mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin*-Fragmenten zeigte keine statistisch signifikante Änderung des Zeitpunktes einer Repulsion. Darüber hinaus war der Anteil der Interaktionen, die bei Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin*-Fragmenten mit einer Repulsion endeten im Vergleich zur Kontrolle, nicht signifikant verändert (Daten hier nicht gezeigt). Hieraus ist zu schließen, dass die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* in diesem Modell keinen Einfluss auf die *Eph*-Rezeptor vermittelte Repulsion humaner Podozyten hat.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin* vermittelte Repulsion in der vorliegenden Untersuchung ist, dass die *Nephrin-Eph-B2*- und die *Nephrin-ephrin-B1*-Interaktionen potentiell adverse Effekte auf die Repulsion haben könnten. Diese Vermutung wird dadurch untermauert, dass in *HEK-293T* Zellen und in murinen Podozyten gezeigt werden konnte, dass die Stimulation mit *ephrin-B1* den durch *Eph-B2* vermittelten stabilisierenden Effekt auf *Nephrin* verringert, indem es die *Nephrin*tyrosinphosphorylierung reduziert (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation).

Der Tyrosinphosphorylierungszustand von *Nephrin* ist über die Interaktion mit intrazellulären Adapterproteinen wie *NCK* entscheidend für die Ausbildung der podozytären Fußfortsätze und die Integrität der glomerulären Schlitzmembran (Jones et al., 2006, Jones et al., 2009, New et al., 2013). Die Tyrosinphosphorylierung an den spezifischen *NCK*-Bindungsstellen wird von den *Src*-Kinasen vermittelt (Verma et al., 2006, Yu et al., 2001). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *Nephrin* durch *Eph-B1* und *Eph-B2* an *NCK*-Bindungsstellen *Nephrin* Y1176/1193 sowie Y1217 tyrosinphosphoryliert wird. Quack et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung von *Nephrin* Y1193 zur Stabilisierung von *Nephrin* in der glomerulären Schlitzmembran durch Inhibition der  $\beta$ -Arrestin 2 vermittelten Endozytose führt (Quack et al., 2006). New et al. konnten in einem Maus-Knockin-Modell (*Nephrin*-Y3F) durch den Austausch der Tyrosinreste an den drei *NCK*-Bindungsstellen durch Phenylalanin die *Neph*-

*rin* Tyrosinphosphorylierung unterbinden ohne jedoch die Proteinstruktur zu verändern (New et al., 2013). Die zentrale Rolle von *NCK* ist es, *Nephrin* mit dem Aktin-Zytoskelett zu verbinden (Jones et al., 2006). Obwohl die *Nephrin*-Y3F-Mäuse ohne messbare Einschränkungen geboren werden, entwickeln diese früh ein RPGN, welches durch ein Fußfortsatz-*Effacement*, eine Verdickung der GBM und Proteinurie imponiert (New et al., 2016). Die Interaktion zwischen *Nephrin* und *NCK* ist bei verschiedenen Erkrankungen mit akuter Nierenschädigung gestört, wie der Minimal-Change-Glomerulonephritis (Uchida et al., 2008), der membranösen Glomerulonephritis (Ohashi et al., 2010) und der Nephrosklerose (Königshausen et al., 2016). Dies zeigt, dass die *Nephrin*-Tyrosinphosphorylierung *in vivo* und *in vitro* kritisch für die Stabilisierung der podozytären Zytoarchitektur und die Wiederherstellung nach Verletzung ist. Durch Differenzierung und anschließende Deletion der individuellen Interaktionsstellen von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *Nephrin* mit *ephrin-B1* könnte im weiteren Verlauf überprüft werden, ob der fehlende Einfluss von extrazellulärem *Nephrin* auf die *Eph-ephrin* vermittelte Repulsion aufgrund adverser Effekte von *Eph-B2* und *ephrin-B1* vorliegt.

Abhängig von der Effektstärke des Einflusses von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin* vermittelte Repulsion wäre es möglich, dass das stöchiometrische Verhältnis von *Nephrin* und *Eph-ephrin*-Molekülen von Bedeutung ist. Im Rahmen einer Dosis-Wirkungsbeziehung könnte überprüft werden, ob bei einer Steigerung der Konzentration des für die Stimulation verwendeten *Nephrins* ein Einfluss auf die Repulsion aufzeigbar ist.

### 4.3 Transendozytose von *Eph-B2* und *ephrin-B1*

Die bidirektionale Signaltransduktion bei *Eph-ephrin*-Interaktionen führt zur Trans-Endozytose von Rezeptor und Ligand und zur kontakt-abhängigen Repulsion (Zimmer et al., 2003, Marston et al., 2003, Pitulescu and Adams, 2010). Sowohl die Transendozytose als auch die folgende Repulsion werden durch Rac1 und Cbl1 vermittelt (Marston et al., 2003). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe waren humane Podozyten stabil mit dem *Eph-B2-YFP*- bzw. dem *ephrin-B1-CFP*-Fusionsprotein transduziert worden. Die *Eph-B2* exprimierenden Podozyten zeigten somit eine gelbe Fluoreszenz und die *ephrin-B1* exprimierenden Podozyten eine blaue Fluoreszenz. In unserer Untersuchung zeigte sich nach Kontakt zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimieren-

den Zellen die Verschiebung von Fluoreszenz in die gegenüberliegende Zelle. Da Rezeptor und Ligand jeweils ein Fusionskonstrukt mit dem fluoreszierenden Protein bilden, werteten wir dies als Transendozytose. Unsere Ergebnisse unterstreichen somit die zuvor veröffentlichten Ergebnisse zur Transendozytose von *Eph*-Rezeptoren nach Interaktion mit ihrem *ephrin*-Liganden (Zimmer et al., 2003, Marston et al., 2003, Pitulescu and Adams, 2010). In murinen Podozyten konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem *ephrin-B1*-Liganden den durch *Eph-B2* vermittelten stabilisierenden Effekt auf *Nephrin* reduziert (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation). Eine Inhibition der *Eph-B2*-Transendozytose führt zur Verzögerung der Zell-Repulsion (Zimmer et al., 2003). In weiteren Versuchen könnte untersucht werden, ob die Richtung der Transendozytose Einfluss auf die Interaktion von *Eph-B2* und *ephrin-B1* hat. Wenn die Inhibition der *Eph-B2*-Transendozytose die Zell-Repulsion verzögert, wäre es denkbar, dass *ephrin-B1* diese verstärkt. Dies könnte analog zur von Zimmer und Marston durchgeführten Inhibition der *Eph-B2* Transendozytose durch Inhibition der *ephrin-B1*-Transendozytose überprüft werden.

Die Transendozytose ist darüber hinaus beim auf regulatorischen T-Zellen exprimierten *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)* beschrieben. Durch Transendozytose seiner beiden Liganden (CD80 und CD86) wird die Co-Stimulation von CD28 unterdrückt. Hierdurch inhibiert *CTLA-4* die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen (Hou et al., 2015). *CTLA-4*-Mutationen führen zu einem *Immun Dysregulation Syndrom* (Schubert et al., 2014). *CTLA-4* wird ebenfalls eine Bedeutung bei der Remissionsinduktion eines idiopathischen Nephrotischen Syndroms zugeschrieben (Tsuji et al., 2017). Die Transendozytose scheint somit eine Möglichkeit für Zelloberflächen-Rezeptoren zur Regulierung ihrer Interaktion mit benachbarten Zellen zu sein.

#### **4.4 Funktionelle Bedeutung der Interaktion der *Eph*-Rezeptoren mit *Nephrin***

Für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran ist die Interaktion zwischen benachbarten Podozyten von großer Bedeutung. Bereits der Verlust einzelner Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran führt zur Schädigung des glomerulären Filters (Donoviel et al., 2001, Kestila et al., 1998). Die Proteine der glomerulären Schlitzmembran regulieren dabei die Zell-Polarität, die Organisation des podozytären



Zytoskeletts und das Überleben der Podozyten (Huber and Benzing, 2005). *Nephrin* ist Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran. Die homophilen und heterophilen Interaktionen von *Nephrin* und *Nephl* fixieren diese (Barletta et al., 2003, Gerke et al., 2003). Hierdurch wird eine Adhäsion zwischen benachbarten podozytären Fußfortsätzen geschaffen, die für die Integrität des Filters essentiell ist. Der Verlust von *Nephrin* führt zu einem podozytären *Effacement*, bei dem sich die Verzweigung der podozytären Fortsätze verringert und die Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran gestört ist (Topham et al., 1999). *Eph*-Rezeptoren vermitteln während der embryonalen Entwicklung des Zentralen Nervensystems durch gradienten-abhängige Adhäsionen und Repulsionen ein *Neural Guiding* zur topographischen Anordnung von Nervenzellen (Triplett and Feldheim, 2012, Feldheim and O'Leary, 2010, Pasquale, 2008). *Ephrin-B1* ist im sich entwickelnden Glomerulum von Ratten bereits im Stadium des s-shaped-body zu finden, wohingegen der Nachweis von *Nephrin* erst im capillary-loop-stage zu finden ist (Fukusumi et al., 2018).

Analog zur Funktion der *Eph*-Rezeptoren im sich entwickelnden Nervensystem scheint es plausibel, dass sie auch im sich entwickelnden Glomerulum an der Positionierung von Podozyten beteiligt sind. Eine stabile glomeruläre Schlitzmembran kann sich nur ausbilden, wenn die Podozyten und damit ihre sekundären Fußfortsätze zueinander korrekt positioniert sind (Donoviel et al., 2001, Kestila et al., 1998).

Im adulten Glomerulum ist die ausgebildete Schlitzmembran dabei nicht statisch, sondern befindet sich in einem dynamischen Prozess, in dem sie sich wechselnden Anforderungen anpasst (Benzing, 2004, Huber and Benzing, 2005, Tryggvason et al., 2006). Das 2006 von Quack et al. entwickelte Modell der dynamischen Regulation der glomerulären Schlitzmembran zeigt *Nephrin*, das als Sensor für den Zustand der glomerulären Schlitzmembran agiert. Bei intakter Schlitzmembran bindet *Nephrin* extrazellulär mit *NEPH1* oder *Nephrinen* von gegenüberliegenden Zellen (Quack et al., 2006). Der Tyrosinphosphorylierungszustand von *Nephrin* ist dabei über die Interaktion mit intrazellulären Adapterproteinen wie *NCK* entscheidend für die Funktion der glomerulären Schlitzmembran (Jones et al., 2006, Jones et al., 2009, New et al., 2013). Bleiben die extrazellulären Interaktionen aus, kommt es zur Dephosphorylierung der *NCK*-Bindungsstellen und in der Folge zur  $\beta$ -arrestin2 vermittelten Endozytose von *Nephrin*

(Quack et al., 2006). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass *Eph-B2* die *Nephrin* Tyrosinphosphorylierung an den *NCK*-Bindungsstellen verstärkt (Dr. Königshausen, persönliche Kommunikation).

Bei podozytärer Schädigung kommt es zu einer verstärkten Phosphorylierung von *ephrin-B1* (Fukusumi et al., 2018). Die Phosphorylierung von *ephrin-B1* fördert die Phosphorylierung von C-Jun-N-terminalen Kinasen (*JNK*), die für die *ephrin-B1* vermittelte Zell-Motilität benötigt wird. Eine verstärkte Phosphorylierung der *JNK* weist auf podozytäre Schädigung hin, denn sie ist verstärkt als Reaktion auf zellulären Stress und ist somit von großer Bedeutung bei Zelltod und Entzündungsprozessen (Yu et al., 2014). Die Aktivierung des *JNK Signalings* ist dabei in den meisten Formen humaner Nierenschädigung zu finden sowohl in glomerulären wie auch in tubulären Zellen (de Borst et al., 2007, de Borst et al., 2009). Ähnliche Muster der *JNK*-Aktivierung sind in Tiermodellen akuter und chronischer Nierenschädigung zu finden (Ma et al., 2007, Flanc et al., 2007). In den Glomeruli von konditionierten *ephrin-B1-Knockout*-Mäusen zeigt sich keine verstärkte Phosphorylierung der *JNK* (Fukusumi et al., 2018). Fukusumi et al. konnten zeigen, dass phosphoryliertes *ephrin-B1* die Tyrosinphosphorylierung von *Nephrin* verstärkt. Aufgrund des Fehlens einer Kinase-Domäne kann *ephrin-B1* diese Tyrosinphosphorylierung nur über *downstream*-Effektoren vermitteln. Es ist beschrieben, dass es nach Bindung mit einem *Eph*-Rezeptor zur *ephrin-B*-Phosphorylierung durch *Src*-Kinasen kommt (Cowan and Henkemeyer, 2001, Palmer et al., 2002). Dies schafft Bindungsstellen für die SH2-Domänen von Signal-Proteinen, die dann wiederum mit ihrer Kinasefunktion tyrosinphosphorylieren können. Die hieraus resultierende erhöhte Tyrosinphosphorylierung von *Nephrin* verstärkt seine Verankerung in der Schlitzmembran. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei podozytärer Schädigung über die verstärkte Phosphorylierung von *ephrin-B1* *Nephrin* in der Schlitzmembran stabilisiert wird. Bei Verletzungen des Zentralen Nervensystems kommt es zur verstärkten Expression von *Eph*-Rezeptoren und ihren *ephrin*-Liganden, sie sind dabei am Wachstum von Axonen, zellulärem *Remodelling* und Narbenbildung beteiligt (Du et al., 2007). Wnuk et al. konnten zeigen, dass *Eph-B4* eine protektive Rolle bei der mesangiolytischen Thy-1.1-Nephritis in Ratten hat. Die Inhibition von *Eph-B4* führt bei der mesangiolytischen Thy-1.1-Nephritis zum Verlust und zur Schädigung von Podozyten, Albuminurie und behindert die Regeneration der mesangialen Zellen. Die Autoren ver-

muten, dass der *Eph-B4*-Rezeptor auf mechanischen Stress des Podozyten reagiert (Wnuk et al., 2012).

In der humanen Niere ist eine erhöhte Expression von *Eph*-Rezeptoren und ihren *ephrin*-Liganden bislang nicht beschrieben. Ziel weiterer Untersuchungen könnte es sein zu überprüfen, ob podozytäre Schädigung ebenfalls zur vermehrten Expression von *Eph*-Rezeptoren führt.

Rodriguez-Franco et al. konnten zeigen, dass an der Formation und Aufrechterhaltung von zellulären Grenzflächen neben den beschriebenen lokalen subzellulären Mechanismen auch langwährende mechanische Prozesse beteiligt sind. Hierbei wurde die Formation von repulsiven epithelialen Grenzflächen, von denen die eine *Eph-B2* und die andere *ephrin-B1* exprimiert, analysiert. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer permanenten Trennung der beiden Zellgruppen durch adhäsive Zellverbindungen, die entgegen der Grenzfläche gerichtet waren (Rodriguez-Franco et al., 2017). Der beschriebene Mechanismus ist bislang in MDCK-Zellen (canine Tubulus-Epithelzellen) untersucht worden. Dass dieser Mechanismus auch in Podozyten (viszerale Epithelzellen) von Bedeutung ist, scheint nicht abwegig. Analog zum Vorgehen von Rodriguez-Franco et al. könnte dies auch für humane Podozyten untersucht werden. Ein Fußfortsatz-*Effacement* durch zu starke Adhäsion zwischen Podozyten könnte auf diese Weise unterbunden werden. Diese These wird dadurch unterstützt, dass der Podozyten-spezifische *Knockout* von *ephrin-B1* in Mäusen zu einem Fußfortsatz-*Effacement* mit Proteinurie führt. Der *Knockout* führte ebenfalls zu einem veränderten Expressionsmuster von *Nephrin*, *NEPH1* und anderen podozytären Markern, jedoch nicht zu einer veränderten Menge der Proteine (Fukusumi et al., 2018). Dies zeigt noch einmal, dass die Interaktion von *Eph-B2* und *ephrin-B1* von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran sein könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Interaktion von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* zu einer erhöhten und verlängerten Adhäsion von humanen Podozyten führt. Hieraus resultiert, dass die korrekte Interaktion von *Nephrin* mit den *Eph*-Rezeptoren entscheidend für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran sein könnte.

#### 4.5 Limitationen der Arbeit

In einer Zellkultur-Untersuchung kann immer nur ein zweidimensionales Modell des sonst dreidimensionalen Glomerulums erschaffen werden. Hinzu kommt, dass die humanen Podozyten in der Zellkultur zwar die Proteine der glomerulären Schlitzmembran in geringer Menge exprimieren, aber die *in vivo* bestehende Interaktion zur glomerulären Basalmembran nicht abgebildet werden kann. Die basale Zellmembran der Podozyten ist über ein Netz aus verschiedenen Adhäsionsproteinen in der glomerulären Basalmembran verankert (Kerjaschki, 2001). Das Alport-Syndrom und das Pierson-Syndrom, jeweils mit Veränderungen der glomerulären Basalmembran, zeigen nephrotische Krankheitsbilder mit Fußfortsatz-*Effacement* und mangelnder Ausbildung der Schlitzmembran. Dies zeigt, dass eine intakte Verbindung der Podozyten zur glomerulären Basalmembran essentiell für die Ausbildung einer intakten podozytären Schlitzmembran ist (Mochizuki et al., 1994, Barker et al., 1990, Chew and Lennon, 2018, Zenker et al., 2004). Somit fehlt im Modell immer ein wichtiger Bestandteil des glomerulären Filters. Zudem wird eine glomeruläre Schlitzmembran auch bei konfluenten Podozyten nicht ausgebildet. Leider sind bis heute keine anderen 3-D-Modellsysteme etabliert, die eine *in vitro*-Untersuchung des Glomerulums ermöglichen.

In unseren Untersuchungen exprimierten ausdifferenzierte humane Podozyten den *Eph-B2*-Rezeptor bzw. den *ephrin-B1*-Liganden. Die podozytäre Interaktion wurde durch Hinzugabe von extrazellulärem *Nephrin* und *Nephrin*-Fragmenten im *Live Cell Imaging* stimuliert und für weitere 660 min beobachtet. Die podozytären Interaktionen wurden standardisiert und randomisiert analysiert. Die Auswertung erfolgte jedoch ohne Zuhilfenahme von Software, da aufgrund des geringen Fluoreszenzmusters der Zellen eine Software gestützte automatisierte Zell-Erkennung nicht möglich war. Ziel weiterer Untersuchungen sollte es sein, die Interaktionen automatisiert auszuwerten, um weitere und noch präzisere Messparameter zu erhalten. Dies wäre möglich, indem die Fluoreszenzkraft der Podozyten erhöht würde. Darüber hinaus bestünde die Möglichkeit, mittels eines Live Zell Analyse Systems (z.B. IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System der Firma Sartorius) eine größere Anzahl von Zellinteraktionen parallel zu beobachten und diese dann automatisiert auszuwerten. In unseren Untersuchungen war es aus technischen Gründen lediglich möglich, einen Bildausschnitt im zeitlichen Verlauf zu be-

obachten. Das bereits erwähnte Live Zell Analyse System würde die Möglichkeit bieten, parallel eine Vielzahl von Bildausschnitten zu beobachten. Hierdurch würde sich die Anzahl der sichtbaren podozytären Interaktionen um ein Vielfaches erhöhen. Der Auswahl des Bildausschnitts im *Live Cell Imaging* kommt in unseren Untersuchungen eine große Bedeutung zu. Durch eine automatisierte Erfassung vieler Bildausschnitte parallel würde sich ein möglicher Auswahlbias verhindern lassen. Ebenfalls könnte somit parallel die Stimulation mit extrazellulärem *Nephrin* und den *Nephrin*-Fragmenten z.B. in mehreren Kammern einer 6-well-Platte erfolgen, sodass alle Podozyten exakt den gleichen Bedingungen ausgesetzt sind, was bei einer sequentiellen Versuchsanordnung nur bedingt möglich ist.

### 4.6 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit konnte den Einfluss von *Nephrin* auf die *Eph-ephrin* vermittelte Interaktion humaner Podozyten im *Live Cell Imaging* aufzeigen. Die Simulation mit extrazellulärem *Nephrin* verlängert die Adhäsion zwischen *Eph-B2* und *ephrin-B1* exprimierenden humanen Podozyten. Ebenfalls kommt es zu einem späteren Beginn und späteren Ende der Adhäsionen. Zum Zeitpunkt 600 min kommt es zu vermehrter Adhäsion. Dieser Effekt wird von den Immunglobulindomänen *Nephrin* Ig 1–4 vermittelt. Ein Einfluss des gesamten extrazellulären *Nephrins* konnte nicht gezeigt werden, dies gilt es in weiteren Untersuchungen zu validieren. Die in dieser Untersuchung identifizierte Interaktionsstelle von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* steht im Widerspruch zu den von Fukusumi veröffentlichten Untersuchungen zur Interaktion von *Nephrin* und *ephrin-B1* (Fukusumi et al., 2018). Weitere Versuchsreihen sollten die Interaktionsstelle überprüfen und spezifizieren, ob diese für *Eph-B2* und *ephrin-B1* identisch ist. Es konnte kein Einfluss von *Nephrin* und seinen *Truncations* auf die *Eph-ephrin*-vermittelte Repulsion humaner Podozyten gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Interaktion von *Nephrin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* vermehrte und längere Adhäsionen im *Live Cell Imaging* zwischen humanen Podozyten stattfinden. Dies könnte *in vivo* eine Stabilisierung der Podozyten und der glomerulären Schlitzmembran im Glomerulum bedingen. Die Interaktion von *Neph-*

*rin* mit *Eph-B2* und *ephrin-B1* scheint damit für die Aufrechterhaltung einer korrekten Filterfunktion des Glomerulums von Bedeutung zu sein.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- AGRAWAL, V., MARINESCU, V., AGARWAL, M. & MCCULLOUGH, P. A. 2009. Cardiovascular implications of proteinuria: an indicator of chronic kidney disease. *Nat Rev Cardiol*, 6, 301–11.
- AHVENAINEN, E. K., HALLMAN, N. & HJELT, L. 1956. Nephrotic syndrome in newborn and young infants. *Ann Paediatr Fenn*, 2, 227–41.
- ANDREWS, P. M. 1981. Investigations of cytoplasmic contractile and cytoskeletal elements in the kidney glomerulus. *Kidney Int*, 20, 549–62.
- ARAKAWA, M. 1971. A scanning electron microscope study of the human glomerulus. *Am J Pathol*, 64, 457–66.
- ARKILL, K. P., QVORTRUP, K., STARBORG, T., MANTELL, J. M., KNUPP, C., MICHEL, C. C., HARPER, S. J., SALMON, A. H., SQUIRE, J. M., BATES, D. O. & NEAL, C. R. 2014. Resolution of the three dimensional structure of components of the glomerular filtration barrier. *BMC Nephrol*, 15, 24.
- ARVANITIS, D. & DAVY, A. 2008. Eph/ephrin signaling: networks. *Genes Dev*, 22, 416–29.
- ASANUMA, K. 2015. The role of podocyte injury in chronic kidney disease. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 38, 26–36.
- ASANUMA, K. & MUNDEL, P. 2003. The role of podocytes in glomerular pathobiology. *Clin Exp Nephrol*, 7, 255–9.
- AUMÜLLER, G. 2010. *Anatomie*, Stuttgart: Thieme.
- BARKER, D. F., HOSTIKKA, S. L., ZHOU, J., CHOW, L. T., OLIPHANT, A. R., GERKEN, S. C., GREGORY, M. C., SKOLNICK, M. H., ATKIN, C. L. & TRYGGVASON, K. 1990. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*, 248, 1224–7.
- BARLETTA, G. M., KOVARI, I. A., VERMA, R. K., KERJASCHKI, D. & HOLZMAN, L. B. 2003. Nephrlin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem*, 278, 19266–71.
- BARTLEY, T. D., HUNT, R. W., WELCHER, A. A., BOYLE, W. J., PARKER, V. P., LINDBERG, R. A., LU, H. S., COLOMBERO, A. M., ELLIOTT, R. L., GUTHRIE, B. A. & ET AL. 1994. B61 is a ligand for the ECK receptor protein-tyrosine kinase. *Nature*, 368, 558–60.
- BATLLE, E., HENDERSON, J. T., BEGHTEL, H., VAN DEN BORN, M. M., SANCHO, E., HULS, G., MEELDIJK, J., ROBERTSON, J., VAN DE WETERING, M., PAWSON, T. & CLEVERS, H. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell*, 111, 251–63.
- BENZING, T. 2004. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1382–91.
- BERG JM, T. J., STRYER L. 2002. *Biochemistry*. 5th Edition. New York.
- BINNS, K. L., TAYLOR, P. P., SICHERI, F., PAWSON, T. & HOLLAND, S. J. 2000. Phosphorylation of tyrosine residues in the kinase domain and juxtamembrane region regulates the biological and catalytic activities of Eph receptors. *Mol Cell Biol*, 20, 4791–805.
- BORZA, D. B. 2016. Glomerular basement membrane heparan sulfate in health and disease: A regulator of local complement activation. *Matrix Biol*, 1–12.

- BOUTE, N., GRIBOUVAL, O., ROSELLI, S., BENESSY, F., LEE, H., FUCHSHUBER, A., DAHAN, K., GUBLER, M. C., NIAUDET, P. & ANTIGNAC, C. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24, 349–54.
- BRAUN, N., GRONE, H. J. & SCHENA, F. P. 2009. Immunological and non-immunological mechanisms of proteinuria. *Minerva Urol Nefrol*, 61, 385–96.
- BUSH, J. O. & SORIANO, P. 2010. Ephrin-B1 forward signaling regulates craniofacial morphogenesis by controlling cell proliferation across Eph-ephrin boundaries. *Genes Dev*, 24, 2068–80.
- CHEW, C. & LENNON, R. 2018. Basement Membrane Defects in Genetic Kidney Diseases. *Front Pediatr*, 6, 1–11.
- CHOTHIA, C. & JONES, E. Y. 1997. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem*, 66, 823–62.
- CIANI, L., PATEL, A., ALLEN, N. D. & FFRENCH-CONSTANT, C. 2003. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol*, 23, 3575–82.
- CLELAND, W. W. 1964. Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry*, 3, 480–2.
- CLEVERS, H. & BATLLE, E. 2006. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66, 2–5.
- COLEMAN, J., INUKAI, M. & INOUE, M. 1985. Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane. *Cell*, 43, 351–60.
- CORESH, J., SELVIN, E., STEVENS, L. A., MANZI, J., KUSEK, J. W., EGGERS, P., VAN LENTE, F. & LEVEY, A. S. 2007. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Jama*, 298, 2038–47.
- COWAN, C. A. & HENKEMEYER, M. 2001. The SH2/SH3 adaptor Grb4 transduces B-ephrin reverse signals. *Nature*, 413, 174–9.
- CURRIE, G. & DELLES, C. 2013. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 7, 13–24.
- DEEN, W. M., LAZZARA, M. J. & MYERS, B. D. 2001. Structural determinants of glomerular permeability. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281, F579–96.
- 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. & POWELL, D. R. 2001. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol*, 21, 4829–36.
- DOUBLIER, S., SALVIDIO, G., LUPIA, E., RUOTSALAINEN, V., VERZOLA, D., DEFERRARI, G. & CAMUSSI, G. 2003. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes*, 52, 1023–30.
- DRENCKHAHN, D. & FRANKE, R. P. 1988. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat and man. *Lab Invest*, 59, 673–82.
- DRUMOND, M. C. & DEEN, W. M. 1994. Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. *Am J Physiol*, 266, 1–12.



- DU, J., FU, C. & SRETAVAN, D. W. 2007. Eph/ephrin signaling as a potential therapeutic target after central nervous system injury. *Curr Pharm Des*, 13, 2507–18.
- DUDANOVA, I. & KLEIN, R. 2011. The Axon's Balancing Act: cis- and trans-Interactions between Ephs and Ephrins. *Neuron*, 71, 1–3.
- EGEA, J. & KLEIN, R. 2007. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol*, 17, 230–8.
- ETTINGER, A. & WITTMANN, T. 2014. Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol*, 123, 77–94.
- FALIVELLI, G., LISABETH, E. M., DE LA TORRE, E. R., PEREZ-TENORIO, G., TOSATO, G., SALVUCCI, O. & PASQUALE, E. B. 2013. Attenuation of Eph Receptor Kinase Activation in Cancer Cells by Coexpressed Ephrin Ligands. *PLOS ONE*, 8, e81445.
- FASEN, K., CERRETTI, D. P. & HUYNH-DO, U. 2008. Ligand binding induces Cbl-dependent EphB1 receptor degradation through the lysosomal pathway. *Traffic*, 9, 251–66.
- FAUL, C., ASANUMA, K., YANAGIDA-ASANUMA, E., KIM, K. & MUNDEL, P. 2007. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*, 17, 428–37.
- FELDHEIM, D. A. & O'LEARY, D. D. 2010. Visual map development: bidirectional signaling, bifunctional guidance molecules and competition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a001768.
- FLANC, R. S., MA, F. Y., TESCH, G. H., HAN, Y., ATKINS, R. C., BENNETT, B. L., FRIEDMAN, G. C., FAN, J. H. & NIKOLIC-PATERSON, D. J. 2007. A pathogenic role for JNK signaling in experimental anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int*, 72, 698–708.
- FRIES, J. W., SANDSTROM, D. J., MEYER, T. W. & RENNKE, H. G. 1989. Glomerular hypertrophy and epithelial cell injury modulate progressive glomerulosclerosis in the rat. *Lab Invest*, 60, 205–18.
- FUKUSUMI, Y., ZHANG, Y., YAMAGISHI, R., ODA, K., WATANABE, T., MATSUI, K. & KAWACHI, H. 2018. Nephrin-Binding Ephrin-B1 at the Slit Diaphragm Controls Podocyte Function through the JNK Pathway. *J Am Soc Nephrol*, 29, 1462–74.
- FURNESS, P. N., HALL, L. L., SHAW, J. A. & PRINGLE, J. H. 1999. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant*, 14, 1234–7.
- GAO, W. Q., SHINSKY, N., ARMANINI, M. P., MORAN, P., ZHENG, J. L., MENDOZA-RAMIREZ, J. L., PHILLIPS, H. S., WINSLOW, J. W. & CARAS, I. W. 1998. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by the tyrosine kinase receptor, REK7/EphA5, and its ligand, AL-1/Ephrin-A5. *Mol Cell Neurosci*, 11, 247–59.
- GEORGAKOPOULOS, A., LITTERST, C., GHERSI, E., BAKI, L., XU, C., SERBAN, G. & ROBAKIS, N. K. 2006. Metalloproteinase/Presenilin1 processing of ephrinB regulates EphB-induced Src phosphorylation and signaling. *Embo j*, 25, 1242–52.
- GERKE, P., HUBER, T. B., SELLIN, L., BENZING, T. & WALZ, G. 2003. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*, 14, 918–26.

- GERKE, P., SELLIN, L., KRETZ, O., PETRASCHKA, D., ZENTGRAF, H., BENZING, T. & WALZ, G. 2005. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol*, 16, 1693–702.
- GRAHAMMER, F., WIGGE, C., SCHELL, C., KRETZ, O., PATRAKKA, J., SCHNEIDER, S., KLOSE, M., KIND, J., ARNOLD, S. J., HABERMANN, A., BRÄUNIGER, R., RINSCHEN, M. M., VÖLKER, L., BREGENZER, A., RUBBENSTROTH, D., BOERRIES, M., KERJASCHKI, D., MINER, J. H., WALZ, G., BENZING, T., FORNONI, A., FRANGAKIS, A. S. & HUBER, T. B. 2017. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight*, 1.
- GRIFFITHS AJF, G. W., MILLER JH, ET AL. 1999. Modern Genetic Analysis. New York.
- HAFNER, C., SCHMITZ, G., MEYER, S., BATAILLE, F., HAU, P., LANGMANN, T., DIETMAIER, W., LANDTHALER, M. & VOGT, T. 2004. Differential gene expression of Eph receptors and ephrins in benign human tissues and cancers. *Clin Chem*, 50, 490–9.
- HALLAN, S. I., CORESH, J., ASTOR, B. C., ASBERG, A., POWE, N. R., ROMUNDSTAD, S., HALLAN, H. A., LYDERSEN, S. & HOLMEN, J. 2006. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2275–84.
- HALLMAN, N., NORIO, R. & RAPOLA, J. 1973. Congenital nephrotic syndrome. *Nephron*, 11, 101–10.
- HARALDSSON, B. & SORENSSON, J. 2004. Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. *News Physiol Sci*, 19, 7–10.
- HARTLEBEN, B., WIDMEIER, E., SUHM, M., WORTHMANN, K., SCHELL, C., HELMSTÄDTER, M., WIECH, T., WALZ, G., LEITGES, M., SCHIFFER, M. & HUBER, T. B. 2013. aPKC $\lambda$ 1 and aPKC $\zeta$  Contribute to Podocyte Differentiation and Glomerular Maturation. *J Am Soc Nephrol*, 24, 253–267.
- HASHIMOTO, T., KARASAWA, T., SAITO, A., MIYAUCHI, N., HAN, G. D., HAYASAKA, K., SHIMIZU, F. & KAWACHI, H. 2007. Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney Int*, 72, 954–64.
- HATTORI, M., OSTERFIELD, M. & FLANAGAN, J. G. 2000. Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science*, 289, 1360–5.
- HEASMAN, S. J. & RIDLEY, A. J. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 690–701.
- HELD, W. & MARIUZZA, R. A. 2011. Cis-trans interactions of cell surface receptors: biological roles and structural basis. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3469–78.
- HIMANEN, J. P., HENKEMEYER, M. & NIKOLOV, D. B. 1998. Crystal structure of the ligand-binding domain of the receptor tyrosine kinase EphB2. *Nature*, 396, 486–91.
- HIMANEN, J. P., RAJASHANKAR, K. R., LACKMANN, M., COWAN, C. A., HENKEMEYER, M. & NIKOLOV, D. B. 2001. Crystal structure of an Eph receptor-ephrin complex. *Nature*, 414, 933–8.
- HIMANEN, J. P., SAHA, N. & NIKOLOV, D. B. 2007. Cell-cell signaling via Eph receptors and ephrins. *Curr Opin Cell Biol*, 19, 534–42.

- HIMANEN, J. P., YERMEKBAYEVA, L., JANES, P. W., WALKER, J. R., XU, K., ATAPATTU, L., RAJASHANKAR, K. R., MENSINGA, A., LACKMANN, M., NIKOLOV, D. B. & DHE-PAGANON, S. 2010. Architecture of Eph receptor clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 10860–5.
- HIRAI, H., MARU, Y., HAGIWARA, K., NISHIDA, J. & TAKAKU, F. 1987. A novel putative tyrosine kinase receptor encoded by the eph gene. *Science*, 238, 1717–20.
- HOLZMAN, L. B., ST JOHN, P. L., KOVARI, I. A., VERMA, R., HOLTHOFER, H. & ABRAHAMSON, D. R. 1999. Nephrin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int*, 56, 1481–91.
- HOU, T. Z., QURESHI, O. S., WANG, C. J., BAKER, J., YOUNG, S. P., WALKER, L. S. & SANSOM, D. M. 2015. A transendocytosis model of CTLA-4 function predicts its suppressive behavior on regulatory T cells. *J Immunol*, 194, 2148–59.
- HUANG, T. W. & LANGLOIS, J. C. 1985. Podoendin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *J Exp Med*, 162, 245–67.
- HUBER, T. B. & BENZING, T. 2005. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14, 211–6.
- HUBER, T. B., HARTLEBEN, B., WINKELMANN, K., SCHNEIDER, L., BECKER, J. U., LEITGES, M., WALZ, G., HALLER, H. & SCHIFFER, M. 2009. Loss of Podocyte aPKC $\mu$  Causes Polarity Defects and Nephrotic Syndrome. *J Am Soc Nephrol*, 20, 798–806.
- HUBER, T. B., KOTTGEN, M., SCHILLING, B., WALZ, G. & BENZING, T. 2001. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem*, 276, 41543–6.
- HUBER, T. B., SIMONS, M., HARTLEBEN, B., SERNETZ, L., SCHMIDTS, M., GUNDLACH, E., SALEEM, M. A., WALZ, G. & BENZING, T. 2003. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*, 12, 3397–405.
- HUTTUNEN, N. P. 1976. Congenital nephrotic syndrome of Finnish type. Study of 75 patients. *Arch Dis Child*, 51, 344–8.
- IRETON, R. C. & CHEN, J. 2005. EphA2 receptor tyrosine kinase as a promising target for cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets*, 5, 149–57.
- ITOH, M., NAKADATE, K., HORIBATA, Y., MATSUSAKA, T., XU, J., HUNZIKER, W. & SUGIMOTO, H. 2014. The structural and functional organization of the podocyte filtration slits is regulated by Tjp1/ZO-1. *PLoS One*, 9, e106621.
- JANES, P. W., GRISSHABER, B., ATAPATTU, L., NIEVERGALL, E., HIL, L. L., MENSINGA, A., CHHEANG, C., DAY, B. W., BOYD, A. W., BASTIAENS, P. I., JORGENSEN, C., PAWSON, T. & LACKMANN, M. 2011. Eph receptor function is modulated by heterooligomerization of A and B type Eph receptors. *J Cell Biol*, 195, 1033–45.
- JEANSSON, M. & HARALDSSON, B. 2003. Glomerular size and charge selectivity in the mouse after exposure to glucosaminoglycan-degrading enzymes. *J Am Soc Nephrol*, 14, 1756–65.

- JEANSSON, M. & HARALDSSON, B. 2006. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290, F111–6.
- JEFFERSON, J. A., ALPERS, C. E. & SHANKLAND, S. J. 2011. Podocyte Biology for the Bedside. *American Journal of Kidney Diseases*, 58, 835–845.
- JONES, N., BLASUTIG, I. M., EREMINA, V., RUSTON, J. M., BLADT, F., LI, H., HUANG, H., LAROSE, L., LI, S. S., TAKANO, T., QUAGGIN, S. E. & PAWSON, T. 2006. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*, 440, 818–23.
- JONES, N., NEW, L. A., FORTINO, M. A., EREMINA, V., RUSTON, J., BLASUTIG, I. M., AOUJIT, L., ZOU, Y., LIU, X., YU, G. L., TAKANO, T., QUAGGIN, S. E. & PAWSON, T. 2009. Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1533–43.
- KERJASCHKI, D. 2001. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *J Clin Invest*, 108, 1583–7.
- KERJASCHKI, D., SHARKEY, D. J. & FARQUHAR, M. G. 1984. Identification and characterization of podocalyxin-the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol*, 98, 1591–6.
- 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. & TRYGGVASON, K. 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein nephrin is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1, 575–82.
- KESTILA, M., MANNIKKO, M., HOLMBERG, C., GYAPAY, G., WEISSENBACH, J., SAVOLAINEN, E. R., PELTONEN, L. & TRYGGVASON, K. 1994. Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19. *Am J Hum Genet*, 54, 757–64.
- KHOSHNOODI, J., SIGMUNDSSON, K., OFVERSTEDT, L. G., SKOGLUND, U., OBRINK, B., WARTIOVAARA, J. & TRYGGVASON, K. 2003. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol*, 163, 2337–46.
- KHOSHNOODI, J. & TRYGGVASON, K. 2001. Unraveling the molecular make-up of the glomerular podocyte slit diaphragm. *Exp Nephrol*, 9, 355–9.
- KIDA, Y. S., SATO, T., MIYASAKA, K. Y., SUTO, A. & OGURA, T. 2007. Daam1 regulates the endocytosis of EphB during the convergent extension of the zebrafish notochord. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6708–13.
- KONSTANTINOVA, I., NIKOLOVA, G., OHARA-IMAIZUMI, M., MEDA, P., KUCERA, T., ZARBALIS, K., WURST, W., NAGAMATSU, S. & LAMMERT, E. 2007. EphA-Ephrin-A-mediated beta cell communication regulates insulin secretion from pancreatic islets. *Cell*, 129, 359–70.
- KREIDBERG, J. A., DONOVAN, M. J., GOLDSTEIN, S. L., RENNKE, H., SHEPHERD, K., JONES, R. C. & JAENISCH, R. 1996. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*, 122, 3537–47.
- KRETZLER, M., KOEPPEN-HAGEMANN, I. & KRIZ, W. 1994. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the

- uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Arch*, 425, 181–93.
- KRICKA, L. J. 1991. Chemiluminescent and bioluminescent techniques. *Clin Chem*, 37, 1472–81.
- KULLANDER, K. & KLEIN, R. 2002. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 475–86.
- KURIHARA, H., ANDERSON, J. M. & FARQUHAR, M. G. 1995. Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modification of tight junctions between glomerular foot processes. *Am J Physiol*, 268, F514–24.
- LABRADOR, J. P., BRAMBILLA, R. & KLEIN, R. 1997. The N-terminal globular domain of Eph receptors is sufficient for ligand binding and receptor signaling. *Embo j*, 16, 3889–97.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–5.
- LAHDENKARI, A. T., LOUNATMAA, K., PATRAKKA, J., HOLMBERG, C., WARTIOVAARA, J., KESTILA, M., KOSKIMIES, O. & JALANKO, H. 2004. Podocytes are firmly attached to glomerular basement membrane in kidneys with heavy proteinuria. *J Am Soc Nephrol*, 15, 2611–8.
- LARSEN, A. B., PEDERSEN, M. W., STOCKHAUSEN, M. T., GRANDAL, M. V., VAN DEURS, B. & POULSEN, H. S. 2007. Activation of the EGFR gene target EphA2 inhibits epidermal growth factor-induced cancer cell motility. *Mol Cancer Res*, 5, 283–93.
- LENNON, R., RANGLES, M. J. & HUMPHRIES, M. J. 2014. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5, 160.
- LEVEY, A. S., ATKINS, R., CORESH, J., COHEN, E. P., COLLINS, A. J., ECKARDT, K. U., NAHAS, M. E., JABER, B. L., JADOUL, M., LEVIN, A., POWE, N. R., ROSSERT, J., WHEELER, D. C., LAMEIRE, N. & EKNOYAN, G. 2007. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int*, 72, 247–59.
- LIN, D., GISH, G. D., SONGYANG, Z. & PAWSON, T. 1999. The carboxyl terminus of B class ephrins constitutes a PDZ domain binding motif. *J Biol Chem*, 274, 3726–33.
- LITTERST, C., GEORGAKOPOULOS, A., SHIOI, J., GHERSI, E., WISNIEWSKI, T., WANG, R., LUDWIG, A. & ROBAKIS, N. K. 2007. Ligand binding and calcium influx induce distinct ectodomain/gamma-secretase-processing pathways of EphB2 receptor. *J Biol Chem*, 282, 16155–63.
- MA, F. Y., FLANC, R. S., TESCH, G. H., HAN, Y., ATKINS, R. C., BENNETT, B. L., FRIEDMAN, G. C., FAN, J. H. & NIKOLIC-PATERSON, D. J. 2007. A pathogenic role for c-Jun amino-terminal kinase signaling in renal fibrosis and tubular cell apoptosis. *J Am Soc Nephrol*, 18, 472–84.
- MACRAE, M., NEVE, R. M., RODRIGUEZ-VICIANA, P., HAQQ, C., YEH, J., CHEN, C., GRAY, J. W. & MCCORMICK, F. 2005. A conditional feedback loop regulates Ras activity through EphA2. *Cancer Cell*, 8, 111–118.
- MAHMOOD, T. & YANG, P. C. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *N Am J Med Sci*, 4, 429–34.

- MANN, H. B. & WHITNEY, D. R. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Ann. Math. Statist.*, 18, 50–60.
- MANNIKKO, M., KESTAILA, M., HOLMBERG, C., NORIO, R., RYNNANEN, M., OLSEN, A., PELTONEN, L. & TRYGGVASON, K. 1995. Fine mapping and haplotype analysis of the locus for congenital nephrotic syndrome on chromosome 19q13.1. *Am J Hum Genet*, 57, 1377–83.
- MARSTON, D. J., DICKINSON, S. & NOBES, C. D. 2003. Rac-dependent trans-endocytosis of ephrinBs regulates Eph-ephrin contact repulsion. *Nat Cell Biol*, 5, 879–888.
- MATSUSHITA, K., VAN DER VELDE, M., ASTOR, B. C., WOODWARD, M., LEVEY, A. S., DE JONG, P. E., CORESH, J. & GANSEVOORT, R. T. 2010. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*, 375, 2073–81.
- MC, N. Q. 1947. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika*, 12, 153–7.
- MCGREGOR, L. 1929. The Finer Histology of the Normal Glomerulus. *Am J Pathol*, 5, 545–558.
- MCKAY, M. M. & MORRISON, D. K. 2007. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*, 26, 3113–21.
- MIAO, H., WEI, B. R., PEEHL, D. M., LI, Q., ALEXANDROU, T., SCHELLING, J. R., RHIM, J. S., SEDOR, J. R., BURNETT, E. & WANG, B. 2001. Activation of EphA receptor tyrosine kinase inhibits the Ras/MAPK pathway. *Nat Cell Biol*, 3, 527–30.
- MOCHIZUKI, T., LEMMINK, H. H., MARIYAMA, M., ANTIGNAC, C., GUBLER, M. C., PIRSON, Y., VERELLEN-DUMOULIN, C., CHAN, B., SCHRODER, C. H., SMEETS, H. J. & ET AL. 1994. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet*, 8, 77–81.
- NEW, L. A., KEYVANI CHAHI, A. & JONES, N. 2013. Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins. *J Biol Chem*, 288, 1500–10.
- NGUYEN, Q. T. & LICHTMAN, J. W. 1996. Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 104–12.
- NOREN, N. K., LU, M., FREEMAN, A. L., KOOLPE, M. & PASQUALE, E. B. 2004. Interplay between EphB4 on tumor cells and vascular ephrin-B2 regulates tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 5583–8.
- NORIO, R. 1966. Heredity in the congenital nephrotic syndrome. A genetic study of 57 finnish families with a review of reported cases. *Ann Paediatr Fenn*, 12, Suppl 27:1–94.
- OGAWA, K., WADA, H., OKADA, N., HARADA, I., NAKAJIMA, T., PASQUALE, E. B. & TSUYAMA, S. 2006. EphB2 and ephrin-B1 expressed in the adult kidney regulate the cytoarchitecture of medullary tubule cells through Rho family GTPases. *J Cell Sci*, 119, 559–70.
- PALMEN, T., AHOLA, H., PALGI, J., AALTONEN, P., LUIMULA, P., WANG, S., JAAKKOLA, I., KNIP, M., OTONKOSKI, T. & HOLTHOFER, H. 2001. Nephrin is expressed in the pancreatic beta cells. *Diabetologia*, 44, 1274–80.
- PALMER, A., ZIMMER, M., ERDMANN, K. S., EULENBURG, V., PORTHIN, A., HEUMANN, R., DEUTSCH, U. & KLEIN, R. 2002. EphrinB phosphorylation

- and reverse signaling: regulation by Src kinases and PTP-BL phosphatase. *Mol Cell*, 9, 725–37.
- PASQUALE, E. B. 2005. Eph receptor signalling casts a wide net on cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 462–75.
- PASQUALE, E. B. 2008. Eph-ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell*, 133, 38–52.
- PASQUALE, E. B. 2010. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat Rev Cancer*, 10, 165–80.
- PATRAKKA, J., KESTILA, M., WARTIOVAARA, J., RUOTSALAINEN, V., TISSARI, P., LENKKERI, U., MANNIKKO, M., VISAPAA, I., HOLMBERG, C., RAPOLA, J., TRYGGVASON, K. & JALANKO, H. 2000. Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int*, 58, 972–80.
- PAVENSTADT, H., KRIZ, W. & KRETZLER, M. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 83, 253–307.
- PITULESCU, M. E. & ADAMS, R. H. 2010. Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev*, 24, 2480–92.
- POLIAKOV, A., COTRINA, M. L., PASINI, A. & WILKINSON, D. G. 2008. Regulation of EphB2 activation and cell repulsion by feedback control of the MAPK pathway. *The Journal of Cell Biology*, 183, 933–47.
- PORATH, J., CARLSSON, J., OLSSON, I. & BELFRAGE, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258, 598–9.
- PUTAALA, H., SAINIO, K., SARIOLA, H. & TRYGGVASON, K. 2000. Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *J Am Soc Nephrol*, 11, 991–1001.
- PUTAALA, H., SOININEN, R., KILPELÄINEN, P., WARTIOVAARA, J. & 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. *Human Molecular Genetics*, 10, 1–8.
- QUACK, I., RUMP, L. C., GERKE, P., WALTHER, I., VINKE, T., VONEND, O., GRUNWALD, T. & SELLIN, L. 2006. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14110–5.
- RAATS, C. J., VAN DEN BORN, J., BAKKER, M. A., OPPERS-WALGREEN, B., PISA, B. J., DIJKMAN, H. B., ASSMANN, K. J. & BERDEN, J. H. 2000. Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol*, 156, 1749–65.
- REGELE, H. M., FILLIPOVIC, E., LANGER, B., POCZEWKI, H., KRAXBERGER, I., BITTNER, R. E. & KERJASCHKI, D. 2000. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol*, 11, 403–12.
- RENNKE, H. G. & VENKATACHALAM, M. A. 1977. Structural determinants of glomerular permselectivity. *Fed Proc*, 36, 2519–26.
- ROBINSON, G. B. & WALTON, H. A. 1989. Glomerular basement membrane as a compressible ultrafilter. *Microvasc Res*, 38, 36–48.
- RODEWALD, R. & KARNOVSKY, M. J. 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 60, 423–33.

- RODRIGUEZ-FRANCO, P., BRUGUES, A., MARIN-LLAURADO, A., CONTE, V., SOLANAS, G., BATLLE, E., FREDBERG, J. J., ROCA-CUSACHS, P., SUNYER, R. & TREPAT, X. 2017. Long-lived force patterns and deformation waves at repulsive epithelial boundaries. *Nat Mater*, 16, 1029–1037.
- ROSELLI, S., GRIBOUVAL, O., BOUTE, N., SICH, M., BENESSY, F., ATTIE, T., GUBLER, M. C. & ANTIGNAC, C. 2002. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol*, 160, 131–9.
- ROSELLI, S., HEIDET, L., SICH, M., HENGER, A., KRETZLER, M., GUBLER, M. C. & ANTIGNAC, C. 2004. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 24, 550–60.
- RUOTSALAINEN, V., LJUNGBERG, P., WARTIOVAARA, J., LENKKERI, U., KESTILA, M., JALANKO, H., HOLMBERG, C. & TRYGGVASON, K. 1999. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7962–7.
- RYAN, G. B., RODEWALD, R. & KARNOVSKY, M. J. 1975. An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest*, 33, 461–8.
- SALAITA, K. & GROVES, J. T. 2010. Roles of the cytoskeleton in regulating EphA2 signals. *Commun Integr Biol*, 3, 454–7.
- SALEEM, M. A., NI, L., WITHERDEN, I., TRYGGVASON, K., RUOTSALAINEN, V., MUNDEL, P. & MATHIESON, P. W. 2002a. Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol*, 161, 1459–66.
- 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. & MUNDEL, P. 2002b. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, 13, 630–8.
- SARNAK, M. J., LEVEY, A. S., SCHOOLWERTH, A. C., CORESH, J., CULLETON, B., HAMM, L. L., MCCULLOUGH, P. A., KASISKE, B. L., KELEPOURIS, E., KLAG, M. J., PARFREY, P., PFEFFER, M., RAIJ, L., SPINOSA, D. J. & WILSON, P. W. 2003. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*, 108, 2154–69.
- SAWADA, H., STUKENBROK, H., KERJASCHKI, D. & FARQUHAR, M. G. 1986. Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol*, 125, 309–18.
- SCHMIDT, R. F. 2010. *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, Heidelberg: Springer.
- SCHMITT, A. M., SHI, J., WOLF, A. M., LU, C. C., KING, L. A. & ZOU, Y. 2006. Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature*, 439, 31–7.
- SCHUBERT, D., BODE, C., KENEFECK, R., HOU, T. Z., WING, J. B., KENNEDY, A., BULASHEVSKA, A., PETERSEN, B. S., SCHAFFER, A. A., GRUNING, B. A., UNGER, S., FREDE, N., BAUMANN, U., WITTE, T., SCHMIDT, R. E., DUECKERS, G., NIEHUES, T., SENEVIRATNE, S., KANARIOU, M., SPECKMANN, C., EHL, S., RENSING-EHL, A., WARNATZ, K.,

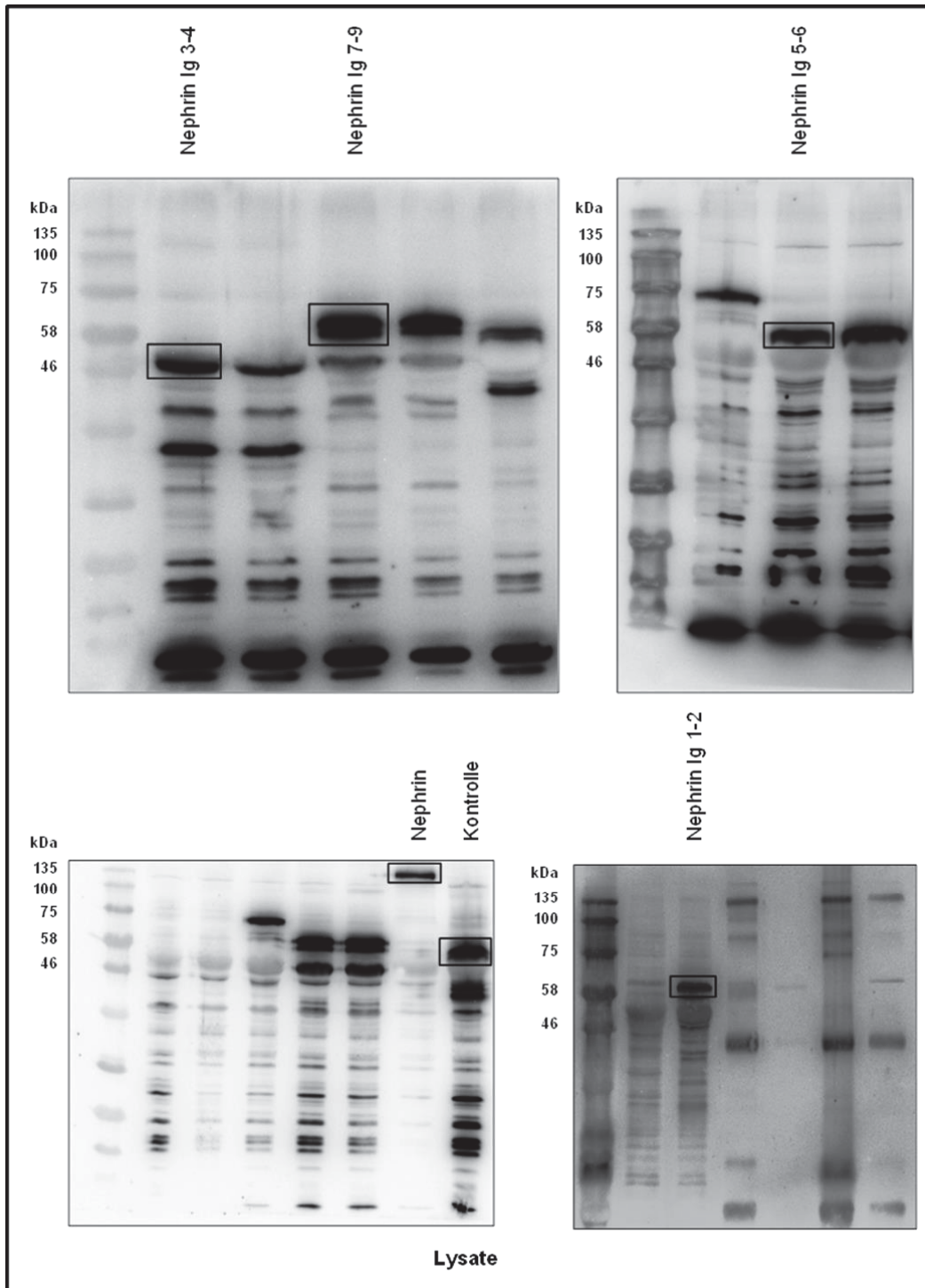


- RAKHMANOV, M., THIMME, R., HASSELBLATT, P., EMMERICH, F., CATHOMEN, T., BACKOFEN, R., FISCH, P., SEIDL, M., MAY, A., SCHMITT-GRAEFF, A., IKEMIZU, S., SALZER, U., FRANKE, A., SAKAGUCHI, S., WALKER, L. S. K., SANSOM, D. M. & GRIMBACHER, B. 2014. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med*, 20, 1410–16.
- SCHWARZ, K., SIMONS, M., REISER, J., SALEEM, M. A., FAUL, C., KRIZ, W., SHAW, A. S., HOLZMAN, L. B. & MUNDEL, P. 2001. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*, 108, 1621–9.
- SEGURA, I., ESSMANN, C. L., WEINGES, S. & ACKER-PALMER, A. 2007. Grb4 and GIT1 transduce ephrinB reverse signals modulating spine morphogenesis and synapse formation. *Nat Neurosci*, 10, 301–10.
- SEIRADAKE, E., HARLOS, K., SUTTON, G., ARICESCU, A. R. & JONES, E. Y. 2010. An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 398–402.
- SELLIN, L., HUBER, T. B., GERKE, P., QUACK, I., PAVENSTADT, H. & WALZ, G. 2003. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J*, 17, 115–7.
- SHIH, N. Y., LI, J., KARPITSKII, V., NGUYEN, A., DUSTIN, M. L., KANAGAWA, O., MINER, J. H. & SHAW, A. S. 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 286, 312–5.
- SHIRATO, I. 2002. Podocyte process effacement in vivo. *Microsc Res Tech*, 57, 241–6.
- SIMONS, M., SCHWARZ, K., KRIZ, W., MIETTINEN, A., REISER, J., MUNDEL, P. & HOLTHOFER, H. 2001. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol*, 159, 1069–77.
- SOLANAS, G. & BATLLE, E. 2011. Control of cell adhesion and compartmentalization in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res*, 317, 2695–701.
- STRUHL, K. 2001. Subcloning of DNA fragments. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 3, Unit3.16.
- TAKEDA, T., MCQUISTAN, T., ORLANDO, R. A. & FARQUHAR, M. G. 2001. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest*, 108, 289–301.
- TEWARI, R., NADA, R., RAYAT, C. S., BORUAH, D., DUDEJA, P., JOSHI, K. & SAKHUJA, V. 2015. Correlation of proteinuria with podocyte foot process effacement in IgA nephropathy: an ultrastructural study. *Ultrastruct Pathol*, 39, 147–51.
- TOPHAM, P. S., KAWACHI, H., HAYDAR, S. A., CHUGH, S., ADDONA, T. A., CHARRON, K. B., HOLZMAN, L. B., SHIA, M., SHIMIZU, F. & SALANT, D. J. 1999. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest*, 104, 1559–66.
- TRIPLETT, J. W. & FELDHEIM, D. A. 2012. Eph and ephrin signaling in the formation of topographic maps. *Seminars in cell & developmental biology*, 23, 7–15.
- TRYGGVASON, K. 1999. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 10, 2440–5.

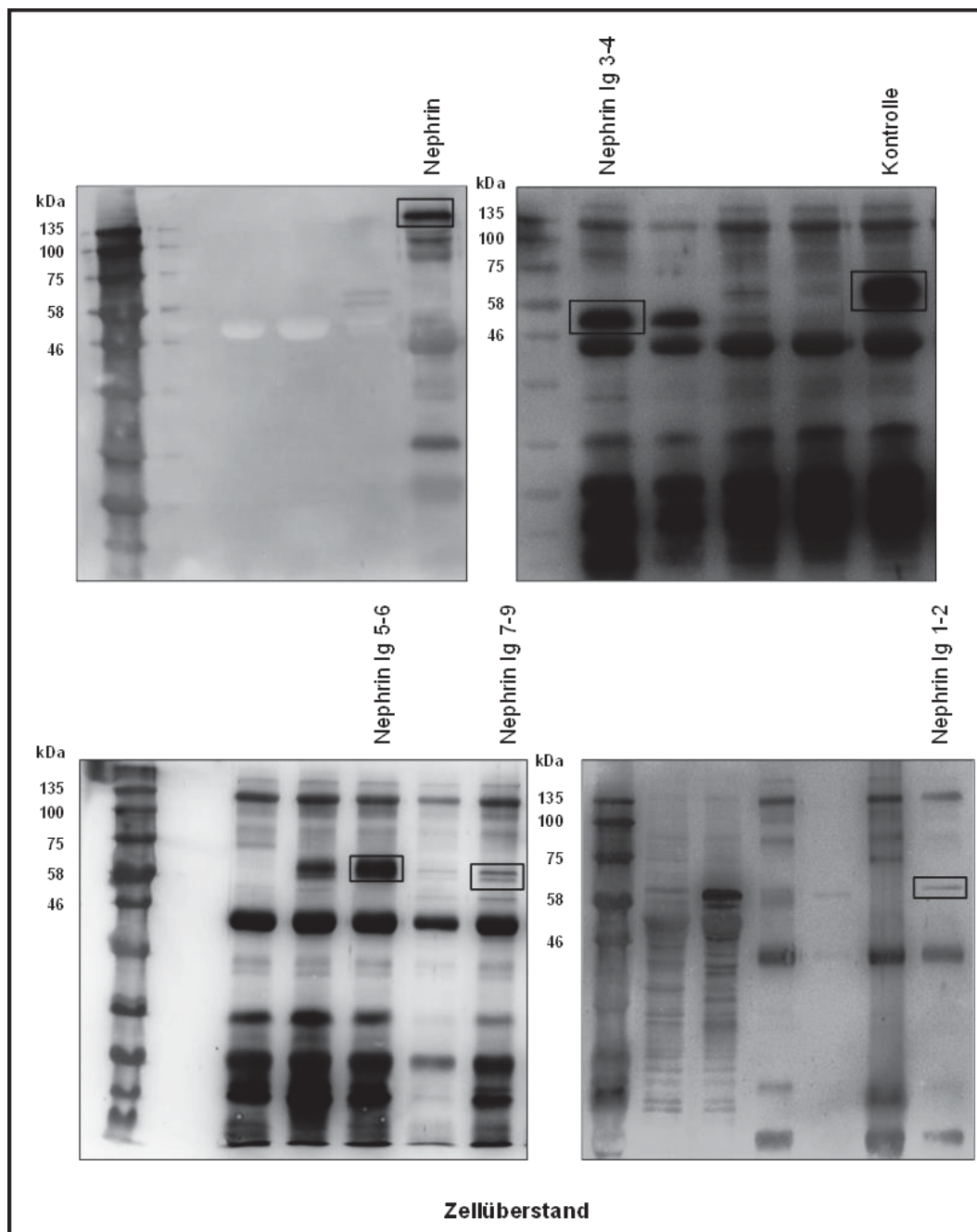
- TRYGGVASON, K., PATRAKKA, J. & WARTIOVAARA, J. 2006. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354, 1387–401.
- TSUJI, S., KIMATA, T., YAMANOUCHI, S., KITAO, T., KINO, J., SURUDA, C. & KANEKO, K. 2017. Regulatory T cells and CTLA-4 in idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Int*, 59, 643–6.
- VASMANT, D., MAURICE, M. & FELDMANN, G. 1984. Cytoskeleton ultrastructure of podocytes and glomerular endothelial cells in man and in the rat. *Anat Rec*, 210, 17–24.
- VEITCH, N. C. 2004. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65, 249–59.
- VERMA, R., KOVARI, I., SOOFI, A., NIHALANI, D., PATRIE, K. & HOLZMAN, L. B. 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest*, 116, 1346–59.
- VERMA, R., WHARRAM, B., KOVARI, I., KUNKEL, R., NIHALANI, D., WARY, K. K., WIGGINS, R. C., KILLEN, P. & HOLZMAN, L. B. 2003. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem*, 278, 20716–23.
- WALKER-DANIELS, J., RIESE, D. J., 2ND & KINCH, M. S. 2002. c-Cbl-dependent EphA2 protein degradation is induced by ligand binding. *Mol Cancer Res*, 1, 79–87.
- WARTIOVAARA, J., OFVERSTEDT, L. G., KHOSHNOODI, J., ZHANG, J., MAKELA, E., SANDIN, S., RUOTSALAINEN, V., CHENG, R. H., JALANKO, H., SKOGLUND, U. & TRYGGVASON, K. 2004. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest*, 114, 1475–83.
- WEIB, C. 1999. *Basiswissen Medizinische Statistik*.
- WEN, C. P., CHENG, T. Y., TSAI, M. K., CHANG, Y. C., CHAN, H. T., TSAI, S. P., CHIANG, P. H., HSU, C. C., SUNG, P. K., HSU, Y. H. & WEN, S. F. 2008. All-cause mortality attributable to chronic kidney disease: a prospective cohort study based on 462 293 adults in Taiwan. *Lancet*, 371, 2173–82.
- WICKHAM, H. & GROLEMUND, G. 2017. *R for Data Science: Import, Tidy, Transform, Visualize, and Model Data*, O'Reilly Media, Inc.
- WIMMER-KLEIKAMP, S. H., JANES, P. W., SQUIRE, A., BASTIAENS, P. I. & LACKMANN, M. 2004. Recruitment of Eph receptors into signaling clusters does not require ephrin contact. *J Cell Biol*, 164, 661–6.
- WIMMER-KLEIKAMP, S. H. & LACKMANN, M. 2005. Eph-modulated cell morphology, adhesion and motility in carcinogenesis. *IUBMB Life*, 57, 421–31.
- WNUK, M., HLUSHCHUK, R., JANOT, M., TUFFIN, G., MARTINY-BARON, G., HOLZER, P., IMBACH-WEESE, P., DJONOV, V. & HUYNH-DO, U. 2012. Podocyte EphB4 signaling helps recovery from glomerular injury. *Kidney Int*, 81, 1212–25.
- WYKOSKY, J., PALMA, E., GIBO, D. M., RINGLER, S., TURNER, C. P. & DEBINSKI, W. 2008. Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene*, 27, 7260–73.
- XU, N. J. & HENKEMEYER, M. 2009. Ephrin-B3 reverse signaling through Grb4 and cytoskeletal regulators mediates axon pruning. *Nat Neurosci*, 12, 268–76.

- YAMAGUCHI, Y. & PASQUALE, E. B. 2004. Eph receptors in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 288–96.
- YU, C. C., YEN, T. S., LOWELL, C. A. & DEFRANCO, A. L. 2001. Lupus-like kidney disease in mice deficient in the Src family tyrosine kinases Lyn and Fyn. *Curr Biol*, 11, 34–8.
- YU, T., LI, Y. J., BIAN, A. H., ZUO, H. B., ZHU, T. W., JI, S. X., KONG, F., YIN, D. Q., WANG, C. B., WANG, Z. F., WANG, H. Q., YANG, Y., YOO, B. C. & CHO, J. Y. 2014. The regulatory role of activating transcription factor 2 in inflammation. *Mediators Inflamm*, 2014.
- YUMOTO, N., WAKATSUKI, S., KURISAKI, T., HARA, Y., OSUMI, N., FRISEN, J. & SEHARA-FUJISAWA, A. 2008. Meltrin beta/ADAM19 interacting with EphA4 in developing neural cells participates in formation of the neuromuscular junction. *PLoS One*, 3, e3322.
- YUN, B. H., LEE, S. M., CHO, H. Y., KIM, J. Y., SON, G. H., KIM, Y. H., PARK, Y. W., LIM, B. J. & KWON, J. Y. 2015. Expression of nephrin in the human placenta and fetal membranes. *Mol Med Rep*, 12, 5116–20.
- ZENKER, M., AIGNER, T., WENDLER, O., TRALAU, T., MUNTEFERING, H., FENSKI, R., PITZ, S., SCHUMACHER, V., ROYER-POKORA, B., WUHL, E., COCHAT, P., BOUVIER, R., KRAUS, C., MARK, K., MADLON, H., DOTSCHE, J., RASCHER, W., MARUNIAK-CHUDEK, I., LENNERT, T., NEUMANN, L. M. & REIS, A. 2004. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet*, 13, 2625–32.
- ZHANG, Q. L. & ROTHENBACHER, D. 2008. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*, 8, 117.
- ZIGMOND, S. H. 1996. Signal transduction and actin filament organization. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 66–73.
- ZIMMER, M., PALMER, A., KOHLER, J. & KLEIN, R. 2003. EphB-ephrinB bidirectional endocytosis terminates adhesion allowing contact mediated repulsion. *Nat Cell Biol*, 5, 869–78.

## 6 Anhang



**Abb. 15: Expression von extrazellulärem *Nephrin* und *Nephtrin-Truncations* Lysate**  
*HEK-293T* Zellen wurden mit der Plasmid-DNA des rekombinanten extrazellulären *Nephtrins*, den *Nephtrin-Truncations* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9 sowie der Kontrolle transfiziert. Sie exprimierten rekombinantes extrazelluläres *Nephtrin* (141 kDa), *Nephtrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephtrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephtrin* Ig 5–6 (49 kDa), *Nephtrin* Ig 7–9 (65 kDa) und die Kontrolle (57 kDa). Nach der Zellernte wurde im Western Blot gegen anti-Human-IgG gefärbt. Alle Konstrukte werden von *HEK-293T* Zellen in korrekter Größe exprimiert. Ig: Immunglobulin, kDa: Kilo Dalton



**Abb. 16: Expression von extrazellulärem *Nephrin* und *Nephrin-Truncations* Zellüberstand**

*COS-7* Zellen wurden mit der Plasmid-DNA des rekombinanten extrazellulären *Nephrens*, den *Nephrin-Truncations* Ig 1–2, Ig 3–4, Ig 5–6, Ig 7–9 sowie der Kontrolle transfiziert. Die *COS-7* Zellen sezernierten die rekombinanten Proteine in den Überstand. Nach 7 Tagen erfolgte die Zellernte. Nach Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie wurde im Western Blot gegen anti-Human-IgG gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass die rekombinanten Proteine extrazelluläres *Nephrin* (141 kDa), *Nephrin* Ig 1–2 (60 kDa), *Nephrin* Ig 3–4 (59 kDa), *Nephrin* Ig 5–6 (49 kDa), *Nephrin* Ig 7–9 (65 kDa) und die Kontrolle (57 kDa) von *COS-7* Zellen korrekt in den Überstand sezerniert werden. Ig: Immunglobulin, kDa: Kilo Dalton

## 7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Lars Christian Rump für die Möglichkeit, die Untersuchungen in der Klinik für Nephrologie der Heinrich-Heine-Universität durchführen zu dürfen.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin möchte ich mich besonders für die freundliche Überlassung dieses Themas sowie seine tatkräftige Unterstützung bedanken.

Frau Dr. med. Eva Königshausen danke ich für die exzellente fachliche Betreuung und moralische Unterstützung. Danke für die moralische Unterstützung und die gewinnenden Gespräche.

Dem Laborteam, insbesondere Blanka Duvnjak, danke ich für die herzliche Aufnahme, die ausführliche Einarbeitung, die Unterstützung in jeder Hinsicht und bei der Versuchsdurchführung. Meinen Laborpartnerinnen Clara Porwoll und Aida Bajraktarevic möchte ich danken für die bereichernde Zusammenarbeit im Labor.

Silke Haunfelder danke ich für ihre Unterstützung als Lektorin dieser Arbeit.

Meiner Frau Sarah danke ich für ihre nie nachlassende Motivation und Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Andrea und Ludwig Heimann für ihre liebevolle und wertschätzende Unterstützung. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet.