

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

Der Einfluss von GLEPP1 auf das Zytoskelett des Podozyten

Dissertation

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

vorgelegt von

Laura Gerbaulet-Helling

2022

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

gez:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Günter Niegisch

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden wichtige neue Erkenntnisse bezüglich des genauen Aufbaus der podozytären Schlitzmembran gewonnen. Daraus ließ sich ein neues Verständnis der glomerulären Schlitzmembran und der Pathogenese von vielen, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen ableiten. Aufgrund der Anpassung der podozytären Fußfortsätze an Einflüsse aus der Umgebung wird der glomeruläre Filter nicht mehr als statisches Konstrukt angesehen, sondern als dynamisches Modell. Ziel dieser Arbeit ist es, GLEPP1 (*glomerular epithelial protein-1*) und seine Interaktionspartner und deren Funktion für den Podozyten zu untersuchen. Methodisch wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen die Co-Immunopräzipitation zum Nachweis der Interaktion zwischen Proteinen, zum anderen die Immunfluoreszenz zur Darstellung von Proteinen und Zellstrukturen in unterschiedlichen Zellen. In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass GLEPP1 den Aufbau und die dynamischen Veränderungen der fokalen Adhäsionen modulieren kann. Wir bestätigten dies durch den Nachweis einer Interaktion von GLEPP1 mit Paxillin, einem wichtigen Protein der fokalen Adhäsionen. Die Interaktionsstellen von GLEPP1 mit Paxillin konnten durch Truncationmapping eingegrenzt werden. Unter Stimulation von FAK, einem wichtigen modulatorischen Protein der fokalen Adhäsionen, vermuten wir eine verstärkte Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin. Durch die Inhibition von Src-Kinasen, die Paxillin phosphorylieren und dadurch die Zellmotilität beeinflussen, ließ sich die Tendenz einer verminderten Interaktion nachweisen. Ein weiterer modulatorischer Effekt auf die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin scheint durch die Hinzugabe von Salicylsäure, die GLEPP1 hemmt, erreicht zu werden. Zur Untersuchung des Einflusses von GLEPP1 auf das Aktinzytoskelett wurde mittels Immunfluoreszenz die Zellstruktur in stabil transduzierten Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass GLEPP1 keinen direkten Einfluss auf die Modulation des Aktinzytoskeletts hat, jedoch zu einer verstärkten Ausbildung von fokalen Adhäsionen führt. Daher hat GLEPP1 offenbar einen indirekten Einfluss auf die Migration. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass GLEPP1 die Zellmigration beeinflusst und somit essenziell für die Anpassungsfähigkeit des Podozyten und die Organisation des zytoskelettalen Aufbaus ist.

Abstract

In recent years, new important insights have been gained regarding the construction of the podocyte slit diaphragm. This has resulted in a completely new understanding of the glomerular slit diaphragm and the pathogenesis of many proteinuria associated kidney diseases. Additionally, the glomerular filter is no longer considered a static construct, but instead as a dynamic model through the adaptation of the podocyte foot extension influenced by the environment.

The goal of this dissertation was to investigate GLEPP1, its interaction partners and their function for the podocyte.

Different approaches have been methodically used to perform co-immunoprecipitation to detect interactions between proteins. We also used immunofluorescence to visualize proteins and cell structures in different cells. A previous study demonstrated an interaction of GLEPP1 with paxillin, an important protein of focal adhesions. Interaction sites between GLEPP1 and paxillin was narrowed down using truncation mapping. Through the stimulation via FAK (focal adhesion associated kinase), an important modulatory protein of focal adhesions, an increased interaction between GLEPP1 and paxillin has been shown. Also, by inhibiting Src-Kinases, which phosphorylates paxillin and thereby affects cell motility, the interaction was weakened. Another modulatory effect on the interaction of GLEPP1 and paxillin was demonstrated by the addition of salicylic acid, which inhibits GLEPP1. To investigate the influence of GLEPP1 on the actin cytoskeleton, the cell structure in stably transduced cells was examined by immunofluorescence. This showed that GLEPP1 has no direct influence on the modulation of the actin cytoskeleton, but does lead to an increased formation of focal adhesions. Therefore, GLEPP1 appears to have an indirect impact on migration.

To conclude, these findings have shown that GLEPP1 has an influence on cell migration and seems to be essential for the adaptability of the podocyte and the organization of the cytoskeletal structure.

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Anti-HA-Ak	Anti-Hämagglutinin-Antikörper
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AS/AA	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
CD2	<i>cluster of differentiation 2</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
COS-7	Affen-Nieren-Zellen (<i>Cercopithecus aethiops, origin-defective SV-40</i>)
C-terminal	Carboxyl-terminal
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEP-1	<i>Density-enhanced phosphatase</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular-signal regulated Kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal adhesion associated Kinase</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GEF	GTP-Austauschfaktor
GFP	Grün-Fluoreszierendes Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLEPP1	<i>glomerular epithelial protein-1</i>
GTPase	GTP-bindende Proteine
GTP	Guanosintriphosphat

HEBS	<i>HEPES buffered saline</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kDa	Kilodalton
LB-Medium	<i>Lysogeny broth-Medium</i>
LD	Leucin-Aspartat Repeat (LD)
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
N-terminal	Amino-terminal
NEPH	<i>Kin of IRRE-like protein</i>
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP2	4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4- d]pyrimidine
PTPPRO	<i>Protein tyrosine phosphatase receptor type O</i>
PTP-PEST	<i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 12</i>
Rac1	<i>Ras-related c3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rho	<i>Ras homologue</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	<i>Src-homology 3</i>
slg	<i>Surface</i> Immunglobulin
Src	<i>Sarcomoma</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
xG	Gravitation
WT	Wildtyp
ZO-1	<i>Zonula occludens-Protein 1</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract.....	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Proteinurische Nierenerkrankungen.....	1
1.2 Aufbau des glomerulären Filters	2
1.3 Der Podozyt	3
1.3.1 Für diese Arbeit relevante Proteine des Podozyten.....	5
1.3.2 Migration und die beteiligten Strukturen sowie die Rolle der Migration für den Podozyten	7
1.4 Ziele der Arbeit	14
2 Methodik	15
2.1 Materialien und Lösungen	15
2.1.1 Zellkultur	15
2.1.2 Transfektion.....	15
2.1.3 Plasmide und Vektoren.....	15
2.1.4 Inhibitoren.....	16
2.1.5 Detergenzien und Puffer	16
2.1.6 Co-Immunopräzipitation	16
2.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	17
2.1.8 DNA-Subklonierung.....	18
2.1.9 Immunfluoreszenz	20
2.2 Zellkultur	22
2.3 Transfektion.....	23
2.4 Zellernte.....	23
2.5 Co-Immunopräzipitation.....	24
2.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	24
2.7 DNA-Subklonierung	26
2.7.1 Ligation	26
2.7.2 Transformation und Amplifikation	26
2.7.3 Erzeugung einer GLEPP1-Mutante mittels <i>site-directed</i> <i>Mutagenesis</i>	27
2.7.4 Minikultur und Minipräparation.....	27
2.7.5 Maxikultur und Maxipräparation.....	28
2.8 Immunfluoreszenz.....	28
2.9 Densitometrie und Statistik	30
3 Ergebnisse	31
3.1 GLEPP1 interagiert mit Proteinen der <i>Focal adhesions</i>.....	31

3.1.1	Interaktion von GLEPP1 mit Paxillin	31
3.1.2	Keine Interaktion von GLEPP1 mit FAK	35
3.2	Modulatoren der GLEPP1-Paxillin-Interaktion.....	35
3.2.1	Mögliche Verstärkung der Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch FAK.....	35
3.2.2	Abschwächung der Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch Src-Inhibition.....	36
3.2.3	Abgeschwächte Interaktion mit Paxillin als Folge der Hemmung von GLEPP1 durch Salicylsäure.....	37
3.3	Die Rolle von GLEPP1 für die zytoskelettale Architektur der Zelle ...	39
3.3.1	GLEPP1 hat keinen Einfluss auf die Modulation des Aktinzytoskeletts.....	39
3.3.2	GLEPP1 colokalisiert nicht mit Proteinen der <i>Focal adhesions</i>	40
3.3.3	GLEPP1 führt zur verstärkten Ausbildung von <i>Focal adhesions</i>	41
4	Diskussion.....	43
4.1	Übersicht.....	43
4.2	Relevanz des podozytären Proteins GLEPP1 für die Entstehung einer Proteinurie	44
4.3	Bedeutung und Modulation von <i>Focal adhesions</i> im Podozyten durch GLEPP1	45
4.3.1	Podozyten und <i>Focal adhesions</i>	45
4.3.2	GLEPP1 und die Beeinflussung <i>Focal adhesions</i> -assoziierter Proteine	46
4.4	Einfluss von GLEPP1 auf die Migration im Allgemeinen	49
4.5	Einfluss von GLEPP1 auf die Migration des Podozyten	50
4.6	Schlussfolgerung.....	51
5	Literaturverzeichnis.....	53
6	Anhang	62

1 Einleitung

1.1 Proteinurische Nierenerkrankungen

Proteinurie beschreibt den Verlust von Eiweiß in den Urin. In den meisten Fällen entsteht ein Eiweißverlust durch Schädigung der Nierenkörperchen (Glomeruli). Seltener wird auch eine Proteinurie durch Beeinträchtigung des Tubulussystems ausgelöst oder verschlechtert.

Die Schädigung der Glomeruli wird durch eine Vielzahl von Ursachen, wie zum Beispiel durch autoimmune Prozesse, hereditäre Ursachen oder durch metabolische Systemerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) hervorgerufen.

Dies kann zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen, die sich durch eine abnorme Nierenstruktur oder -funktion, durch die Dauer von mehr als 3 Monaten und mit Auswirkungen auf die Gesundheit definiert. Die abnorme Nierenstruktur oder -funktion beinhaltet eine GFR $< 60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, eine Albuminurie $> 30 \text{ mg}$ täglich, ein abnormes Urinsediment oder Elektrolytstörungen beziehungsweise eine renal tubuläre Azidose oder den Zustand nach einer Nierentransplantation (1). Chronische Nierenerkrankungen sind mit einer Vielzahl an Komplikationen vergesellschaftet, die unter anderem das kardiovaskuläre Risiko stark erhöhen (2). In den USA leiden 9,6% der Erwachsenen an einer terminalen Niereninsuffizienz und es ist mit einem progredienten Anstieg an Erkrankten zu rechnen (3). Die terminale Niereninsuffizienz beschreibt das Stadium 5 (glomeruläre Filtrationsrate $< 15 \text{ ml/min Urin}$), die ein Nierenersatzverfahren nötig macht. Die erhöhte Prävalenz wird durch Studien aus Europa, Asien und Australien unterstützt (4). Aufgrund dessen ist es sehr wichtig, die Ursachenforschung und die damit verbundene Therapie weiter voranzutreiben.

Bei einer glomerulären Proteinurie unterscheidet man zwischen einer Mikroalbuminurie, die eine Ausscheidung von 30 bis 300 mg Albumin/d beschreibt, und einer Makroalbuminurie, unter der man die Ausscheidung von mehr als 300 mg Albumin/d versteht (5).

Zu Beginn der glomerulären Nierenerkrankung kommt es häufig zunächst zu einer selektiven Ausscheidung von Albumin (Mikroalbuminurie). Im weiteren Verlauf

findet eine Umstrukturierung der Filtrationsbarriere und des Tubulussystems statt und dies ist durch eine unselektive Proteinurie mit einer Ausscheidung von mehr als 3,0 g Eiweiß/d ersichtlich. Bei der unselektiven Proteinurie lassen sich weitere Arten von Proteinen im Urin nachweisen, als Marker dienen zum Beispiel Albumin und IgG. Die selektive Proteinurie tritt als Zeichen der Schädigung der Podozyten bei der membranösen Glomerulonephritis, der fokal-segmentalen Glomerulosklerose und der Minimal-Change-Glomerulopathie im Erwachsenenalter auf. Im Gegensatz dazu sind die führenden Auslöser eines sekundären nephrotischen Syndroms z.B. der Diabetes mellitus, der chronische Lupus erythematodes und die Amyloidose. Je nach Alter der Patienten ändert sich die Ätiologie, denn beispielsweise ist im Kindesalter und bei Jugendlichen die Minimal-Change-Glomerulopathie die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom.

1.2 Aufbau des glomerulären Filters

Über die Nieren erfolgt die Ausscheidung von harnpflichtigen Substanzen aus dem Blut. Pro Tag werden durch Druckfiltration ca. 150-180 Liter eiweißfreier Primärharn im Glomerulum gebildet, der zum größten Teil im Tubulussystem rückresorbiert wird. Ausgeschieden wird dann nur noch eine tägliche Harnmenge von 1-1,5 Liter, die die Exkretionsstoffe enthält.

Ort der Ultrafiltration sind die Glomeruli. Grundlage für das Verständnis einer strukturellen Schädigung des Glomerulums ist der Aufbau des glomerulären Filters aus drei Schichten. Dieser besteht aus dem fenestrierten glomerulären Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten (viszerale glomeruläre Epithelzellen).

Das fenestrierte Endothel der Kapillaren bildet Poren von ca. 70 nm im Durchmesser (6-8). Zusätzlich weisen die glomerulären endothelialen Zellen eine negativ geladene Glykokalyx auf ihrer Oberfläche auf, die durch Sialoproteine und Proteoglykane gebildet wird (9).

Die glomeruläre Basalmembran setzt sich vorrangig aus Typ-IV-Kollagen, das die Basis bildet und für eine hohe mechanische Stabilität sorgt, sowie Laminin, Nidogen (Entacitin) und Proteoglykanen zusammen. Diese bilden eine 300-350 nm dicke azelluläre, extrazelluläre Matrix, die durch die Proteoglykane eine negative Ladung

erhält und somit negativ geladenen Plasmaproteinen den Durchtritt durch den Filter erschwert (9-12).

Die Podozyten sind viszerale Epithelzellen auf der Harnseite des Glomerulums, die der glomerulären Basalmembran aufsitzen. Sie setzen sich aus einem Zellkörper, den Primärfortsätzen und sich daraus entwickelnden Sekundärfortsätzen (Fußfortsätze) zusammen, die sich um die glomerulären Kapillarschlingen legen und mit den Fußfortsätzen des benachbarten Podozyten interagieren. Des Weiteren bauen sie zusammen mit der glomerulären Basalmembran die negativ geladene Glykokalyx auf, die sich aus Podoendin, GLEPP1 (*protein tyrosine phosphatase receptor typ O*) und Podocalyxin zusammensetzt (13-15).

1.3 Der Podozyt

Podozyten sind stark differenzierte epitheliale Zellen, die mit ihrem großen Zellkörper in den urinären Spalt ragen und über ihre primären Fortsätze an der glomerulären Basalmembran verankert sind. Die sich aus den Primärfortsätzen entwickelnden interdigitierenden, sekundären Fußfortsätze spannen sich über die Kapillarschlingen und interagieren mit dem benachbarten Podozyten. Der Podozytenzellkörper kann frei im glomerulären Filtrat flottieren und die Fußfortsätze, die mit der glomerulären Basalmembran verbunden sind, können sich durch kontraktile Eigenschaften an den wechselnden Druck im Glomerulum anpassen (16-18).

Allen proteinurischen Nierenerkrankungen ist gemeinsam, dass es zu einer Podozytenschädigung und zum Verlust dieser Zellen kommt. Wiggins et al. haben die Podozyten-Verlusthypothese aufgestellt, die besagt, dass bei 80-90% aller glomerulären Erkrankungen eine Schädigung des Podozyten vorliegt (19). Die Schädigung der Podozyten führt häufig zu einer Reorganisation des Aktinzytoskeletts der Fußfortsätze und der Schlitzmembran, sodass eine abgeplattete, oktupoide Struktur der Fußfortsätze entsteht (20). Zudem können sich ausdifferenzierte Podozyten nicht mehr teilen, mit der Folge, dass der Verlust dieser Zellen bei renalen Erkrankungen zu einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion führt (21).

Der Podozyt besitzt in seinem Zellkörper Intermediärfilamente wie Vimentin und Desmin, die typisch für mesenchymale Zellen sind und dadurch den Wandaufbau des glomerulären Filters stützen (22, 23). Die sich anschließenden Primärfortsätze setzen sich aus Mikrotubuli und einigen Intermediärfilamenten zusammen. In den Fußfortsätzen (Sekundärfußfortsätzen) findet man einen kontraktilem Apparat, der auf Mikrofilamenten basiert und der sich unter anderem aus Aktin, Myosin II, Vinculin und alpha-Aktinin zusammensetzt (16). Über *Focal contacts* und deren Interaktion mit dem $\alpha_3\beta_1$ -Integrin-Komplex findet die Bindung an die extrazelluläre Matrix statt (24-26).

Zwischen den Sekundärfußfortsätzen spannt sich die Schlitzmembran aus, die 40 nm breit ist, Poren von 5-15 nm Größe besitzt und so die Passage von größeren Molekülen wie beispielsweise Albumin verhindert. Diese setzt sich aus verschiedenen Proteinen (unter anderem Nephrin, Podocin, NEPH1 und 2 (*kin of IRRE-like protein*), CD2AP (CD2-assoziiertes Protein), ZO-1 (*zonula occludens-Protein 1*)) zusammen, die für die strukturelle Integrität des glomerulären Filters und die interzelluläre Kommunikation wichtig sind (27-33). Mutationen in den für die Proteine codierenden Genen führen zu unterschiedlichen Nierenerkrankungen, die jedoch alle zu einer Veränderung des glomerulären Filters mit resultierender glomerulärer Proteinurie führen.

So bewirkt eine Mutation des NPHS-1 Gens, kodierend für Nephrin, die Entwicklung eines kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ (34). Auch eine Mutation in dem für Podocin kodierenden NPHS2-Gen führt zu einem frühkindlichen steroidresistenten nephrotischen Syndrom mit rasch fortschreitender Niereninsuffizienz (35).

Des Weiteren bedingt eine Mutation im Gen, das für die Phosphatase GLEPP1 kodiert, die Entwicklung des idiopathischen nephrotischen Syndroms bei Kindern (36).

Der Podozyt besitzt unterschiedliche Aufgaben, die alle für die einwandfreie Funktionalität des glomerulären Filters sorgen. Durch sein starkes Aktinzytoskelett unterstützt er die Kapillaren bei der Kontraktion, um dem hydrostatischen Druck von ca. 60 mmHg im Glomerulum standhalten zu können.

Darüber hinaus bildet er einen Teil der Filtrationsbarriere und synthetisiert Typ IV-Kollagen zum Einbau in die GBM (Glomeruläre Basalmembran). Zusätzlich kommuniziert er mit anderen glomerulären Zellen zur Aufrechterhaltung ihrer normalen Funktion und spielt in der Immunologie durch die Expression von *Toll-like*-Rezeptoren eine wichtige Rolle (17, 33).

Verletzungen des Podozyten führen zu einer Störung des Aufbaus des glomerulären Filters und bedingen damit die Entwicklung der glomerulären Proteinurie sowie in der Maximalform das nephrotische Syndrom (12, 37). Diese Schädigungen können entweder durch die Beeinträchtigung der Integrität der Schlitzmembran oder durch die Verflachung und den Verlust der Fußfortsätze selbst entstehen (*podocyte effacement*). Zusätzlich kommt es zu einer Zellschwellung, dem Auftreten von *Occluding junctions* mit Verschiebung der apikalen Schlitzmembran und im schlimmsten Fall zum Ablösen der Podozyten von der glomerulären Basalmembran. Da in reifen Podozyten keine Zellteilung mehr stattfindet, können die durch die Loslösung der Podozyten entstandenen Freiräume nicht mehr durch neue Zellen gedeckt werden. Kompensatorisch hypertrophieren die verbleibenden Podozyten, um die entstandenen Freiräume zu überbrücken. Ist auch dieser Kompensationsmechanismus erschöpft, kommt es zum Verlust von Proteinen in den Urin (38-42).

1.3.1 Für diese Arbeit relevante Proteine des Podozyten

1.3.1.1 GLEPP1

GLEPP1 (*glomerular epithelial protein-1*) ist ein ca. 200 kDa großes, zur Gruppe der Rezeptortyrosin-Phosphatasen gehörendes Protein, das auf der apikalen Zellmembran von Podozyten exprimiert wird. Das für GLEPP1 codierende Gen befindet sich beim Menschen auf Chromosom 12 (12p12-p13) (43). GLEPP1 wird auch als PTPRO (*protein tyrosine phosphatase receptor type O*) oder PTP-U2 (*protein tyrosine phosphatase U2*) bezeichnet und gehört zur Gruppe der Typ III-Rezeptor-PTP. PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase-PEST*, PTPN12) ist eng verwandt mit GLEPP1 und wird ubiquitär exprimiert. Als integrales Membran-

protein weist GLEPP1 eine Extrazellulärregion, bestehend aus acht Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen mit 14 putativen Glykosylierungsstellen, eine transmembranäre Domäne und eine einzelne intrazelluläre katalytische Phosphatasedomäne auf (44, 45). Als komplettes Protein GLEPP1-*Fulllength* wird es spezifisch in der Niere und dem Gehirn exprimiert (43, 44), während die verkürzte Form (PTPROt) vor allem in menschlichen Lymphozyten aufzufinden ist (46).

Ebenso wird PTPRO in der Lunge und Leber exprimiert (47, 48). Je nach Organsystem übernimmt es unterschiedliche Aufgaben. In der Niere dient es auch als Marker für die glomeruläre Schädigung bei unterschiedlichen Nierenerkrankungen wie der IgA-Nephropathie, dem idiopathischen nephrotischen Syndrom, unterschiedlichen Formen der fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) und der Minimal-Change Glomerulonephritis (14, 36, 49-52). GLEPP1 scheint Einfluss auf den Phänotyp des Podozyten während der Schädigung des glomerulären Filters zu haben. Aufgrund des Verlustes von GLEPP1 kommt es zu einer Veränderung des zytoskelettalen Aufbaus des Podozyten. Dies resultiert aus dem Verlust und der Verklumpung der Fußfortsätze, der Loslösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran, dem Verlust der negativen Ladung des Filters sowie der lückenhaften Narbenbildung (40, 53-55). Ozaltin et al. haben gezeigt, dass es wegen der homozygoten Mutationen im Gen von GLEPP1 zum nephrotischen Syndrom im Kindesalter kommt (36). In Bezug auf das Immunsystem scheint PTPRO einen Einfluss auf die Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen zu haben. Zudem steigert PTP phi, eine verkürzte Isoform von GLEPP1, die Motilität durch Dephosphorylierung seines Substrates Paxillin in Makrophagen (56). In der Lunge wirkt GLEPP1 als Tumorsuppressorgen, dieses resultiert aus einer verminderten Expression in Lungentumoren (47). Kitamura et al. verweisen darauf, dass in hepatischen Tumoren neoplastische Alterationen des Gens zu finden sind (48).

Diese genannten Aufgaben von GLEPP1/PTPRO spiegeln den wichtigen Einfluss von GLEPP1 auf den zytoskelettalen Aufbau des Podozyten und damit die Aufrechterhaltung des intakten glomerulären Filters wider. Zum anderen scheint PTPRO Einfluss auf das Migrationsverhalten zu haben. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass in Fibroblasten PTP-PEST das Auflösen von *Focal adhesions*, die ein wichtiger Faktor für die Zellbewegung sind, bedingt und so die

Migration reguliert (57). Dies geschieht durch die Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen, die für die Zellmigration und die *Focal adhesions* wichtig sind. Ein bedeutender Interaktionspartner ist Paxillin, ein *Focal adhesion*-assoziiertes Protein, wodurch Einfluss auf die Modulation der *Focal adhesions* genommen werden kann (58).

1.3.2 Migration und die beteiligten Strukturen sowie die Rolle der Migration für den Podozyten

1.3.2.1 *Focal adhesions*

Focal adhesions sind ein Komplex aus mehreren Proteinen, die die extrazelluläre Matrix (EZM) mit dem zytoskelettalen Aktin verbinden. Die Adhäsion an die EZM ist für die Gewährleistung einer adäquaten Zellmorphologie, Migration, Proliferation und die Differenzierung der Zellen wichtig (59). Für die Adhäsion sind die Integrine essenziell, da sie über ihre extrazelluläre Domäne an die Strukturproteine der EZM wie Kollagen und Fibronectin binden. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung (Clustering), sodass der kurze zytosolische Anteil der Integrin-Heterodimere indirekt an das Aktinzytoskelett binden kann (60, 61).

Diese Bindung findet über verschiedene Proteine wie Talin, Vinculin, alpha-Aktinin statt (62, 63). Darüber können weitere Anker- und Signalproteine (u.a. Paxillin, FAK (*focal adhesion associated kinase*)) sowie Tyrosin-Kinasen und –Phosphatasen (u.a. PTP-PEST) an die Stellen rekrutiert werden (64, 65). So vergrößern sich die *Focal adhesions* auf über 180 Protein-Protein-Interaktionen.

Im Rahmen der Migration bilden sich kleine, unreife Adhäsionen im Lamellipodium direkt unterhalb der Vorderkante der Zelle aus. Im Verlauf kommt es entweder zur Wiederauflösung dieser Verbindungen oder sie entwickeln sich durch Rekrutierung von weiteren Proteinen zu größeren, punktförmigen Adhäsionen, den sogenannten *Focal complexes*. Sie manifestieren sich ein Stück weiter innerhalb der Zelle an der Interaktionszone von Lamellipodium und dem Lamellum. Diese können für einige Minuten aufrechterhalten werden und entwickeln sich im Verlauf des Migrationszyklus in *Focal adhesions*. Letztere sind größer als *Focal complexes* (ca. 2 µm breit und 3-10 µm lang), befinden sich an den Enden der Aktinbündel oder

Stressfasern und erstrecken sich von der Spitze der Zelle entlang der Seitenränder bis zum Zentrum des Zellrumpfes (66, 67).

Die stärkste Form der Adhäsionen sind die fibrillären Adhäsionen, die aufgrund ihres langsamen Wachstums auf fibronectinhaltigem Untergrund und nur in sehr langsam migrierenden oder fixen Zellen entstehen. Je nach Zelltyp findet sich eine unterschiedliche Anzahl verschiedener Stadien der Adhäsionen. So kann man in sich schnell bewegenden Zellen, z.B. Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten, viele unreife, kleine Adhäsionen sowie *Focal complexes* beobachten, die für eine schnelle Bewegung auf der EZM wichtig sind. Hingegen findet man in kontraktilen Zellen wie Fibroblasten, Endothel- und Muskelzellen eher reifere Adhäsionen wie *Focal adhesions* und nur einige *Focal complexes* (68, 69). In Podozyten sind die *Focal adhesions* sehr wichtig für die Verbindung des zytoskelettalen Aktins der Fußfortsätze mit der extrazellulären Matrix (70). Sie adaptieren sich dynamisch an die unterschiedlichen sensorischen und mechanischen Krafteinwirkungen, die auf den Podozyten einwirken. Ebenso sind sie entscheidend für das migratorische Verhalten der Podozyten, denn nur durch das Zusammenspiel des Auf- und Abbaus der *Focal adhesions* an unterschiedlichen Stellen der Zelle kann es zur gerichteten Migration kommen.

1.3.2.2 Paxillin

Paxillin ist ein 68-70 kDa großes Protein, das erstmalig 1989 als Substrat von Src-Onkogenen entdeckt wurde (71). Des Weiteren konnte es an den *Focal adhesions* durch die Interaktion mit Vinculin detektiert werden (72). Mit der Zeit entwickelte es sich zu einem zentralen *Focal adhesion*-assoziierten Protein, das als Adapterprotein fungiert. Als Adapterprotein rekrutiert Paxillin viele zytoskelettale und die Signaltransduktion beeinflussende Proteine und koordiniert somit die Weitergabe von nachgeschalteten Signalen. Dadurch kontrolliert Paxillin die dynamischen Wechsel bei der Zelladhäsion, dem zytoskelettalen Rearrangement und der Genexpression, die wichtig für die Migration und das Überleben der Zelle sind (73). Der C-terminale Anteil von Paxillin steuert Protein-Protein-Interaktionen durch Bindungen von verschiedenen Proteinen an die vier LIM-Domänen, die Doppel-

Zink-Finger-Motive besitzen (74, 75). LIM2 und LIM3 sind essenziell für die Rekrutierung von Paxillin an die *Focal adhesions*, denn durch die Integrin-induzierte Phosphorylierung von Paxillin durch FAK oder Src-Kinasen (76) kann das Andocken von Paxillin an den *Focal adhesions* stattfinden (77, 78).

Zusätzlich zeigt der C-terminale Anteil Bindungsstellen für Struktur- und Regulationsproteine (beispielsweise Tubulin und PTP-PEST) auf, wodurch die Dynamik der *Focal adhesions* kontrolliert wird (79, 80).

N-terminal weist Paxillin fünf Leucin- und Aspartat-reiche LD-Motive (LD1-5) auf, die wichtig für die Signalaktivität sind. Des Weiteren beinhaltet es Bindungsstellen für FAK und Vinculin (77, 81). Src-Kinasen können über ihre SH3-Domäne an die Prolin-reiche Region binden.

Generell existieren viele Phosphorylierungsstellen am Paxillin-Molekül, die durch verschiedene Kinasen (PAK (*p21-activated kinase*), FAK, Src (*sarcoma kinase*), ERK (*extracellular-signal regulated kinase*) genutzt werden (81, 82).

Paxillin ist wichtig für die Zellmigration, da es das Schlüssel- und Koordinationsprotein der Rho GTPasen Familie (*cdc42 (cell division cycle 42)*, *Rac1 (ras-related c3 botulinum toxin substrate 1)*, *RhoA (ras homolog family member A)*) darstellt und somit die Zellpolarität über *cdc42*, die Bildung von Zellausläufern über *Rac1* und die Zellkontraktilität mit Translokation über *RhoA* koordiniert (82, 83). Durch die Phosphorylierung von Paxillin über FAK und Src können GEFs (GTP-Austauschfaktoren), GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) und Effektorproteine an die *Focal adhesions* rekrutiert, dort aktiviert und reguliert werden und dadurch die Zellmigration beeinflussen (84-87). Zusätzlich bindet der GIT1/2-PIX-PAK-NCK-Komplex an LD4 von Paxillin und sorgt für ein *Focal Adhesion*-Turnover. Somit steuert Paxillin die Zellmigration (88-90). PTP-PEST reguliert nach Bindung an LIM3 und 4 Domänen die Zellausbreitung, Migration und Protrusion durch Modulation der *Rac1* und *RhoA* Aktivität (91-93). Zudem ist Paxillin essenziell für den Beginn der Migration an der Vorderkante der Zelle, da es den Aufbau und die Struktur der Adhäsionsstellen beeinflusst, indem es für deren Zusammensetzung und auch Auflösung sorgt (94, 95).

Paxillin scheint auch für den Podozyten eine wichtige Rolle zu spielen, da es mit weiteren *Focal Adhesion*-assoziierten Proteinen im Glomerulum in vivo darstellbar ist (96). In der zitierten Arbeit von Zhang et al. (2010) konnte Paxillin als ein hochgradig Tyrosin-phosphoryliertes Protein elektronenmikroskopisch oder

immunhistochemisch an der basalen Membran der Fußfortsätze und der Schlitzmembran dargestellt werden und somit wurde ihm eine zentrale Rolle für die glomeruläre Ultrafiltration zugeschrieben (96).

1.3.2.3 Zellmigration

Die Zellmigration ist ein wichtiger Prozess, der für die Entwicklung und Erhaltung des Organismus im Allgemeinen von großer Bedeutung ist. Andererseits spielt sie aber auch in verschiedenen pathologischen Zuständen eine wichtige Rolle, wie z.B. bei entzündlichen Erkrankungen oder der Metastasierung von Tumoren (97). Durch Einflussnahme auf das kontrollierte Gleichgewicht zwischen dem Strukturertalt und der gleichzeitigen Fähigkeit, das Gewebe dynamisch zu verändern, stellt die Migration eine zentrale Rolle dar.

Sie beinhaltet die kontinuierliche Formation und Wiederauflösung der Adhäsionen und die damit verbundene Veränderung der zytoskelettalen Organisation. Der Prozess der Migration gliedert sich in mehrere Einzelprozesse: die Polarisierung mit anschließender Protrusion, die Bildung von Adhäsionen und im Anschluss die Ablösung von der EZM und Kontraktion (98).

Als erste Voraussetzung muss die Zelle polarisiert sein, das heißt, dass sie einen klaren apikalen und basalen Pol hat, der neben strukturellen auch funktionelle Unterschiede aufweist. Zusätzlich sind die Zellorganellen sowie das Aktinzytoskelett der Zelle in einer für die Zelle spezifischen Anordnung aufzufinden.

Die Protrusion, also der Beginn der Migration, wird durch extrazelluläre Signale eingeleitet, die durch Wachstumsfaktoren, Chemokine, EZM-Proteine oder mechanische Krafteinwirkungen abgesandt werden (68, 99, 100).

Daraufhin breitet sich die vordere Zellmembran in Richtung des Signals aus, indem sie breite Lamellipodien, spitze Filopodien und Lamellen entwickelt, die durch die Polymerisierung der Aktinfilamente gestützt werden. Diese Prozesse werden durch die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen gesteuert, die durch Aktivierung weiterer Komplexe Einfluss auf die Aktinpolymerisierung haben (101-103). Innerhalb des Lamellipodiums sind die Aktinfilamente unterhalb der Membran verzweigt angeordnet. Durch einen starken retrograden Fluss, der durch den Widerstand an der Membran verursacht wird, kommt es zu einer Beeinflussung der darunter

liegenden Adhäsionen. An den Stellen, an denen das Lamellipodium mit dem Lamellum zusammenläuft (Transitionszone), findet die Reorganisation der verzweigten Aktinfilamente statt (104, 105). Die Kontraktion und die Formierung der Aktinbündelbildung werden durch Myosin-II kontrolliert. Myosin-II sorgt dafür, dass die antiparallel laufenden Aktinfasern gegeneinander gezogen werden (106). Die Aktivität des Myosin-II wird durch seine Phosphorylierung, die durch Kinasen und Phosphatasen gesteuert wird, beeinflusst. Durch die durch Myosin-II induzierte Spannung der Aktinstressfasern werden die Adhäsionen, die zuerst im Lamellipodium direkt unterhalb der Vorderkante der Zelle detektierbar sind, beeinflusst, obwohl Myosin II dort nicht lokalisierbar ist (107). Durch die Zusammenlagerung von vielen Adhäsions-assoziierten Proteinen wie Integrinen, Talin, Vinculin und Paxillin kommt es zu einer verstärkten Signalvermittlung innerhalb der Zelle (108-111). Wenn die Vorderkante der Zelle sich während der Migration vorwärtsbewegt, verändern sich die unreifen Adhäsionen, indem sie sich entweder auflösen oder es zu der Ausbildung von reiferen, größeren so genannten *Focal complexes* kommt. Dies ist wiederum induzierbar durch die auf die Zelle wirkende Spannung und Kontraktilität, die Myosin-II anhängig ist (112). Zusätzlich kommt es zu einer Konformationsänderung innerhalb der Adhäsions-assoziierten Proteine, die daraufhin z.B. phosphoryliert werden und somit weitere Andockstellen für zusätzliche Proteine und regulatorische Komponenten bereitstellen. Auch alpha-Aktinin beeinflusst durch die neue Aktinpolymerisierung oder die Reorganisation der Aktinfilamente am Übergang des Lamellipodiums und des Lamellums die Ausgangsfläche für eine weitere Reifung der Adhäsionen (105). Aus den fokalen Komplexen entstehen im Verlauf der Migration, wenn die Zelle über die Adhäsionen wandert, so genannte *Focal adhesions*.

Diese Adhäsionen sind am Zellende mit großen und langen Aktinfilament-Bündeln assoziiert, die Myosin-II enthalten und die Retraktion am Ende der Zelle mit der damit verbundenen Auflösung der Adhäsionen einleiten.

Die Retraktion und damit die Ablösung der Zelle von der EZM, die notwendig für die Bewegung der Zelle ist, wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst und gesteuert. Für die Retraktion ist die Auflösung der *Focal adhesions* wichtig. Dies erfolgt durch die stärkere Ausbildung von Mikrotubuli, worüber dann unterschiedliche Proteine, die die Auflösung der *Focal adhesions* induzieren, rekrutiert werden (113). So wird unter anderem FAK mobilisiert (114). Diese sorgt

über Induzierung von unterschiedlichen Kaskaden, wie z.B. die Rekrutierung von Dynamin, das für die Internalisierung der Integrine wichtig ist, für die Bereitstellung von anderen Proteinen, die essenziell für die Auflösung der *Focal adhesions* sind (115). FAK-defiziente Zellen zeigen eine reduzierte Rate an *Focal adhesion*-Umwandlungen und mehr *Focal adhesions* im *Steady State*, was ein weiteres Zeichen für die wichtige Rolle ist, die FAK für die Auflösung der *Focal adhesions* und damit für die Migration spielt (116). Über FAK kommt es auch zur Rekrutierung von verschiedenen Phosphatasen, wie der PTP-PEST, an die *Focal adhesions* (65). PTP-PEST, eine verkürzte Form von GLEPP1, ist ein essenziell wichtiger Regulator der Zellmigration und Adhäsion, denn über seine Bindung an FAK via P1N1 (Isomerase) kann es die Dephosphorylierung wichtiger *Focal adhesion*-assoziiierter Proteine steuern (117). Zum einen dephosphoryliert es FAK an Tyrosin 397 und kann somit diese Stelle für die erneute Phosphorylierung durch Src-Kinasen, die auch ein weiteres Substrat darstellen, bereitstellen. Folglich stellt PTP-PEST einen sehr wichtigen Regulator der *Focal adhesions* dar. Ebenso reguliert m-Calpain, eine Ca^{2+} -abhängige Protease, die Auflösung der *Focal adhesions*, da sie Proteine wie Paxillin, Talin und FAK von diesen trennt (117). Auch das Adapterprotein ZF21 sorgt über die Dephosphorylierung von FAK an Tyr 397 für den Abbau der *Focal adhesions* in Mikrotubuli-Abhängigkeit (118, 119).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Migration, die die unterschiedlichen Stadien der Aktinpolymerisierung und der *Focal adhesion*-Bildung beinhaltet, ein sehr komplexer Vorgang ist, der auch noch nicht in all seinen Einzelschritten vollends erforscht ist.

1.3.2.4 Migration des Podozyten

Die glomeruläre Filtrationsbarriere wurde bisher als statisches Modell angesehen. In mehreren Arbeiten wurde jedoch gezeigt, dass diese Grundidee verlassen werden sollte, da der glomeruläre Filter als dynamisches Konstrukt, das vor allem durch die Beweglichkeit der podozytären Fußfortsätze reguliert wird, funktioniert (120). Durch die Migrationsfähigkeit kann der Podozyt das dynamische Modell der glomerulären Filtrationsbarriere aufrechterhalten.

Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse und Kräfte, die von außen auf den Podozyten einwirken, muss er die Fähigkeit besitzen, sich gegebenenfalls durch Migration und Reorganisation des Aktinzytoskeletts zur Aufrechterhaltung eines konstanten Filters an diese anzupassen.

Whang et al. haben gezeigt, dass eine gewisse basale Beweglichkeit der Podozyten zur Aufrechterhaltung der intakten Filtrationsfunktion vorhanden sein muss, jedoch eine zu starke oder keine Beweglichkeit der podozytären Fußfortsätze dem glomerulären Filter schadet (121). Nach Reiser et al. lösen Stimuli, die zu einer Verflachung und Verklumpung der Fußfortsätze des Podozyten führen, eine Hypermobilität kultivierter Podozyten im Migrationsassay aus. Dies kann somit primär schädigend für den Filter sein (122, 123).

Generell hat der Podozyt einen klar geordneten zytoskelettalen Aufbau. Es können sich je nach Status des Podozyten *Stress Fibers*, auch Filopodien und Lamellipodien ausbilden. Die globale Organisation des Aktinzytoskeletts wird wie in oben beschriebenen Zelltypen durch kleine GTPasen gesteuert und durch weitere andere Aktin-bindende Proteine beeinflusst.

Durch die veröffentlichten Daten der mikroskopischen 2-Photonen-Untersuchung der lebenden Podozyten in Mäusen und Ratten wurde die Filtrationsbarriere der Niere, in der die Podozyten je nach Beeinflussung von außen sich durch Migration den Umständen dynamisch anpassen, als dynamisches Modell dargestellt (124, 125).

Zusätzlich zeigten Saleem et al. 2008, dass der Podozyt stark einer glatten Muskelzelle ähnelt, da er zum Teil gleiche charakteristische Proteine (wie Smoothelin und Calponin) exprimiert. So kann das dynamische Modell der Filtrationsbarriere durch die kontraktile Eigenschaft zusätzlich aufrechterhalten werden und sich den unterschiedlichen Krafteinwirkungen anpassen (126).

1.4 Ziele der Arbeit

Für die Aufrechterhaltung einer adäquaten Nierenfunktion ist ein intakter glomerulärer Filter essenziell.

In den letzten Jahren wurden wichtige neue Erkenntnisse bezüglich des genauen Aufbaus der podozytären Schlitzmembran, die insbesondere die einzelnen Proteine und deren Interaktionen betreffen, gewonnen.

Daraus leitete sich ein völlig neues Verständnis der glomerulären Schlitzmembran und der Pathogenese von vielen, mit Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen ab. Ein entscheidender prognostischer Faktor für den Verlauf der Erkrankungen ist der Grad der Proteinurie. Abhängig des Schweregrades kann dies in einer terminalen Niereninsuffizienz enden (127).

Des Weiteren hat sich die Annahme, der glomeruläre Filter sei ein statisches Konstrukt, dahingehend verändert, dass sich der glomeruläre Filter durch die Beweglichkeit der podozytären Fußfortsätze als dynamisches Modell zeigt.

Deshalb wollten wir in dieser Arbeit zum einen spezifische Proteine, vor allem GLEPP1 und seine Interaktionspartner, die für den glomerulären Filter wichtig sind, und zum anderen die Struktur und Funktion des Podozyten im Rahmen eines dynamischen Konstruktes untersuchen.

2 Methodik

2.1 Materialien und Lösungen

2.1.1 Zellkultur

HEK 293T-Zellen (*Human embryonic kidney*)

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 4,5 g/l Glucose und mit L-Glutamin und Zusatz von 10 % Kälberserum und Eisen (Biochrom, Deutschland)
Trypsin/EDTA 0,05 %/0,02 % in PBS ohne Magnesium und Calcium (Biochrom, Deutschland)

PBS Dulbecco (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) ohne Magnesium und Calcium (Biochrom, Deutschland)

2.1.2 Transfektion

Calciumchlorid 0,25 M

2x HEBS pH 7,05 (HEPES-gepufferte Kochsalzlösung)

- 49,9 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonat); 280,6 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄*H₂O

2.1.3 Plasmide und Vektoren

cdm.slg.7 (Surface Immunglobulin Domäne + Transmembrandomäne CD7)

cdm.slg.7.GLEPP1

cdm.slg.7.GLEPP1 843-936

cdm.slg.7.GLEPP1 843-1197

cdm.slg.7. GLEPP1 936-1197

cdm.slg.7. GLEPP1 936-1217

cdm.slg.7. GLEPP1 1197-1217

cdm.slg.7. GLEPP1.WPA

DEP1-HA (zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jörg Müller, Institut für molekulare Zellbiologie Jena, Deutschland)

Paxillin-GFP (zur Verfügung gestellt von Edward Manser, IMCB Singapore)

Cdm8

FAK-GFP (zur Verfügung gestellt von Ph.D, M.D. Kenneth M. Yamada, National Institutes of Health, Bethesda, USA)

2.1.4 Inhibitoren

PP2 10 mM (Calbiochem, USA)

Salicylsäure 0,01 mM (Sigma, USA)

Na₃VO₄ 0,1 mM

2.1.5 Detergenzien und Puffer

2x Laemmli

- 900 µl 2x stock (Tris pH 6,8 100mM; SDS (Sodiumdodecylsulfat) 4%; Glycerin 20%; 1 mg Bromphenol Blau)
- 100 µl DTT 1 M

IP- Puffer

- 1 % Triton X-100; 20 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 150 mM KCl; 20 mM Na₂VO₄;
1 Complete Mini (*Protease Inhibitor Cocktail Tablets*) (Roche, Deutschland);
0,004 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid) (Sigma, USA)

2.1.6 Co-Immunopräzipitation

Protein-G-Sepharose (GE Health Care)

Zentrifuge

- Eppendorf Centrifuge 5417R

2.1.7 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Polyacrylamidgel Zusammensetzung (1 Gel à 3,9 ml) 10%

	Trenngel	Sammelgel
Trenngelpuffer	2,25 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0 ml	0,8325 ml
Acrylamid 30 %	1,5 ml	0,2675 ml
Wasser	0,75 ml	0,5675 ml
APS 10 % (Ammonium- peroxidisulfat)	45 µl	20 µl
TEMED (N, N, N', N'- Tetra-Methyl- ethylendiamid)	7,5 µl	2,5 µl

Trenngelpuffer pH 8,8

- 360 mM Tris HCl pH 7,5; 1140 mM Tris Base; 0,4% SDS

Sammelgelpuffer pH 6,8

- 484 mM Tris HCl pH 7,5; 16 mM Tris Base; 0,4 % SDS

Laufpuffer

- 191,8 mM Glycin; 3,5 mM SDS; 247,7 mM Tris Base

Transferpuffer

- 30,9 mM Tris Base; 239,8 mM Glycin; 20 Vol % Methanol

Waschpuffer

- 12,9 mM Tris-HCl pH 7,5; 129 mM NaCl; Tween 20 0,13%

BSA (*Bovines Serum Albumin Protease Free*) (VWR Prolabo, Deutschland) 5 % in

Waschpuffer

Membran

- Nitrocellulose Transfer Membran (Whatman Protran, England)

Antikörper

Primärantikörper:

- Anti-human-IgG (HRP) (GE Healthcare, England), Western Blot:
Verdünnung

- 1:500 (gegen das humane IgG gerichteter Antikörper)
- Anti-Phosphotyrosine/4G10, monoklonaler Antikörper (Merck Millipore, Deutschland), Western Blot: Verdünnung 1:1500
 - Anti-Paxillin, monoklonaler Antikörper (Santa Cruz, USA), Western Blot: Verdünnung 1:800
 - Anti-HA, monoklonaler Antikörper (Roche, Deutschland), Western Blot: Verdünnung 1:500
 - Anti-GLEPP1, monoklonaler Antikörper (Bio Genex, Deutschland) , Western Blot: Verdünnung 1:200
 - Anti-FAK, monoklonaler Antikörper (Invitrogen, USA), Western Blot: Verdünnung 1:1000

Sekundärantikörper

- gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (Dako, Deutschland), Western Blot: Verdünnung 1:10 000
- gegen den Fc-Teil von Hasenantikörpern gerichtete Affen-Immunglobuline (GE Health Care, England), Western Blot: Verdünnung 1:7 500

ECL

- Lösung A: H₂O; 100 mM Tris pH 8,5; 2,5 mM Luminol (Fluka, USA); 0,4 mM Coumarin (Sigma, USA)
- Lösung B: H₂O; 100 mM Tris pH 8,5; 1,5 % H₂O₂

Membran für Westernblotentwicklung: Protan BA 95 Whatman 0,45 µm (GE Healthcare, England)

Bildwandler: Fluor Chem FC2 (Alpha Innotec, Deutschland)

2.1.8 DNA-Subklonierung

2.1.8.1 Ligation

1,5 % Low melting Agarose (Sigma, USA)

Laufpuffer (1xE)

- 2 ml 50xTAE (242 g Tris Base; 57,1 g Essigsäure; 0,5 M EDTA)
- 98 ml H₂O

- 5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)
- 15 µl (0,5 µg) Vektor-DNA nach Restriktionsenzymverdau
- 15 µl PCR-Produkt (Insert) nach Restriktionsenzymverdau
- 1 µl geschmolzener Vektoransatz (im Agarose Gel)
- 4 µl geschmolzener Insertansatz (im Agarose Gel)
- 2,5 µl 10x Ligationspuffer (MBI Fermentas, Litauen) von NEB
- 17,5 µl ddH₂O
- 0,2 µl T4-DNA-Ligase (400 000 U/ml; MBI Fermentas, Litauen) von NEB

2.1.8.2 Transformation/Amplifikation

- 50 µl E. coli MC1061 (für Ampicillin- und Kanamycinresistenz, MC1061 P3 für Tetracyclinresistenz)
- 1 µg zu amplifizierendes Plasmid bzw. 5 µl Ligationsprodukt
- LB-Agar-Platte (Ampicillin-/Tetracyclinresistenz) (Lenox L-Agar)
- 250 ml H₂O, 8g LB-Agar, 75 µl 10M NaOH

2.1.8.3 Minikultur und –präparation

Bakterienkolonien der Platten

Medium

- 20 g LB-Broth-Base (Sigma) auf 1000 ml ddH₂O
- 7 ml Ampicillin + 3 ml Tetracyclin (0,1 g/100 ml ddH₂O)

Qiagen® Plasmid Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

Restriktionsenzymverdau

- 26 µl ddH₂O
- 3 µl Reaktionspuffer (10x NEBuffer 2 bzw. 3; New England Biolabs Inc., England)
- 0,3 µl (Restriktionsendonuklease 1)
- 0,3 µl (Restriktionsendonuklease 2)
- 0,4 µl 100x BSA (Albumin Protease-freies Rinderserum) (VWR Prolabo, Deutschland)

Agarosegel

- 1 % Agarose Type II Medium EEO (Sigma, USA)
- 5 µl Lambda DNA-BstEII-Digest (New England Biolabs Inc., England)

2.1.8.4 Maxikultur und –präparation

200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur (siehe 2.1.8.3.)

200 ml LB-Medium (siehe 2.1.8.3.)

Qiagen® Plasmid Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland

100 % Isopropanol

70 % Ethanol zum Waschen

0,5 ml ddH₂O

Photometer

- Biophotometer Eppendorf

2.1.9 Immunfluoreszenz

Cos7-Zellen (Affen- Zellen)

Zellkultur (siehe 2.1.1.)

Transfektion (siehe 2.1.2.)

- zusätzlich FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche, Deutschland)
- zusätzlich DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 4,5 g/l Glucose und mit L-Glutamin ohne/mit Zusatz von 5% Kälberserum und Eisen

Permeabilisierung und Fixierung

- BSA (*Bovines Serum Albumin Protease Free*, VWR Prolabo, Deutschland) 4 % in 1% PBS
- 0,5% Triton X-100 in BSA 4%
- 4% Paraformaldehyd: 0,4 g PFA 1,0 ml dH₂O, 100 µl NaOH, 1% PBS (auf 10 ml)

Antikörper

- gelöst in 300 µl BSA (*Bovines Serum Albumin Protease Free*, VWR Prolabo, Deutschland) 4 % in PBS

Primärantikörper

- Anti-Phosphotyrosin/4G10, monoklonaler Antikörper (Millipore), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:100
- Anti-Paxillin, monoklonaler Antikörper (Santa Cruz, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:50
- Anti-FAK, monoklonaler Antikörper (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:200
- Anti-Vinculin, monoklonaler Antikörper (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:20
- Anti-Villin-1, monoklonaler Antikörper (Cell Signaling, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:20
- Anti-HA, monoklonaler Antikörper (Roche, Deutschland), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:200

Sekundärantikörper

- gegen das Fc-Teil von humanen Antikörpern gerichtete Hasen-Immunglobuline (Texas Red) (Jackson Immuno Research, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:50
- gegen das Fc-Teil von humanen Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (FITC) (ICN Biomedicals, Deutschland), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:500
- gegen das Fc-Teil von Maus-Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (FITC) (Jackson Immuno Research, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:50
- gegen das Fc-Teil von Maus-Antikörpern gerichtete Hasen-Immunglobuline (Texas Red) (Jackson Immuno Research, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:500
- gegen das Fc-Teil von Maus-Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (Alexa Fluor® 555) (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:1000

- gegen das Fc-Teil von Hasen-Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (Alexa Fluor® 555) (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:10.000
- gegen das Fc-Teil von Hasen-Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (Alexa Fluor® 594) (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:500
- gegen das Fc-Teil von Hasen-Antikörpern gerichtete Ziegen-Immunglobuline (Alexa Fluor® 647) (Invitrogen, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:500
- gegen das Fc-Teil von humanen Antikörpern gerichtete Hasen-Immunglobuline (Phalloidin Texas Red) (Jackson Immuno Research, USA), Immunfluoreszenz: Verdünnung 1:40

Mounting Medium

- ProLong Gold Antifade with Dapi (Invitrogen, USA)

Mikroskop

- Zeiss Axio Observer Z1
- Objektive: EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil; EC Plan-Neofluar 20x/0,5 M27
- Filter
 - Filtersatz 49 DAPI shift free (EX G 365, BS FT 395, EM BP 445/50)
 - Filtersatz 38 HE eGFP shift free (EX BP 470/40, BS FT 495, EM BP 525/50)
 - Filtersatz 43 HE Cys 3 shift free (EX BP 550/25, BS FT 570, EM BP 605/70)
 - Filtersatz 47 HE CFP shift free (EX BP 436/25, BS FT 455, EM BP 480/40)

2.2 Zellkultur

Für die Zellkulturversuche wurden HEK 293T-Zellen verwendet. Diese wurden in 10 cm Schalen in DMEM-Medium, das mit 10 % Kälberserum und Eisen versetzt wurde, kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Eine Subkultivierung der konfluenten Zellen erfolgte durch eine Trypsinisierung und eine, abhängig von der Dichte der Zellen, entsprechende Passage (1:6-1:8). Das alte Medium wurde dabei abgesaugt und die Platte anschließend mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Daraufhin wurde 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Schale

wurde für fünf Minuten in den Brutschrank zur Inkubation gestellt. Dadurch lösten sich die auf dem Schalengrund anhaftenden Zellen. Anschließend wurden die Zellen in DMEM-Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspensiert. Zum Schluss wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension auf entsprechend viele 10 cm Schalen aufgeteilt und über Nacht (8-12 Stunden) im Brutschrank kultiviert, um am nächsten Tag transfiziert werden zu können.

2.3 Transfektion

Zur Transfektion der am Vortag gesplitteten HEK 293T-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Methode angewendet. Diese Methodik basiert auf der Fähigkeit der Zellen, Calciumphosphatkristalle zu phagozytieren. Dadurch kann die kopräzipitierte Plasmid-DNA durch die Verbindung mit den Calciumkristallen von der Zelloberfläche absorbiert und so in die Zellen eingebracht werden.

Dafür wurde in Eppendorf-Gefäßen 8-10 µg DNA vorgelegt und unter dem sterilen Abzug erfolgte die Hinzugabe von 500 µl 0,25 M Calciumchlorid. Anschließend wurden 500 µl HEBS tropfenweise unter konstantem Vortexen des Eppendorf-Gefäßes hinzugefügt. Daraufhin wurde diese Transfektionslösung gleichmäßig auf das Kulturmedium der Zellen verteilt. Nach Inkubation im Brutschrank erfolgte nach 6-8 Stunden der Transfektionsstopp durch den Wechsel des Mediums.

2.4 Zellernte

Um die Zellen am nächsten Tag zu ernten, wurde das alte Medium abgesaugt und anschließend jede Schale mit 5 ml gekühltem PBS (4°C) abgelöst. Die nun in der PBS-Lösung befindlichen Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und dann für fünf Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das nun entstandene Pellet wurde nach Absaugen des Mediums gemäß seiner Größe in entsprechender Menge Triton 1% Lysis-Puffer (250 - 500 µl) resuspensiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Nach einer 15-minütigen Zelllyse auf Eis schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 15288 × g und 4°C an. Der so gewonnene Überstand wurde zu 10 % für die Lysatherstellung und die restliche Lösung wurde für die Co-

Immunopräzipitation verwendet. Der Überstand für die Lysatherstellung wurde mit der gleichen Menge 2x Laemmli versetzt, anschließend für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert und auf Eis gesetzt.

2.5 Co-Immunopräzipitation

Durch eine Co-Immunopräzipitation können Protein-Interaktionen nachgewiesen werden.

Hierfür wurden die zuvor transfizierten HEK 293T-Zellen wie oben beschrieben in PBS geerntet, in 250-500 µl IP-Puffer lysiert und nach Zentrifugation bei 15288 × g (15 Minuten, 4°C) wurde der entstandene Überstand zu 10% für das Lysat verwendet und der restliche Überstand für die eigentliche Co-Immunopräzipitation genutzt. Dazu wurde dieser mit 30 µl Protein-G-Sepharose versetzt und anschließend bei 4°C 60 Minuten auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Protein G ist ein bakterielles Zelloberflächenantigen aus Streptokokken, das die Eigenschaft besitzt, über eine spezifische Affinität zum Fc-Teil von IgG an die slg-Epitope der verwendeten Konstrukte zu binden, wodurch ein Protein-Sepharose-Komplex entsteht. Dieser Komplex wurde durch Zentrifugation (756 × g (3000 rpm), drei Minuten) am Boden der Eppendorf-Gefäße konzentriert und anschließend durch drei Waschgänge mit Triton 1% Lysis-Puffer mit zwischenzeitlicher Zentrifugation (756 × g, drei Minuten) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift erfolgte die Resuspension des Protein-Sepharose-Komplexes in 30 µl 2x Laemmli und die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C denaturiert, um im Western Blot weiterverwendet werden zu können.

2.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

Durch elektrophoretische Auftrennung können Proteine dauerhaft auf einer Membran fixiert und anschließend durch spezifische Antikörper angefärbt und somit sichtbar gemacht werden. Die exprimierten Proteine können durch diese Methode nach ihrer Größe und der relativen Menge eingeteilt werden. Zusätzlich sorgt das Detergenz SDS dafür, dass diese solubilisiert werden und zusätzlich eine negative Ladung erhalten, damit ihre Beweglichkeit im Gel allein von der Größe abhängig ist.

Die in der zuvor durchgeführten Zellernte und Co-Immunopräzipitation mit anschließender Denaturierung der Proteine entstandenen Lysate und IP-Proben wurden so aufgetrennt.

Je 15 µl einer Probe wurden in die Taschen des zuvor hergestellten 8 oder 10 %-igen Gels aufgetragen. Die Proteine wanderten dann im Sammelgel bei 70 Volt für 30 Minuten in Richtung Anode. Anschließend folgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel bei 20 mA für zwei Stunden. Durch das Tank-Blot-Verfahren folgte der elektrophoretische Transfer auf eine proteinbindende Membran, die aus Nitrozellulosemembran besteht.

Um überschüssige, unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu entfernen, wurde diese für mindestens eine Stunde in BSA (5% in Waschpuffer) bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Durchführung der nun folgenden Inkubationsschritte fand unter Raumtemperatur statt.

Die Membran wurde nach drei Waschsritten à fünf Minuten mit Waschpuffer für mindestens eine Stunde mit dem Primärantikörper (Konzentration siehe 2.1.7.) inkubiert. Daraufhin folgte ein erneutes Waschen der Membran, um den überschüssigen Antikörper, der keine Antigen-Antikörper Bindung eingegangen war, zu entfernen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindung wurde der Blot mit dem Sekundärantikörper inkubiert, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist.

Nach einer 30-minütigen Inkubation wurde die Membran erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurde sie in einer ECL-Lösung für eine Minute inkubiert, um durch die folgende Chemilumineszenz Reaktion die Proteine sichtbar machen zu können. Danach erfolgten die Entwicklung der Membran im Imager und die Dokumentation der entstandenen Lichtemissionen.

2.7 DNA-Subklonierung

2.7.1 Ligation

Als Ligation bezeichnet man den Einbau von Protein-kodierenden DNA-Abschnitten (Inserts) in Expressionsvektoren (bakterielle Plasmide). Dabei werden zwei DNA- oder RNA-Segmente an ihren Enden enzymkatalytisch verknüpft.

Der Vektor und der als Insert benutzte DNA-Abschnitt wurden für drei Stunden bei 37°C mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Es schloss sich eine Gelelektrophorese für 30 Minuten bei 80 mV auf einem 1,5 %igen Low-melting-Agarose-Gel an. Das Insert und der Vektor wurden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und bei 70°C geschmolzen. Nun wurde ein neuer Reagenzansatz angesetzt, der sich aus 1 µl des geschmolzenen Vektors, 4 µl des geschmolzenen Inserts, 2,5 µl 10x Ligasepuffer, 0,2 µl T4-DNA-Ligase und 17,5 µl H₂O zusammensetzte und dann bei Raumtemperatur für zwei Stunden inkubiert wurde. Es folgte die Transformation des Ligationsansatzes in chemisch kompetenten Bakterien.

2.7.2 Transformation und Amplifikation

Bei der Transformation wird von kompetenten Bakterienstämmen fremde DNA (Plasmid-DNA) aus der Umgebung aufgenommen. Aufgrund der Vermehrung der Bakterien werden die Plasmide dann vervielfältigt und an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch eine schnelle Amplifikation von rekombinanter DNA möglich ist.

Für die durchgeführten Versuche wurden MC1061/P3-Bakterienstämme, die eine Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz ausbilden, verwendet.

1 µg des zu amplifizierenden Plasmids wurde mit 50 µl der Bakteriensuspension vermischt, anschließend für 15 Minuten auf Eis und danach für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde das komplette Volumen der transformierten Zellen auf einer mit den entsprechenden Antibiotika behandelten Agarplatte mittels eines Drigalskyspatels ausgestrichen und zur Inkubation über Nacht bei 37°C in den

Brutschrank gestellt. Der Erfolg einer Transformation konnte am nächsten Morgen anhand des Wachstums der Bakterienkolonien auf der Agarplatte überprüft werden.

2.7.3 Erzeugung einer GLEPP1-Mutante mittels *site-directed Mutagenesis*

Zur Erzeugung einer Mutante des GLEPP1 Gens wurde die Methode der *site-directed mutagenesis* (ortsspezifische Mutagenese) angewendet. Hierbei werden einzelne Basen in einer bestimmten DNA-Sequenz ausgetauscht und somit ändert sich die genetische Information.

Zur Erzeugung von GLEPP1 WPA wurde eine PCR mit folgenden Primern benutzt: *Forward primer* 5' CTACACTGCATGGCCTGCTCATGGTGTG CCACAGC 3' und der *reverse primer* 5' CACCATGAGCAG GCCATGCAGTGTAGTTAAAATGC 3'. Das PCR-Produkt wurde anschließend durch eine Phenol-Extraktion gereinigt, mit dem Restriktionsenzym *Dpn I* behandelt und in kompetente Bakterienstämme transformiert (128).

Der zytoplasmatische Teil des GLEPP1 WPA-Konstruktes wurde mit *MluI/NotI* in den CD16.7 Vektor oder in die pCDM8 Kassette, die führende Sequenz von CD5, gebunden an die CH2 und CH3 Domänen des humanen IgG1 mit anschließender transmembranärer CD7 Region, geklont.

2.7.4 Minikultur und Minipräparation

Zwei der bei der Transformation gewonnenen Bakterienkolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und jeweils in ein mit 3 ml LB-Medium und den entsprechenden Antibiotika (entsprechend den bakteriellen Resistenzen Tetracyclin und/oder Ampicillin) gefülltes Röhrchen gegeben. Anschließend inkubierten diese für mindestens 8 Stunden bei 37°C auf einem Rotor (220 U/min), bis es zu einer Trübung des Mediums kam. Die Gewinnung der bakteriellen Plasmid-DNA erfolgte gemäß dem Hersteller Protokoll (Maxi QIAfilter™ Plasmid Kit) von QIAGEN.

2.7.5 Maxikultur und Maxipräparation

Um eine weitere Vervielfachung der bakteriellen Plasmid-DNA zu erreichen, wurde nach erfolgreicher Amplifikation eine Maxikultur in einem sterilen Erlenmeyer-Kolben mit 200 µl Bakteriensuspension aus der Minikultur und 200 ml LB-Medium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (entsprechend den bakteriellen Resistenzen Tetracyclin und/oder Ampicillin) angesetzt. Diese wurde für 12 Stunden bei 37°C auf einem Rotor (220 U/min) inkubiert. In einem ersten Schritt wurde hierfür die Kultur zunächst bei 1478 v (4400 rpm, 4°C, 15 Minuten) zentrifugiert und der entstandene Überstand verworfen. Die anschließende Isolation der DNA aus dem so gebildeten Bakterien-Pellet erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Maxi QIAfilter™ Plasmid Kit) von QIAGEN.

Das so gewonnene DNA-Pellet wurde in 200 µl ddH₂O aufgenommen und es erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration in dieser Lösung bei 260 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren in Lösung) im Photometer. Die Konzentration ergab sich dabei entsprechend dem Lambert-Eaton-Gesetz in µg/ml.

Um den Erfolg der Amplifikation zu sehen, wurde nach einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau entsprechend den eingebauten Schnittstellen eine Gelelektrophorese in einem Agarosegel durchgeführt.

2.8 Immunfluoreszenz

Ziel der Immunfluoreszenz ist es, mit Hilfe von Antikörpern Proteine oder Zellstrukturen sichtbar zu machen. Dabei wird ein spezifisch gegen das zu detektierende Protein (Antigen) gerichteter Antikörper verwendet.

Für die Versuche wurden Cos7 Zellen benutzt. Diese wurden in 10 cm Schalen in DMEM-Medium, das mit 10 % Kälberserum und Eisen versetzt worden war, kultiviert und in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Eine Subkultivierung wurde denen der HEK293T entsprechend durchgeführt. Im Anschluss daran wurden diese dann jedoch in 12-Well Platten, die zuvor mit jeweils einem autoklavierten Glasplättchen pro Well versehen worden waren, aufgeteilt. Anschließend erfolgte am nächsten Morgen die Durchführung der Transfektion

mittels Fugen®, bei dem es sich um ein lipophiles Transfektionsreagenz handelt. Dafür wurden zuerst pro Datenpunkt je 3 µl Fugen®-Reagens mit je 50 µl Hungermedium (ohne Zusatz von FCS) für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurde dem geplanten Versuch gemäß 1µg DNA hinzugefügt und für 30-45 Minuten unter der Sterilbank inkubiert. Die so entstandene Transfektionslösung wurde nun gleichmäßig auf das Kulturmedium der Zellen verteilt. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank folgte der Transfektionsstopp durch Wechseln des Kulturmediums auf ein Medium, das mit 5% FCS versetzt ist. Nach weiteren 24 Stunden konnte dann die eigentliche Immunfluoreszenz untersucht werden. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und jedes Well der 12-Well-Platte mit ca. 1 ml gekühltem PBS (4°C) dreimal vorsichtig durch Pipettieren des PBS an den Rand gewaschen. Bei allen durchgeführten Versuchspunkten war darauf zu achten, dass die Glasplättchen immer mit Lösung bedeckt waren. Anschließend wurde die Fixierung der Zellen auf den Plättchen vorgenommen, indem 500 µl 4 % Paraformaldehyd vorsichtig in jedes Well pipettiert wurden und nach einer Inkubation von 10 Minuten erfolgte durch dreimaliges Waschen mit PBS die komplette Entfernung des Fixiermediums. Daraufhin schloss sich die Permeabilisierung der Zellen durch die Hinzugabe von 0.5 % Triton in 4% BSA für fünf Minuten an. Durch die folgenden drei Waschschrte wurde auch der Puffer entfernt. Als zweite Fixierungs- und Permeabilisierungsmethode wurde Methanol-Aceton verwendet, was in einem Verhältnis von 80 zu 20% angemischt und bei -20°C kühl gelagert wurde. Dabei wurden 500 µl der Lösung anstatt des PFA und des Tritons auf die Zellen gegeben. Das Auftreten eines weißlichen Filmes auf den Deckgläschen nach ein paar Sekunden spricht für die Aufnahme der Lösung in die Zellen. Nun wurde das Deckgläschen aus dem Well entfernt und es folgten drei Waschschrte mit PBS. Es schloss sich die 30-minütige Inkubation der Zellen mit dem spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichteten Primärantikörper, von dem 300 µl in jedes Well gegeben wurden, an. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Inkubation für 30 Minuten mit dem Sekundärantikörper, der den Primärantikörper spezifisch erkennen kann und der zusätzlich noch mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war. Zum Entfernen des nicht gebundenen Antikörpers schlossen sich drei Waschschrte in PBS an. Anschließend wurden die Deckgläschen mit Mounting Medium, das Dapi zur Darstellung des Zellkerns enthält, auf dem vorher

beschrifteten Objektträger eingedeckt. Für die Negativkontrolle wurde die Färbung mit einer dem Antikörper-Isotyp entsprechenden Ig-Kontrolle verwendet.

Für die Darstellung der angefärbten Zellen wurden diese nun mit einem Zeiss Axio Mikroskop mit 63x Öl-Immersionsobjektiv unter Verwendung der entsprechenden Filter (siehe 2.1.9.) fotografiert.

2.9 Densitometrie und Statistik

Zur quantitativen Auswertung der Proteinbanden der Immunoblots wurde von Alpha Innotech das Software-Programm *FluorChem AlphaEase FC2* zur Durchführung densitometrischer Messungen benutzt.

Der zu messende Bereich der Proteinbande wurde manuell mittels rechteckiger Box um die Bande festgelegt und die Anzahl der Grauton-Pixel wurde dann in diesem Bereich mittels Densitometrie gemessen.

Nach Abzug der Hintergrund-Pixel können die gemessenen Pixel als direkt proportional zur Proteinmenge angesehen werden, sodass dadurch Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinmenge in dem gemessenen Bereich gezogen werden können.

Pro Experiment wurden mehrere Versuche durchgeführt und die erhobenen Daten gemittelt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software Graph Pad Prism Version 6.0c. verwendet. Angegeben wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde keine Normalverteilung angenommen und daher wurde, sofern nicht anders angegeben, der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert < 0,05 angenommen.

Zusätzlich wurde der ANOVA mit Kurskal-Wallis-Test bei einem Experiment angewendet, da mehr als zwei Stichproben vorlagen.

3 Ergebnisse

3.1 GLEPP1 interagiert mit Proteinen der *Focal adhesions*

3.1.1 Interaktion von GLEPP1 mit Paxillin

Es wurde in vorherigen Publikationen gezeigt, dass GLEPP1 den Aufbau von *Focal adhesions* und die damit assoziierten Proteine und Bindungspartner beeinflussen und folglich Einfluss auf die dynamischen Veränderungen der *Focal adhesions* haben kann. Bereits in Makrophagen wurde dargelegt, dass Paxillin ein wichtiges Protein der *Focal adhesions* ist, sodass wir dies in epithelialen Zellen (HEK 293T Zellen) überprüfen wollten.

Dafür wurden HEK 293T-Zellen mit GFP-markiertem Paxillin und N-terminal slg.7.-markiertem GLEPP1 und GLEPP1 WPA (einer Mutante von GLEPP1) bzw. mit leerem slg.7.-Vektor als Kontrolle cotransfiziert.

Nach anschließender Co-Immunopräzipitation mit Protein-G-Sepharose (Präzipitation von slg.7) wurden die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Western-Blotting auf eine Membran gebracht. Danach erfolgte eine Inkubation mit einem anti-Paxillin-Antikörper. Es konnte gezeigt werden, dass Paxillin und GLEPP1 sowie GLEPP1 WPA interagieren (Abb. 1). Im Expressionsvergleich wurde der Blot mit anti-human-IgG-Färbung inkubiert und es lässt sich eine gleichmäßige Expression für GLEPP1 in allen Ansätzen nachweisen.

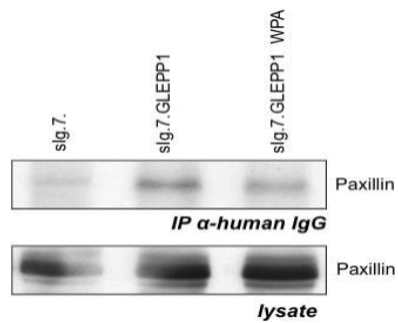


Abb. 1: GLEPP1 interagiert mit Paxillin. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg.7), slg.7.GLEPP1, einer GLEPP1 Mutante (slg.7.GLEPP1 WPA) und Paxillin-GFP cotransfiziert. slg, GLEPP1 und GLEPP1 WPA wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert und die entstandenen Immunkomplexe mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit anti-Paxillin-Antikörpern inkubiert. Bei gleicher Expression von Paxillin in den Lysaten zeigt sich eine Co-Immunopräzipitation von slg.7.GLEPP1 und slg.7.GLEPP1 WPA mit Paxillin.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob Paxillin mit DEP1-HA (Protein Tyrosin Phosphatase J) interagiert. DEP1-HA ist eine weitere Phosphatase aus der gleichen Familie der Tyrosin-Phosphatasen, zu der auch GLEPP1 gehört, die mit dem HA-Vektor markiert wurde. Ziel der Untersuchung war es, die Spezifität der Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin aufzuzeigen.

Dafür wurden HEK293T-Zellen mit einem Ansatz von GFP-markiertem Paxillin und DEP1-HA inkubiert. Als Kontrollansatz wurde F.GFP verwendet. Nach der folgenden Co-Immunopräzipitation unter Inkubation mit einem Paxillin-Antikörper und anschließender Verwendung von Protein-G-Sepharose folgten die SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting mit einem HA-Antikörper. Es konnte keine Interaktion zwischen DEP1-HA und Paxillin nachgewiesen werden (Abb. 2).

Dieses Experiment legt daher die Vermutung nahe, dass die Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin spezifisch ist.

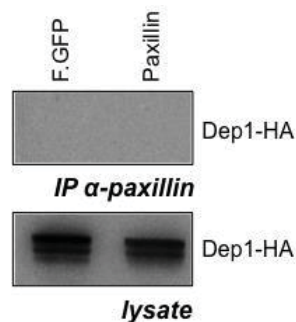


Abb. 2: Paxillin interagiert nicht mit DEP1-HA. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (F.GFP), Paxillin-GFP und DEP1-HA cotransfiziert. Paxillin wurde mit einem Paxillin-Antikörper für eine Stunde inkubiert und mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert. Der entstandene Immunkomplex wurde mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-Blotting mit einem HA-Antikörper inkubiert. Bei gleichmäßiger Expression von DEP1-HA zeigt Paxillin keine Interaktion mit DEP1-HA. Die Expression von Paxillin-GFP wurde durch Färbung mit einem Paxillin-Antikörper überprüft.

Es konnte gezeigt werden, dass GLEPP1 ein spezifischer Interaktionspartner von Paxillin ist. Da Paxillin multiple Domänen zur Bindung von unterschiedlichen Interaktionspartnern zur Rekrutierung und Signalweitergabe besitzt, stellte sich die Frage nach der näheren Charakterisierung der Interaktionsstelle auf Seiten von GLEPP1. Dafür wurden zunächst GLEPP1-Truncations, die als Plasmide unterschiedliche Aminosäure-Abschnitte des kompletten GLEPP1-Plasmids darstellen, generiert (slg.7.GLEPP1 843-1217 entspricht dem kompletten zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1, slg.7.GLEPP1 843-936, slg.7.GLEPP1 843-1197, slg.7.GLEPP1 936-1197, slg.7.GLEPP1 936-1217, slg.7.GLEPP1 1197-1217) (Abb. 3). Diese GLEPP1-Truncations stellen verkürzte Formen des zytoplasmatischen GLEPP1-Abschnittes dar (Abb. 3).

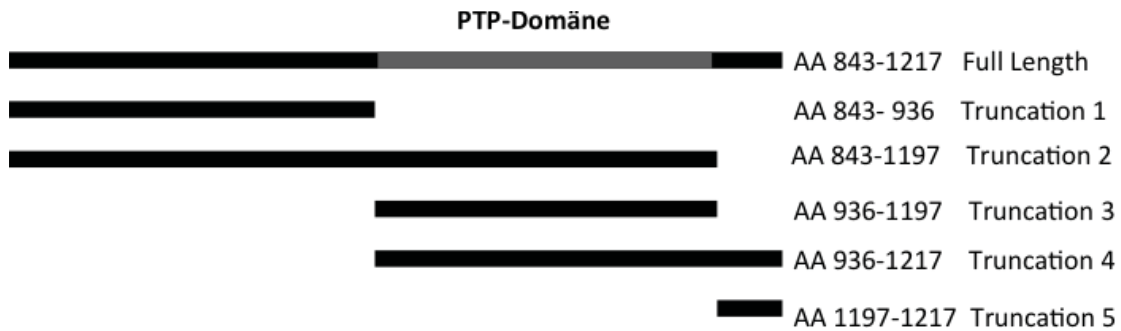


Abb. 3: GLEPP1-Truncations. Die Abbildung zeigt in der oberen Zeile den zytoplasmatischen Anteil von GLEPP1 mit der Phosphatase Region (PTP-Region) und darunter die Truncations 1-5 mit Beschreibung der Länge anhand ihrer Aminosäuren.

Die N-terminal slg.7.-markierten GLEPP1-Truncations wurden in separaten Ansätzen mit GFP-markiertem Paxillin in HEK 293T-Zellen cotransfiziert. Nach der durchgeführten Co-Immunopräzipitation mittels Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Inkubation mit einem Paxillin-Antikörper zeigte sich eine Interaktion von GLEPP1 und Paxillin-GFP an Truncation 2 (AA 843-1197) und Truncation 5 (AA 1197-1217) (Abb. 4).

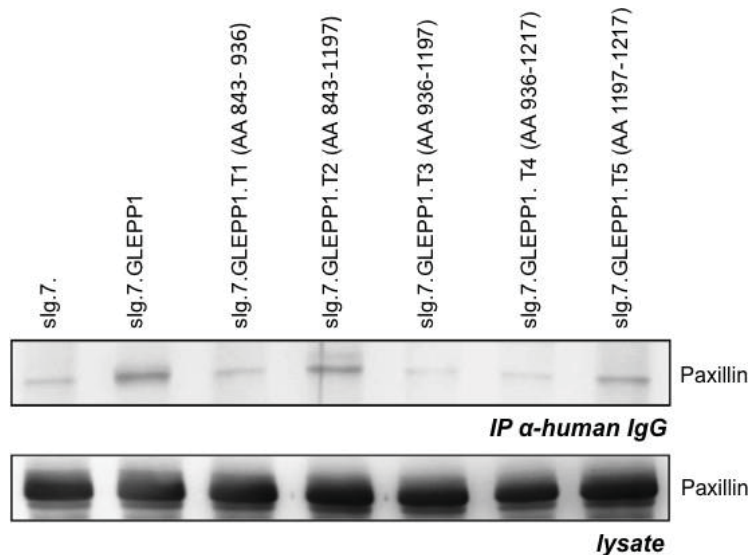


Abb. 4: Eingrenzung der GLEPP1-Paxillin-Interaktion. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg), den verschiedenen GLEPP1-Truncations (slg.7.GLEPP1 843-936, slg.7.GLEPP1 843-1197, slg.7.GLEPP1 936-1197, slg.7.GLEPP1 936-1217, slg.7.GLEPP1 1197-1217) und jeweils Paxillin-GFP cotransfiziert. Die Truncations wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert. Die entstandenen Immunkomplexe wurden mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit einem Paxillin-Antikörper inkubiert. Bei GLEPP1 und den Truncations 2 und 5 zeigte sich ein starkes Signal im Western Blot, wohingegen die anderen Truncations nicht mit Paxillin interagieren. Unten: Lysate zum Nachweis der gleichmäßigen Paxillin-Expression.

3.1.2 Keine Interaktion von GLEPP1 mit FAK

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der *Focal adhesions* ist FAK (*focal adhesion associated kinase*). Daher wollten wir untersuchen, ob auch GLEPP1 eine Interaktion mit FAK eingeht.

Dafür wurden HEK 293T-Zellen mit FAK-GFP und slg.7.GLEPP1 bzw. slg.7. als Kontrolle cotransfiziert. Anschließend erfolgte die Co-Immunopräzipitation mittels SDS-Gelpage und Western Blot. Durch die Inkubation mit einem FAK-Antikörper konnte keine Interaktion zwischen GLEPP1 und FAK-GFP detektiert werden (Abb. 5).

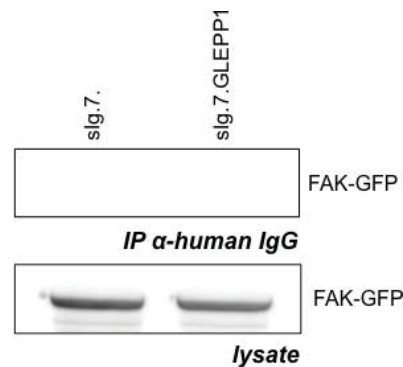


Abb. 5: GLEPP1 interagiert nicht mit FAK. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg.7), slg.7.GLEPP1 und jeweils FAK-GFP cotransfiziert. slg und slg.7.GLEPP1 wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert und die entstandenen Immunkomplexe mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit einem FAK-Antikörper inkubiert. Es findet keine Interaktion zwischen slg.7.GLEPP1 und FAK-GFP statt. Unten: Lysate zum Nachweis der gleichmäßigen FAK-Expression.

3.2 Modulatoren der GLEPP1-Paxillin-Interaktion

3.2.1 Mögliche Verstärkung der Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch FAK

FAK (*focal adhesion associated kinase*) nimmt als zytosolische Tyrosinkinase eine zentrale Rolle in der Plastizität der *Focal adhesions* ein. Obwohl keine direkte Interaktion für GLEPP1 und FAK gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden, ob FAK Einfluss auf die Bindung von GLEPP1 und Paxillin hat. Da keine direkte Bindung zwischen GLEPP1 und FAK gezeigt werden konnte, stellten wir die

Hypothese auf, dass FAK aufgrund der Fähigkeit der direkten Phosphorylierung von Paxillin Einfluss auf die Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin nehmen könnte. Daher führten wir eine Co-Immunopräzipitation mit Paxillin-GFP und jeweils slg.7.GLEPP1 bzw. slg.7. mit FAK-GFP bzw. dem Kontrollvektor durch. Nach Präzipitation von slg.7., SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Inkubation mit einem Paxillin-Antikörper ließ sich eine verstärkte Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin in Anwesenheit von FAK vermuten, dies konnte jedoch nicht als statistisch signifikant nachgewiesen werden (Abb. 6).

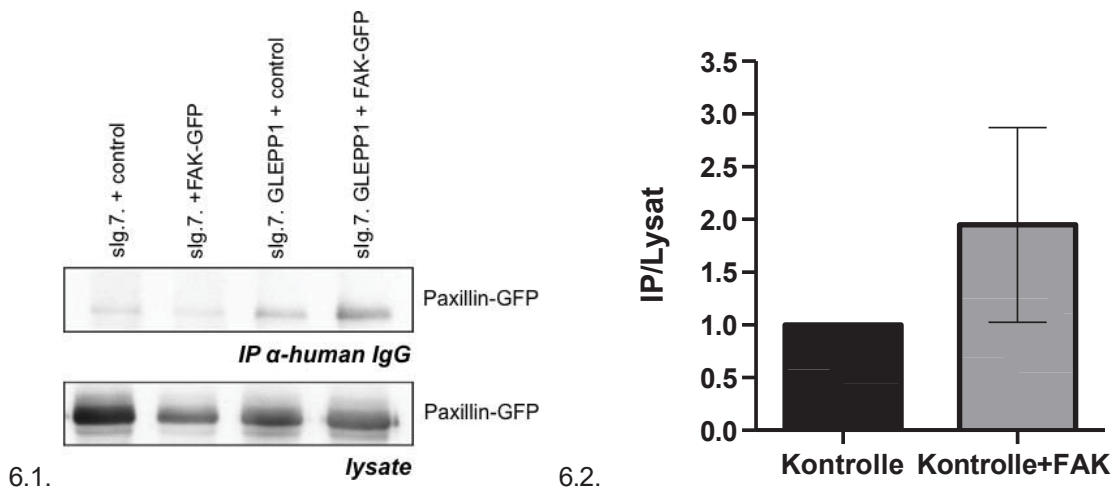


Abb. 6: Beeinflussung der Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin durch FAK. 6.1. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg.7), slg.7.GLEPP1 und FAK- GFP oder dem Kontrollvektor und jeweils Paxillin-GFP cotransfiziert. slg.7 und slg.7.GLEPP1 wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert und die entstandenen Immunkomplexe mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit einem Paxillin-Antikörper inkubiert. Es zeigt sich eine verstärkte Interaktion von slg.7.GLEPP1 und Paxillin-GFP in Anwesenheit von FAK. Unten: Lysate zum Nachweis der gleichmäßigen Paxillin-Expression. 6.2. Die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet und die Werte als Quotient der IP-Werte durch die Lysat-Werte (IP/Lysat) grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test), $n=3$, $p=0,7$, $MW = 1,92 \pm 0,923$.

3.2.2 Abschwächung der Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch Src-Inhibition

In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, wenn auch nicht statistisch signifikant nachweisbar, dass die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin unter FAK zunimmt. Zusätzlich beeinflusst Paxillin nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierung entweder durch FAK direkt oder über Src-Kinasen die Zellmotilität. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass unter einer Hemmung der Src-Kinasen durch PP2,

einem spezifischen Tyrosin-Kinase-Inhibitor, die Interaktion beeinflusst werden könnte.

Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit Paxillin-GFP und slg.7.GLEPP1 bzw. slg.7. als Kontrolle cotransfiziert. Eine Stunde vor der Ernte erfolgte die Zugabe von 10 μ M PP2 zu einem Ansatz mit slg.7.GLEPP1 und dem Kontrollvektor. Nach der Co-Immunopräzipitation mittels Protein-G-Sepharose, SDS-Gelelektrophorese und Western Blot erfolgte die Inkubation mit einem Paxillin-Antikörper. Durch die Hemmung der Src-Kinasen durch PP2 ließ sich eine abgeschwächte Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin nachweisen, die sich jedoch nicht als statistisch signifikant darstellen ließ (Abb. 7). Dies legt jedoch die Vermutung nahe, dass die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch Tyrosin Kinasen (Src-Kinasen) positiv beeinflusst werden kann.

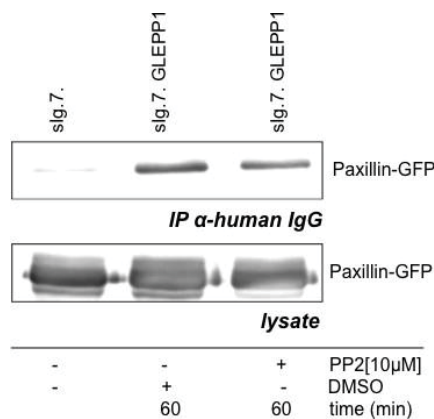


Abb. 7: Die Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin wird durch PP2 (Tyrosin-Kinase-Inhibitor) abgeschwächt. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg.7.), slg.7.GLEPP1 und jeweils Paxillin-GFP cotransfiziert. Eine Stunde vor Zellernte erfolgte die Zugabe von 10 μ M PP2, einem Src-Kinase-Inhibitor. slg.7. und slg.7.GLEPP1 wurde mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert und die entstandenen Immunkomplexe mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit Paxillin-Antikörper inkubiert. Im Westernblot zeigt sich eine verminderte Interaktion von GLEPP1 und Paxillin unter der Zugabe von PP2. Unten: Lysate zum Nachweis der gleichmäßigen Paxillin-Expression.

3.2.3 Abgeschwächte Interaktion mit Paxillin als Folge der Hemmung von GLEPP1 durch Salicylsäure

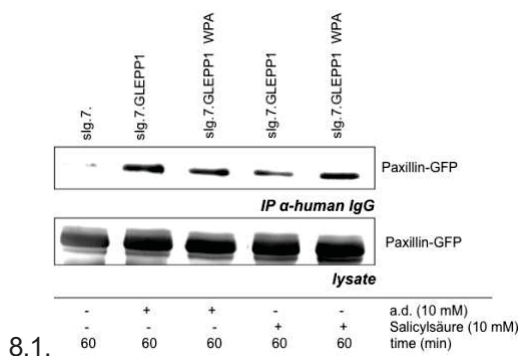
Salicylsäure-Derivate hemmen die Phosphatase-Aktivität von GLEPP1 (129). Um die Inhibition der Phosphataseaktivität von GLEPP1 zu untersuchen, setzten wir

Salicylsäure als Inhibitor ein. Zunächst sollte die Interaktion von GLEPP1 mit Paxillin unter Inhibition der Phosphataseaktivität von GLEPP1 beleuchtet werden.

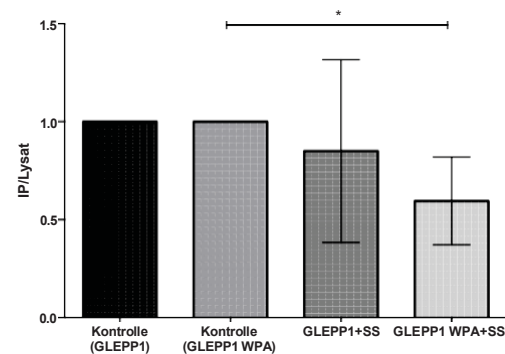
Es wurden HEK 293T-Zellen mit Paxillin-GFP und slg.7.GLEPP1, slg.7.GLEPP1.WPA bzw. slg.7. als Kontrolle cotransfiziert. Eine Stunde vor der Ernte erfolgte die Zugabe von 10 mM Salicylsäure zu je einem Ansatz mit GLEPP1 oder der WPA-Mutante.

Anschließend wurde die Co-Immunopräzipitation wie unter 2.8. beschrieben durchgeführt. Die Inkubation mit einem gegen Paxillin gerichteten Antikörper wies die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin nach.

Wie in Abb. 8 gezeigt werden konnte, kam es zu einer Abschwächung dieser Interaktion unter Einfluss von Salicylsäure, die jedoch statistisch nicht signifikant war.



8.1.



8.2.

Abb. 8: Die Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin wird durch Salicylsäure (Phosphatase-Inhibitor) abgeschwächt. 8.1. HEK293T-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor (slg.7.), slg.7.GLEPP1, slg.7.GLEPP1 WPA und jeweils Paxillin-GFP cotransfiziert. Eine Stunde vor Zellernte erfolgte die Zugabe von 10 mM Salicylsäure, einem Phosphatase-Inhibitor. slg.7., slg.7.GLEPP1 und slg.7.GLEPP1 WPA wurden mit Protein-G-Sepharose immunopräzipitiert und die entstandenen Immunkomplexe mittels SDS-Gelpage aufgetrennt und nach Western-Blotting mit Paxillin-Antikörper inkubiert. Im Westernblot ließ sich eine verminderte Interaktion von GLEPP1/GLEPP1 WPA und Paxillin unter der Zugabe von Salicylsäure vermuten. 8.2. Die Ergebnisse von vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden densitometrisch ausgewertet und die Werte als Quotient der IP-Werte durch die Lysat-Werte (IP/Lysat) grafisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA (Kruskal-Wallis-Test), $n=4$, Kontrolle (GLEPP1) vs. GLEPP1+SS: $p=0,36$, $MW = 0,85 \pm 0,47$. Kontrolle (GLEPP1 WPA) vs. GLEPP1 WPA+SS: $p=0,03$, $MW = 0,54 \pm 0,22$, * = $p \leq 0,05$.

3.3 Die Rolle von GLEPP1 für die zytoskelettale Architektur der Zelle

3.3.1 GLEPP1 hat keinen Einfluss auf die Modulation des Aktinzytoskeletts

Für GLEPP1 sind je nach Organsystem unterschiedliche spezifische Funktionen bekannt. In GLEPP1-knock-out-Mäusen wurde gezeigt, dass eine fehlende Expression von GLEPP1 zu strukturellen Veränderungen der Fußfortsätze (Verklumpung, Verlust der oktopoiden Struktur) führt und somit die dynamische Regulation der podozytären Fußfortsätze beeinflusst. Daher sollte die potentielle Rolle von GLEPP1 auf das Aktinzytoskelett und die Zellstruktur untersucht werden. Hierfür wurden Cos7-Zellen, die GLEPP1 oder den Kontrollvektor (slg) exprimierten, verwendet. Die Zellen wurden entweder mittels der Methanol-Aceton- Methode oder durch Zugabe von Paraformaldehyd und Triton Lysispuffer permeabilisiert und fixiert, mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert und anschließend folgte das Eindeckeln auf dem Objektträger mittels Mounting-Medium. Zur Darstellung des möglichen Einflusses von GLEPP1 auf das Aktinzytoskelett wurden diese jeweils unterschiedlich angefärbt. Die Anfärbung von GLEPP1 erfolgte mittels eines FITC-markiertem anti-human-IgG. Um das Zytoskelett fluoreszenz-mikroskopisch darstellen zu können, wurde Phalloidin Texas Red verwendet, der spezifisch die Aktinfilamente rot anfärbt. Zur Detektierung des möglichen Einflusses von GLEPP1 auf Veränderungen des Aktinzytoskeletts wurden Zellen, die den Kontrollvektor slg exprimierten, mit denen, die GLEPP1 exprimierten, verglichen. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss von GLEPP1 auf den zytoskelettalen Aufbau der Zellen. Die Anfärbung von GLEPP1 ließ kleine wabenartige Strukturen mit Darstellung von kleineren zytosolischen Ansammlungen erkennen. Je nach Motilität der Zelle lagen diese entweder näher am Nucleolus oder aber an den Ausläufern der Zelle.

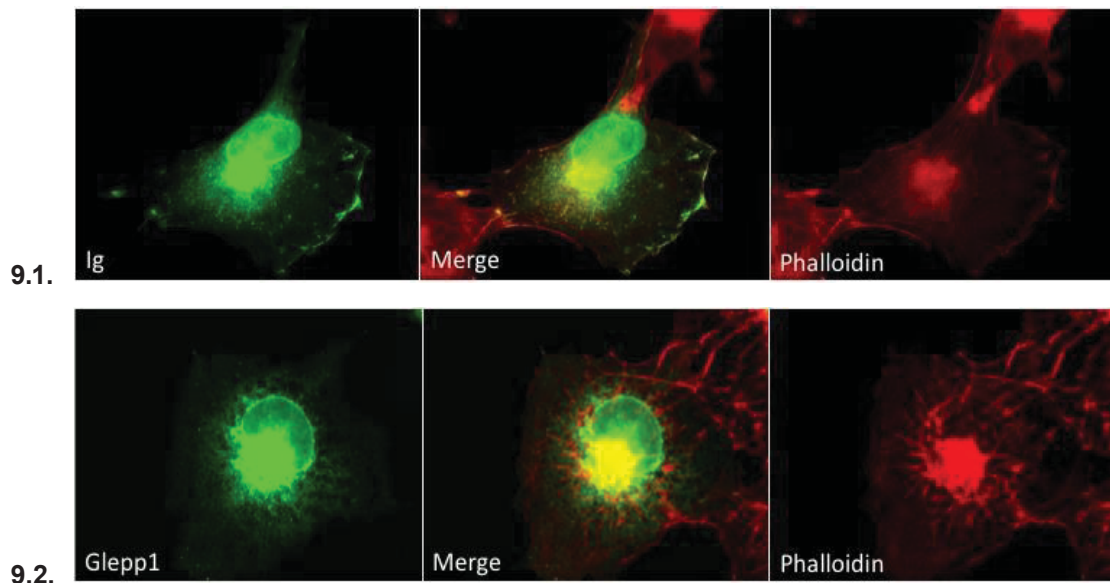
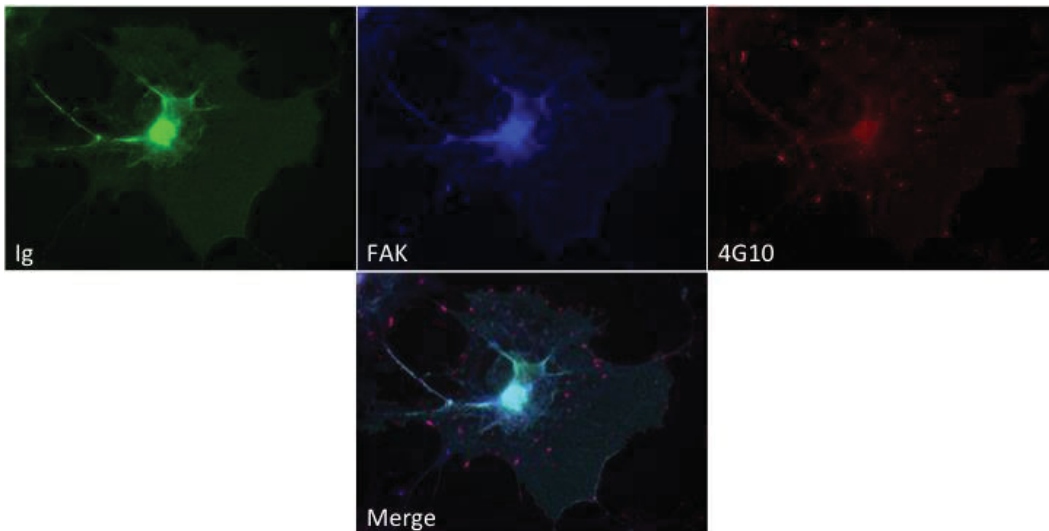


Abb. 9: Keine Beeinflussung des Aktinzytoskeletts durch GLEPP1. 9.1.: Anfärbung von Cos7-Zellen, die slg als Kontrollvektor exprimieren, mit anti-human-IgG-FITC (grün) und des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin (rot). Mittig ist der *Merge* zur Darstellung beider Färbungen gemeinsam gezeigt. 9.2.: Anfärbung von Cos7-Zellen zur Darstellung des exprimierten GLEPP1 durch anti-human-IgG-FITC (grün) und des Aktinzytoskeletts durch Phalloidin (rot). Mittig der *Merge* zur Darstellung der Lokalisation von GLEPP1 am zytoskelettalen Aktin. Mikroskop: Zeiss Axio Observer Z1, Objektive: EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil (Endvergrößerung 78,75).

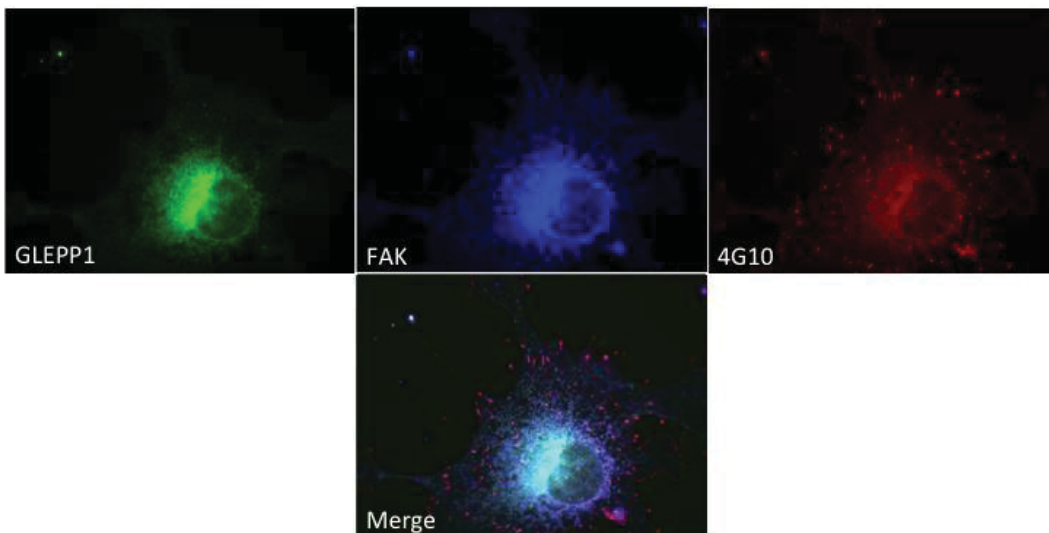
3.3.2 GLEPP1 colokalisiert nicht mit Proteinen der *Focal adhesions*

Da GLEPP1, wie in den vorherigen Ergebnissen aufgeführt, mit Paxillin, einem *Focal-adhesion*-assoziiertem Protein, interagiert, wollten wir untersuchen, ob GLEPP1 in den *Focal adhesions*, die wichtig für das Anheften der Zelle an die extrazelluläre Matrix, aber auch die Migration sind, lokalisierbar ist.

GLEPP1-exprimierende Cos7-Zellen wurden dafür nach Permeabilisierung und Fixierung durch die Methanol-Aceton-Methodik und anschließender Inkubation mit anti-human-IgG-FITC (grün) dargestellt. Zusätzlich wurden die *Focal adhesions* durch die Anfärbung mit anti-4G10 (Phosphotyrosin) und dem Sekundär-Antikörper anti-Maus Alexa 555 (rot) veranschaulicht. Des Weiteren wurde FAK durch anti-FAK und den sekundären Antikörper anti-rabbit Alexa 594 (blau) angefärbt. So konnte die *Focal adhesion* detektiert werden. Im anschließend durchgeführten *Merge* konnte eine Colokalisation von FAK in den *Focal adhesions* gezeigt werden, die sich durch das überlappende Anfärben der *Focal adhesions* (pink) darstellte. GLEPP1 jedoch konnte nicht mit diesen colokalisiert werden.



10.1.



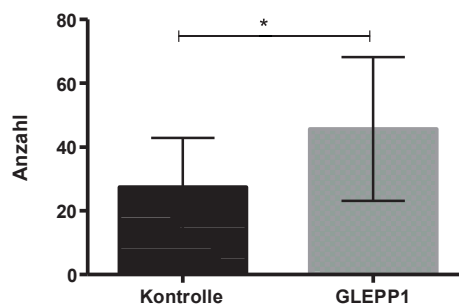
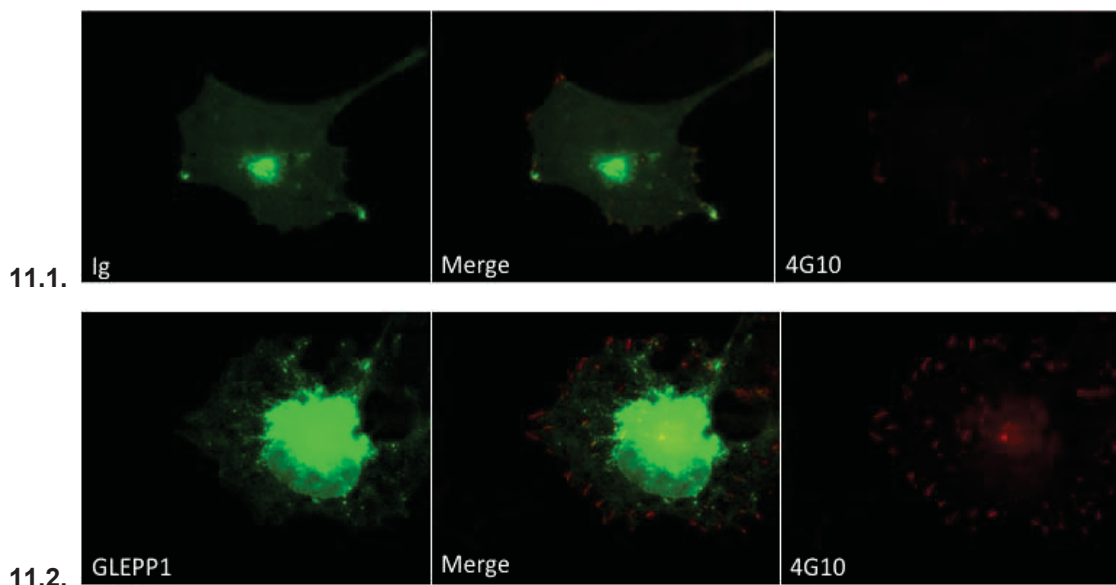
10.2.

Abb. 10: GLEPP1 kann nicht in den *Focal adhesions* lokalisiert werden. 10.1.: Anfärbung von Cos7-Zellen, die slg als Kontrollvektor exprimieren, mit anti-human-IgG-FITC (grün), der FAK (*focal adhesion associated kinase*) durch den primären Antikörper anti-FAK und sekundär durch anti-rabbit Alexa 594 (blau) und von Phosphotyrosin als Marker für die *Focal adhesions* (rot). Der Merge zeigt, dass FAK an den *Focal adhesions* colokalisierbar ist, jedoch Ig nicht. 10.2.: Anfärbung von Cos7-Zellen, die GLEPP1 exprimieren, mit anti-human-IgG-FITC (grün), der FAK durch den primären Antikörper anti-FAK und sekundär durch anti-rabbit Alexa 594 (blau) und von Phosphotyrosin als Marker für die *Focal adhesions* (rot). Der Merge zeigt, dass FAK an den *Focal adhesions* colokalisierbar ist (pink), jedoch GLEPP1 nicht in den *Focal adhesions* detektierbar ist. Mikroskop: Zeiss Axio Observer Z1, Objektive: EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil (Endvergrößerung 78,75).

3.3.3 GLEPP1 führt zur verstärkten Ausbildung von *Focal adhesions*

GLEPP1 konnte nicht in den *Focal Adhesions* lokalisiert werden, jedoch stellten wir uns die Frage, ob GLEPP1 trotzdem die Ausbildung dieser beeinflussen könnte.

Dafür wurden GLEPP1 und slg-exprimierende Cos7-Zellen mittels der Methanol-Aceton-Methodik fixiert sowie permeabilisiert. Anschließend wurden die Immunfluoreszenz-Färbungen von den *Focal adhesions* durch anti-4G10 (Phosphotyrosin) und den Sekundär-Antikörper anti-mouse Alexa 555 (rot) und von GLEPP1 bzw. dem Kontrollvektor durch anti-human-IgG-FITC (grün) angefertigt. Die Ergebnisse in Abb. 11 zeigten, dass GLEPP1-exprimierende Zellen eine erhöhte Anzahl an *Focal adhesions* aufweisen.



11.3.

Abb. 11: GLEPP1 führt zur verstärkten Ausbildung von *Focal adhesions*. 11.1.: Anfärbung von Cos7-Zellen, die slg als Kontrollvektor exprimieren, mit anti-human-IgG-FITC (grün) und von Phosphotyrosin als Marker für die *Focal adhesions* (rot). Mittig der Merge zur Darstellung beider Färbungen gemeinsam. 11.2.: Anfärbung von Cos7-Zellen zur Darstellung des exprimierten GLEPP1 durch anti-human-IgG-FITC (grün) und Phosphotyrosin als Marker für die *Focal adhesions* (rot). Mittig der Merge zur Darstellung der Lokalisation von GLEPP1 an den *Focal adhesions*. Mikroskop: Zeiss Axio Observer Z1, Objektive: EC Plan-Neofluar 63x/1,25 Oil. 11.3.: Graphische Darstellung der Anzahl der *Focal adhesions* in Cos7-Zellen, die slg als Kontrollvektor oder GLEPP1 exprimieren. Auf der x-Achse sind jeweils die Expression von slg (Kontrolle) und GLEPP1 und auf der y-Achse die Anzahl der *Focal adhesions* dargestellt. Unter dem Einfluss von GLEPP1 kommt es zur verstärkten Ausbildung von *Focal adhesions* in Cos7-Zellen. n=16, p= 0,0122, *.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Wesentlich für die Ultrafiltration des Plasmas ist der glomeruläre Filter, der aus drei Schichten aufgebaut ist: dem gefensterten Endothel der Kapillarschlingen, der Basalmembran und der Schlitzmembran, die durch die Fußfortsätze der Podozyten gebildet wird (131).

Bezüglich des genauen Aufbaues der Schlitzmembran, insbesondere der interagierenden Proteine, wurden in den letzten Jahren viele neue Erkenntnisse gewonnen.

Daraus resultierte ein neues Verständnis der Pathogenese vieler mit einer Proteinurie assoziierten Nierenerkrankungen (127).

Zusätzlich hat sich durch verschiedene Publikationen das alte Bild des glomerulären Filters als statisches Konstrukt dahingehend verändert, dass durch die Beweglichkeit der podozytären Fußfortsätze der glomeruläre Filter eher als dynamisches Modell anzusehen ist.

Daher sollten in dieser Arbeit die Interaktion spezifischer Proteine der Schlitzmembran und zum anderen die Struktur und Funktion des Podozyten im Rahmen eines dynamischen Konstruktes untersucht werden.

In Zellkulturmodellen wurde gezeigt, dass GLEPP1 mit Paxillin, einem Protein der *Focal adhesions*, das für die Zellmigration und -stabilität zuständig ist, interagiert (56, 91, 132). Zusätzlich scheint diese Interaktion durch FAK (*focal adhesion associated kinase*) gestärkt zu werden. Da Paxillin nach seiner Aktivierung durch Phosphorylierung entweder durch FAK direkt oder über Src-Kinasen die Zellmotilität beeinflusst, wurde die Hypothese aufgestellt, dass unter einer Hemmung der Src-Kinasen durch PP2, einem spezifischen Tyrosin-Kinase-Inhibitor, die Interaktion beeinflusst werden könnte (95). Dies ließ sich auch in den durchgeführten Versuchen nachweisen, jedoch aufgrund der niedrigen n-Zahl nicht als statistisch signifikant. Das Gleiche zeigte sich auch bezüglich der durch die Hemmung von GLEPP1 durch Salicylsäure geminderten Interaktion mit Paxillin. Somit konnte ein weiterer Einflussfaktor für die Zellmotilität dargestellt werden (129).

In den durchgeführten Immunfluoreszenzen wurde durch Darstellung von GLEPP1 und unterschiedlichen Zellkomponenten deutlich, dass GLEPP1 keinen Einfluss auf

das Aktinzytoskelett hat und auch nicht mit Proteinen der *Focal adhesions* colokalisiert, jedoch zu einer verstärkten Ausbildung der *Focal adhesions* führt (57).

4.2 Relevanz des podozytären Proteins GLEPP1 für die Entstehung einer Proteinurie

GLEPP1, das zu den Rezeptortyrosinphosphatasen gehört, wird auf der apikalen Zellmembran von Podozyten exprimiert (44).

Es wird in unterschiedlichen Organen exprimiert und übernimmt je nach Organsystem unterschiedliche Aufgaben (43, 44, 46). In der Niere dient es unter anderem als Marker für die glomeruläre Schädigung bei unterschiedlichen Nierenerkrankungen, wie der IgA-Nephropathie, dem idiopathischen nephrotischen Syndrom, unterschiedlichen Formen der fokal segmentalen Glomerulosklerose und der Minimal-Change Glomerulonephritis (14, 36, 49-52). Ozaltin et al. bestätigten 2011, dass es durch eine Mutation des Gens, das für GLEPP1 kodiert, zu der Ausbildung des nephrotischen Syndroms in der Kindheit kommt (36). Histologisch konnte bei zwei Indexpatienten eine Minimal-Change Erkrankung bzw. eine fokal segmentale Glomerulosklerose gesichert werden. Aus tierexperimentellen Versuchen mit GLEPP1 defizienten Mäusen ist zudem bekannt, dass GLEPP1-defiziente Mäuse verkürzte und verplumpte Fußfortsätze aufweisen (130). Bei GLEPP1 defizienten Mäusen im Alter von 6-8 Wochen konnten jedoch keine Unterschiede in der Proteinurie im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren gefunden werden.

Zwischenzeitlich wurde in Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass GLEPP1-defiziente Mäuse im Alter von 6 Monaten eine Eiweißausscheidung im Mikroalbuminuriebereich entwickeln. Histologisch fällt hier zudem eine Verschmelzung der podozytären Fußfortsätze in bestimmten Arealen des Glomerulums auf. Weitere tierexperimentelle Daten unterstützen die Wichtigkeit von GLEPP1 für die Integrität des Podozyten. Im Modell der PAN-induzierten Nephritis fällt eine verminderte GLEPP1 Expression bei verplumpten und reduzierten Fußfortsätzen auf (133).

Somit weisen die oben genannten Erkenntnisse aus humanen und tierexperimentellen Studien einvernehmlich darauf hin, dass GLEPP1 für die Integrität des Podozyten unter physiologischen als auch pathophysiologischen Umständen essenziell ist. Insbesondere scheint der Verlust von GLEPP1 mit dem podozytären Zytoskelett zu interferieren (verplumpte und verkürzte Fußfortsätze in GLEPP1-defizienten Mäusen) (130). Ziel dieser Arbeit war es daher, die molekulare Funktion von GLEPP1 für das podozytäre Zytoskelett zu identifizieren.

Das Konstrukt des glomerulären Filters erwies sich als dynamisches Modell, in dem den podozytären Fußfortsätzen eine wichtige Rolle zugeschrieben wird. Für die Beweglichkeit der Fußfortsätze ist das Zusammenspiel mehrerer Proteine notwendig, die die *Focal adhesions* bilden und die die Verbindung der Zelle zur extrazellulären Matrix darstellen (134). Daher sollte in dieser Arbeit unter anderem den Einfluss von GLEPP1 auf die *Focal adhesions* und damit auf die Migrationsfähigkeit der Zellen untersucht werden.

4.3 Bedeutung und Modulation von *Focal adhesions* im Podozyten durch GLEPP1

4.3.1 Podozyten und *Focal adhesions*

In Podozyten kommt den *Focal adhesions* eine bedeutende Aufgabe als Bindungselement zur extrazellulären Matrix (EZM) zu. Dies erfolgt über das zytoskelettale Aktin der Fußfortsätze (70).

Die *Focal adhesions* sorgen dafür, dass der Podozyt seine Rolle als Filtrationsbarriereelement effektiv wahrnehmen kann und für einen intakten Filter sorgt.

Die *Focal adhesions* adaptieren sich dynamisch an die unterschiedlichen sensorischen und mechanischen Krafteinwirkungen, die auf den Podozyten einwirken. Des Weiteren sind sie für das migratorische Verhalten der Podozyten verantwortlich, denn nur durch das Zusammenspiel des Auf- und Abbaus der *Focal adhesions* an unterschiedlichen Stellen der Zelle kann es zur gerichteten Migration kommen (134).

Daher sorgt eine Veränderung der *Focal adhesions* im Sinne einer Auflösung und Veränderung der Zusammensetzung für eine veränderte Struktur des Podozyten und führt zu einer Beeinflussung der Dynamik desselben.

Mehr als 180 Proteine bilden in dem Podozyten die *Focal adhesions*, die den Podozyten an die extrazelluläre Matrix über das Integrin-Clustering binden (135). Eine wichtige Kinase ist unter anderem FAK (*focal adhesion associated kinase*), die im Rahmen der Podozytenschädigung aktiviert wird. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung von FAK die Podozyten vor einem glomerulären Schaden geschützt wurden und die Tiere keine Proteinurie entwickelten (136). Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass es in durch Doxorubicin verletzten Podozyten zu einer Veränderung der *Focal adhesions* kommt und somit die zytoskelettale Struktur bis hin zur Fußfortsatzverflachung verändert wird (137).

Somit stellen die *Focal adhesions* einen zentralen, beeinflussbaren Punkt für die Dynamik des Podozyten dar. Aufgrund dieser Tatsache sollte untersucht werden, inwieweit GLEPP1 die Migration über die Beeinflussung der *Focal adhesions* steuern kann.

4.3.2 GLEPP1 und die Beeinflussung *Focal adhesions*-assoziierter Proteine

Um den Einfluss von GLEPP1 auf die *Focal adhesions* nachzuweisen, galt es, die Interaktionen von GLEPP1 mit *Focal adhesion*-assozierten Proteinen (unter anderem Paxillin und FAK) darzustellen.

Paxillin ist ein 68-70 kDa großes Protein, das in den *Focal adhesions* exprimiert wird, dort eine wichtige Rolle als Adapterprotein einnimmt und somit den dynamischen Wechsel bei der Zelladhäsion, dem zytoskelettalen Rearrangement und der Genexpression, die wichtig für die Migration und das Überleben der Zelle sind, kontrolliert (73).

In Makrophagen konnte die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin schon aufgezeigt werden. PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase PEST*), ein verkürztes Homolog von GLEPP1, bindet an die LIM3 und 4 Domäne von Paxillin und reguliert darüber

die Zellausbreitung, Migration und Protrusion durch Modulation der Rac1 und RhoA Aktivität (91-93).

Da sich Makrophagen jedoch in ihrer Morphologie und ihrem Verhalten stark von epithelialen Zellen unterscheiden, untersuchten wir die Interaktion auch in epithelialen Zellen. Mittels Immunpräzipitation und anschließendem Western-Blotting konnte die Interaktion zwischen GLEPP1 und Paxillin in HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Weiterführend konnten durch Truncation-Mapping die Aminosäuresequenzen AA 843-1197 (Truncation 2) und AA 1197-1217 (Truncation 5) als Interaktionsstellen von Paxillin mit GLEPP1 detektiert werden. Die Truncation 2 beinhaltet die Phosphatasedomäne. Weitere Domänen wurden bisher im GLEPP1 C-Terminus nicht beschrieben. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass diese beiden GLEPP1-Domänen notwendig für die GLEPP1-Paxillin-Bindung sind. Die anderen GLEPP1-Truncations zeigten überraschenderweise jedoch keine Interaktion mit Paxillin-GFP, obwohl Truncation 2 die Truncations 1 (AA 843-936) und 3 (AA 936-1197) beinhaltet und Truncation 5 einen Teil der Truncation 4 (AA 936-1217) bildet.

Dies legt den Verdacht nahe, dass möglicherweise zwei Bindungsstellen (Truncation 2 und 5) vorhanden sein müssen, damit eine spezifische Bindung stattfinden kann. Alternativ liegt eine regulatorische Domäne vor, die die Bindungsdomäne moduliert.

Eine Interaktion zwischen GLEPP1 und FAK als Bestandteil der *Focal adhesions* konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde der positive Einfluss von FAK auf die Bindung von Paxillin und GLEPP1 in Makrophagen beschrieben (58). Dieses konnte auch in epithelialen Zellen (HEK293T) nachgewiesen werden, jedoch bislang aufgrund einer niedrigen n-Zahl als nicht statistisch signifikant, sodass weitere Versuche erfolgen sollten.

Möglicherweise kommt es durch die Phosphorylierung von Paxillin durch FAK zur Ausbildung der möglichen Bindungsstelle zwischen GLEPP1 und Paxillin. Diese Vermutung müsste jedoch durch weitere Versuche bestätigt werden.

Gobert et al. zeigten in Makrophagen, dass durch Inhibierung von PTPRO durch Salicylsäure-Derivate die Chemotaxis aufgrund von Hemmung der Dephosphorylierung von Paxillin und Syk1 blockiert wird (129).

Daran anlehnend konnten wir darlegen, dass durch Hinzugabe von Salicylsäure die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin geschwächt wird und somit auch das

Migrationsverhalten beeinflusst werden könnte. Dies sollte in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Ein wichtiger Interaktionspartner von Paxillin sind die Src-Kinasen, die Paxillin direkt oder indirekt über Phosphorylierung aktivieren können. Src-Kinasen sind in der Lage, so weitere für die Ausbildung der *Focal adhesions* wichtige Proteine zu aktivieren und zu rekrutieren (82). GLEPP1 könnte daher als Phosphatase diese unterschiedlichen Mechanismen beeinflussen. Daher galt es zu untersuchen, inwieweit die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin durch die Hemmung der Src-Kinasen beeinflusst werden könnte.

Es wurde deutlich, dass es durch Hemmung mittels PP2, einem Src-Kinase-Inhibitor, zu einer geschwächten Interaktion kommt, was jedoch aufgrund der geringen Versuchszahl nicht statistisch ausgewertet werden konnte, jedoch die Vermutung nahelegt, dass die Interaktion von GLEPP1 und Paxillin Src-abhängig ist.

Diese Annahme wird durch Daten von Harder et al. unterstützt, die zeigen konnten, dass in Epidermoid-Karzinom-Zellen die erhöhte Expression von PTPalpha, einer Rezeptorthyrosin-Phosphatase, verwandt mit GLEPP1, zu einer erhöhten Expression von Src-Kinasen führt und Paxillin in erhöhtem Maße in seiner phosphorylierten Form vorliegt (138).

Wiggins et al. stellten dar, dass es in GLEPP1 defizienten Mäusen zu einer Veränderung der Fußfortsätze im Sinne einer Verplumpung und Verkürzung kommt und somit zu vermuten ist, dass Veränderungen in der GLEPP1-Expression eine Veränderung der Adhäsion an der glomerulären Basalmembran (GBM) zur Folge haben kann (19). Diese Veränderung kann unter anderem durch die Beeinflussung der *Focal adhesions*, die in den podozytären Fußfortsätzen sitzen und die Verbindung zur GBM darstellen, zustande kommen. Somit wollten wir die Rolle von GLEPP1 für die Migration und die Beeinflussung der *Focal adhesions* in weiteren Experimenten untersuchen, denn auch in der Arbeit von Whang et al. wurde gezeigt, dass eine gewisse basale Beweglichkeit der podozytären Fußfortsätze zur Aufrechterhaltung eines intakten Filters notwendig zu sein scheint, sodass diesbezüglich die Rolle von GLEPP1 gegebenenfalls als migrationskoordinierend einzuschätzen ist. Extreme wie eine statische Rolle des Podozyten oder auch die

Hypermobilität scheinen eine Fußfortsatz-Veränderung herbeizurufen, die sich negativ auf die Filtrationsbarriere auswirkt (121).

4.4 Einfluss von GLEPP1 auf die Migration im Allgemeinen

Es konnte in tierexperimentellen Versuchen aufgezeigt werden, dass PTPRO (*protein tyrosine phosphatase receptor typ O*), Synonym für GLEPP 1, einen Einfluss auf die Chemotaxis von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen hat (56, 129). Durch Inhibition von PTPRO konnte die Phosphorylierung der PTPRO-Substrate Paxillin und Syk1 gehemmt und dadurch die Chemotaxis dieser Zellen im Modell der experimentellen chronisch entzündlichen Darmerkrankung blockiert werden (129). Des Weiteren steigert PTP phi (*protein tyrosine phosphatase phi*), eine verkürzte Isoform von GLEPP1, die Motilität von Makrophagen durch Dephosphorylierung seines Substrates Paxillin (56).

Es konnte somit der Einfluss von GLEPP1/PTPRO bzw. dessen verkürzter Form PTP phi auf den zytoskelettalen Aufbau von hämatologischen Zellen dargestellt werden. Wir vermuteten daher, dass GLEPP1 auch in der epithelialen Zelle des Glomerulums, dem Podozyten, analog das Migrationsverhalten und den Aufbau der *Focal adhesions* durch Paxillin beeinflussen könnte. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass PTP-PEST (*protein tyrosine phosphatase PEST*), eine zytosolische Phosphatase in Fibroblasten, das Auflösen von *Focal adhesions*, die Migration sowie die Zytokinese reguliert.

In PTP-PEST-defizienten Zellen zeigten sich eine Abnahme der Migration und eine Zunahme der *Focal adhesions* mit zusätzlicher Hyperphosphorylierung von p130Cas, FAK und Paxillin (57).

Die Wirkung von PTP-PEST wird vornehmlich über die Interaktion oder indirekte Beeinflussung unterschiedlicher Proteine, die für die Zellmigration und die *Focal adhesions* wichtig sind, gesteuert (57, 65). Ein wichtiger Interaktionspartner ist Paxillin, ein *Focal adhesion*-assoziiertes Protein, das direkt mit PTP-PEST interagiert und über das FAK indirekt eine Interaktion eingehen kann, sodass es Einfluss auf die Modulation der *Focal adhesions* nehmen kann (58).

2013 wurde erstmals das hochdynamische Konzept der Schlitzmembran und somit der Podozyten mittels Multiphotonen-Mikroskopie untersucht. Es wurde gezeigt, dass es sowohl in der intakten Niere als auch anschließend vermehrt durch Induktion einer Schädigung der Nephrone in vivo zu einer Migration der entdifferenzierten Podozyten kommt (125). Dies belegt die These, dass durch die Beweglichkeit der Podozyten das dynamische Modell des glomerulären Filters auch nach Schädigung aufrechterhalten bleiben kann (120). Aufgrund der unterschiedlichen Einflüsse und Kräfte, die von außen auf den Podozyten einwirken, muss er die Fähigkeit besitzen, sich individuell zur Aufrechterhaltung eines konstanten Filters an diese, möglicherweise durch Migration und Reorganisation des Aktinzytoskeletts, anzupassen. Dies wird durch die Daten von Whang et al. belegt, die besagen, dass eine gewisse basale Beweglichkeit der Podozyten zur Aufrechterhaltung der intakten Filtrationsfunktion vorhanden sein muss (121). Durch die dargestellte Beeinflussung der Migration durch GLEPP1 und die verwandten Phosphatasen in anderen Zellentitäten sowie die Darstellung der Schlitzmembran als hochdynamisches Modell wird die These, dass GLEPP1 möglicherweise die Migration des Podozyten durch eine Veränderung der Expression in unterschiedlichen Erkrankungen, die mit einer Schädigung der Nephrone assoziiert sind, beeinflussen könnte, unterstützt.

4.5 Einfluss von GLEPP1 auf die Migration des Podozyten

Die *Focal adhesions* sind ein essenziell wichtiger Bestandteil für den reibungslosen Ablauf der Zellmigration und Proliferation.

In anderen Zellreihen konnte man sehen, dass GLEPP1 einen positiven Einfluss auf die Zellmigration hat, und wir wollten daher untersuchen, ob dies auch auf epitheliale Zellen/Podozyten übertragbar ist, denn das dynamische Gleichgewicht zwischen Beweglichkeit und Arrest ist auch für den Podozyten und das Aufrechterhalten des glomerulären Filters entscheidend.

In neuesten Untersuchungen konnte erstmalig die Migrationsfähigkeit von Podozyten durch die Multiphotonen-Mikroskopie dargestellt werden (125).

Die *Focal adhesions*, die sich an den Zellausläufern in migrierenden Zellen ausbilden, sind für die Migration relevant (139). Da GLEPP1 einen möglichen promigratorischen Effekt auch auf epitheliale Zellen hat, wollten wir dies anhand eines möglichen Effektes von GLEPP1 auf die *Focal adhesions* überprüfen. Dafür stellten wir im ersten Schritt diese in GLEPP1 exprimierenden Cos7-Zellen (epitheliale Nierenzellen des Affen) mittels Immunfluoreszenz dar. Es konnte keine Colokalisation von GLEPP1 an den *Focal adhesions* gezeigt werden. Es kam jedoch zu einem vermehrten Auftreten von *Focal adhesions* unter Anwesenheit von GLEPP1, was eine mögliche indirekte Beeinflussung dieser durch GLEPP1 zeigt. Dies könnte möglicherweise über die Aktivierung von Src-Kinasen durch GLEPP1 via direkter Dephosphorylierung erfolgen, die dann an die *Focal adhesions* rücken und somit Einfluss darauf nehmen können. Zum anderen kann über die Aktivierung von Paxillin durch seine Dephosphorylierung GLEPP1 Einfluss auf die *Focal adhesions* ausüben. Die *Focal adhesions* sind in ihrer komplexen Form einerseits für die Stabilisierung der Zelle am Untergrund zuständig, andererseits sorgen sie auch durch die weitere Rekrutierung von *Focal adhesion*-assoziierten Proteinen dafür, dass eine Bewegung der Zelle stattfinden kann. Durch die Ausbildung von *Focal adhesions* werden Verbindungen zu den am Zellende ausgebildeten Aktinfilament-Bündeln hergestellt, die dann die Retraktion auslösen und somit die Migration einleiten (67, 139).

4.6 Schlussfolgerung

Zusammenfassend unterstützen die durchgeführten Versuche unsere aufgestellte Hypothese, dass GLEPP1 durch die Interaktion mit spezifischen Schlitzmembranproteinen einen Einfluss auf die Zellmigration hat und somit essenziell für die Beweglichkeit des Podozyten und die Organisation des zytoskelettalen Aufbaus zu sein scheint.

Dies wurde sowohl durch die Durchführung von Co-Immunopräzipitationen von Proteinen der Schlitzmembran in Epithelzellen (HEK293T) als auch durch die Immunfluoreszenz mit Darstellung des strukturellen Aufbaus der Zelle belegt.

Es soll an dieser Stelle jedoch auch auf die begrenzenden Faktoren einiger Versuchsergebnisse hingewiesen werden.

Bei den durchgeführten Versuchen an HEK 293T-Zellen handelt es sich um Überexpressionsversuche, in denen die untersuchten Proteine in ihrer Menge auf das Vielfache der physiologischen Expression gesteigert wurden.

Ebenso zeigte sich die niedrige n-Zahl in den durchgeführten Co-Immunopräzipitationen als Limitation, sodass zum Teil keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Diesbezüglich gilt es, die n-Zahl noch zu erhöhen.

Zusätzlich wurde in den durchgeführten Experimenten der zytoplasmatische Anteil von GLEPP1 (GLEPP1.cyt), in dem die Phosphatase-Domäne zu finden ist, und nicht das gesamte GLEPP1 Molekül (GLEPP1 Full length) benutzt.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den hier beschriebenen Daten lediglich um Zellkulturdaten handelt, die an primären Zellen und in vivo (idealerweise mit 2-Photon-Imaging) bestätigt werden müssen.

Da wir in unseren Versuchen molekulare Prozesse im Sinne eines dynamischen Konstruktes untersuchten, ist die Durchführung der Versuche im Zellmodell sowie durch Überexpression legitim.

Insgesamt lässt sich die klinische Relevanz regulatorischer Proteine wie GLEPP1 für den glomerulären Filter als dynamisches Modell durch die durchgeführten Versuche bestätigen und die wichtige Funktion dieser Proteine für das Verständnis einer Vielzahl proteinurischer Nierenerkrankungen wird hierdurch hervorgehoben.

5 Literaturverzeichnis

1. Inker LA, Astor, B. C., Fox, C. H., Isakova, T., Lash, J. P., Peralta, C. A., ... & Feldman, H. I. . KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. . American Journal of Kidney Diseases. 2014;63(5):713-35.
2. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international*. 2005;67(6):2089-100.
3. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt KU, et al. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney international*. 2007;72(3):247-59.
4. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romundstad S, et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(8):2275-84.
5. Mitarbeiter GHu. *Innere Medizin*. Köln: Dr. med. Gerd Herold; 2013 2013.
6. Kriz W, Elger M, Lemley KV, Sakai T. Mesangial cell-glomerular basement membrane connections counteract glomerular capillary and mesangium expansion. *American journal of nephrology*. 1990;10 Suppl 1:4-13.
7. Henry CB, Duling BR. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *The American journal of physiology*. 1999;277(2 Pt 2):H508-14.
8. Satchell SC, & Braet, F. . Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2009;296(5):F947-F56.
9. Avasthi PS, Koshy V. Glomerular endothelial glycocalyx. *Contributions to nephrology*. 1988;68:104-13.
10. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(35):26033-6.
11. Kanwar YS, Liu ZZ, Kashihara N, Wallner EI. Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Seminars in nephrology*. 1991;11(4):390-413.
12. Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis. Evidence for formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1976;34(1):43-59.
13. Huang TW, Langlois JC. Podocandin. A new cell surface protein of the podocyte and endothelium. *The Journal of experimental medicine*. 1985;162(1):245-67.
14. Yang DH, Goyal M, Sharif K, Kershaw D, Thomas P, Dysko R, et al. Glomerular epithelial protein 1 and podocalyxin-like protein 1 in inflammatory glomerular disease (crescentic nephritis) in rabbit and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;74(3):571-84.

15. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG. Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *The Journal of cell biology*. 1984;98(4):1591-6.
16. Drenckhahn D, Franke RP. Ultrastructural organization of contractile and cytoskeletal proteins in glomerular podocytes of chicken, rat, and man. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1988;59(5):673-82.
17. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. *Anatomy and embryology*. 1995;192(5):385-97.
18. Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley KV. Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1995;5(10):1731-9.
19. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney international*. 2007;71(12):1205-14.
20. Barisoni L, Mundel P. Podocyte biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *American journal of nephrology*. 2003;23(5):353-60.
21. Kretzler M, Koeppen-Hagemann I, Kriz W. Podocyte damage is a critical step in the development of glomerulosclerosis in the uninephrectomised-desoxycorticosterone hypertensive rat. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1994;425(2):181-93.
22. Holthofer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I. Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1984;50(5):552-9.
23. Yaoita E, Kawasaki K, Yamamoto T, Kihara I. Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *The American journal of pathology*. 1990;136(4):899-908.
24. Adler S. Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *The American journal of pathology*. 1992;141(3):571-8.
25. Cosio FG. Cell-matrix adhesion receptors: relevance to glomerular pathology. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1992;20(3):294-305.
26. Cybulsky AV, Carbonetto S, Huang Q, McTavish AJ, Cyr MD. Adhesion of rat glomerular epithelial cells to extracellular matrices: role of beta 1 integrins. *Kidney international*. 1992;42(5):1099-106.
27. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(4):918-26.
28. Roselli S, Heidet L, Sich M, Henger A, Kretzler M, Gubler MC, et al. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(2):550-60.
29. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(14):4829-36.
30. Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstadt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003;17(1):115-7.
31. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*. 1999;286(5438):312-5.

32. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *The Journal of cell biology*. 1990;111(3):1255-63.
33. Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. Podocyte biology for the bedside. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2011;58(5):835-45.
34. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular cell*. 1998;1(4):575-82.
35. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature genetics*. 2000;24(4):349-54.
36. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M, et al. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *American journal of human genetics*. 2011;89(1):139-47.
37. Ryan GB, Rodewald R, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in aminonucleoside nephrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1975;33(5):461-8.
38. Kanwar YS, Rosenzweig LJ. Altered glomerular permeability as a result of focal detachment of the visceral epithelium. *Kidney international*. 1982;21(4):565-74.
39. Laurens W, Battaglia C, Foglieni C, De Vos R, Malanchini B, Van Damme B, et al. Direct podocyte damage in the single nephron leads to albuminuria in vivo. *Kidney international*. 1995;47(4):1078-86.
40. Whiteside C, Prutis K, Cameron R, Thompson J. Glomerular epithelial detachment, not reduced charge density, correlates with proteinuria in adriamycin and puromycin nephrosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1989;61(6):650-60.
41. Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *The American journal of pathology*. 1987;126(2):220-9.
42. Kerjaschki D. Polycation-induced dislocation of slit diaphragms and formation of cell junctions in rat kidney glomeruli: the effects of low temperature, divalent cations, colchicine, and cytochalasin B. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1978;39(5):430-40.
43. Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics*. 1995;27(1):174-81.
44. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(31):19953-62.
45. Seimiya H, Sawabe T, Inazawa J, Tsuruo T. Cloning, expression and chromosomal localization of a novel gene for protein tyrosine phosphatase (PTP-U2) induced by various differentiation-inducing agents. *Oncogene*. 1995;10(9):1731-8.

46. Aguiar RC, Yakushijin Y, Kharbanda S, Tiwari S, Freeman GJ, Shipp MA. PTPROt: an alternatively spliced and developmentally regulated B-lymphoid phosphatase that promotes G0/G1 arrest. *Blood*. 1999;94(7):2403-13.
47. Motiwala T, Kutay H, Ghoshal K, Bai S, Seimiya H, Tsuruo T, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) exhibits characteristics of a candidate tumor suppressor in human lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(38):13844-9.
48. Kitamura T, Nakamura K, Mizuno Y, Kikuchi K. Gene expressions of protein tyrosine phosphatases in regenerating rat liver and rat ascites hepatoma cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 1995;86(9):811-8.
49. Sharif K, Goyal M, Kershaw D, Kunkel R, Wiggins R. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. *Experimental nephrology*. 1998;6(3):234-44.
50. Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1999;10(1):51-61.
51. Bariety J, Hill GS, Mandet C, Irinopoulou T, Jacquot C, Meyrier A, et al. Glomerular epithelial-mesenchymal transdifferentiation in pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2003;18(9):1777-84.
52. Charba DS, Wiggins RC, Goyal M, Wharram BL, Wiggins JE, McCarthy ET, et al. Antibodies to protein tyrosine phosphatase receptor type O (PTPro) increase glomerular albumin permeability (P(alb)). *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;297(1):F138-44.
53. Diamond JR, Karnovsky MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis following a single intravenous dose of puromycin aminonucleoside. *The American journal of pathology*. 1986;122(3):481-7.
54. Kihara I, Yatoita E, Kawasaki K, Yamamoto T. Limitations of podocyte adaptation for glomerular injury in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Pathology international*. 1995;45(9):625-34.
55. Shiiki H, Sasaki Y, Nishino T, Kimura T, Kurioka H, Fujimoto S, et al. Cell proliferation and apoptosis of the glomerular epithelial cells in rats with puromycin aminonucleoside nephrosis. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*. 1998;66(5):221-9.
56. Pixley FJ, Lee PS, Condeelis JS, Stanley ER. Protein tyrosine phosphatase phi regulates paxillin tyrosine phosphorylation and mediates colony-stimulating factor 1-induced morphological changes in macrophages. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(5):1795-809.
57. Angers-Loustau A, Cote JF, Charest A, Dowbenko D, Spencer S, Lasky LA, et al. Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 1999;144(5):1019-31.
58. Shen Y, Schneider G, Cloutier JF, Veillette A, Schaller MD. Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(11):6474-81.

59. Hynes RO, Lander AD. Contact and adhesive specificities in the associations, migrations, and targeting of cells and axons. *Cell*. 1992;68(2):303-22.
60. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
61. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002;110(6):673-87.
62. Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature*. 1986;320(6062):531-3.
63. Otey CA, Pavalko FM, Burridge K. An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *The Journal of cell biology*. 1990;111(2):721-9.
64. Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology*. 1995;130(5):1181-7.
65. Espejo R, Rengifo-Cam W, Schaller MD, Evers BM, Sastry SK. PTP-PEST controls motility, adherens junction assembly, and Rho GTPase activity in colon cancer cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;299(2):C454-63.
66. Zimerman B, Arnold M, Ulmer J, Blummel J, Besser A, Spatz JP, et al. Formation of focal adhesion-stress fibre complexes coordinated by adhesive and non-adhesive surface domains. *IEE proceedings Nanobiotechnology*. 2004;151(2):62-6.
67. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(9):633-43.
68. Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(1):21-33.
69. Pelham RJ, Jr., Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(25):13661-5.
70. Kumagai T, Baldwin C, Aoudjit L, Nezvitsky L, Robins R, Jiang R, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B inhibition protects against podocyte injury and proteinuria. *The American journal of pathology*. 2014;184(8):2211-24.
71. Glenney JR, Jr., Zokas L. Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *The Journal of cell biology*. 1989;108(6):2401-8.
72. Turner CE, Glenney JR, Jr., Burridge K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology*. 1990;111(3):1059-68.
73. Deakin NO, Turner CE. Paxillin comes of age. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 15):2435-44.
74. Perez-Alvarado GC, Miles C, Michelsen JW, Louis HA, Winge DR, Beckerle MC, et al. Structure of the carboxy-terminal LIM domain from the cysteine rich protein CRP. *Nature structural biology*. 1994;1(6):388-98.
75. Schmeichel KL, Beckerle MC. The LIM domain is a modular protein-binding interface. *Cell*. 1994;79(2):211-9.
76. Burridge K, Turner CE, Romer LH. Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *The Journal of cell biology*. 1992;119(4):893-903.
77. Brown MC, Perrotta JA, Turner CE. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel

motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *The Journal of cell biology*. 1996;135(4):1109-23.

78. Brown MC, Perrotta JA, Turner CE. Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(7):1803-16.

79. Cote JF, Turner CE, Tremblay ML. Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(29):20550-60.

80. Herreros L, Rodriguez-Fernandez JL, Brown MC, Alonso-Lebrero JL, Cabanas C, Sanchez-Madrid F, et al. Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(34):26436-40.

81. Turner CE, Miller JT. Primary sequence of paxillin contains putative SH2 and SH3 domain binding motifs and multiple LIM domains: identification of a vinculin and pp125Fak-binding region. *Journal of cell science*. 1994;107 (Pt 6):1583-91.

82. Brown MC, Turner CE. Paxillin: adapting to change. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1315-39.

83. Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Molecular biology of the cell*. 1998;9(7):1863-71.

84. Birge RB, Fajardo JE, Reichman C, Shoelson SE, Songyang Z, Cantley LC, et al. Identification and characterization of a high-affinity interaction between v-Crk and tyrosine-phosphorylated paxillin in CT10-transformed fibroblasts. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(8):4648-56.

85. Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM. Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *The Journal of cell biology*. 2000;148(5):957-70.

86. Valles AM, Beuvin M, Boyer B. Activation of Rac1 by paxillin-Crk-DOCK180 signaling complex is antagonized by Rap1 in migrating NBT-II cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(43):44490-6.

87. Schaller MD, Parsons JT. pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(5):2635-45.

88. Turner CE, Brown MC, Perrotta JA, Riedy MC, Nikolopoulos SN, McDonald AR, et al. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *The Journal of cell biology*. 1999;145(4):851-63.

89. West KA, Zhang H, Brown MC, Nikolopoulos SN, Riedy MC, Horwitz AF, et al. The LD4 motif of paxillin regulates cell spreading and motility through an interaction with paxillin kinase linker (PKL). *The Journal of cell biology*. 2001;154(1):161-76.

90. Zhao ZS, Manser E, Loo TH, Lim L. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(17):6354-63.

91. Jamieson JS, Tumbarello DA, Halle M, Brown MC, Tremblay ML, Turner CE. Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker. *Journal of cell science*. 2005;118(Pt 24):5835-47.

92. Sastry SK, Lyons PD, Schaller MD, Burridge K. PTP-PEST controls motility through regulation of Rac1. *Journal of cell science*. 2002;115(Pt 22):4305-16.
93. Sastry SK, Rajfur Z, Liu BP, Cote JF, Tremblay ML, Burridge K. PTP-PEST couples membrane protrusion and tail retraction via VAV2 and p190RhoGAP. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(17):11627-36.
94. Digman MA, Brown CM, Horwitz AR, Mantulin WW, Gratton E. Paxillin dynamics measured during adhesion assembly and disassembly by correlation spectroscopy. *Biophysical journal*. 2008;94(7):2819-31.
95. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, et al. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nature cell biology*. 2004;6(2):154-61.
96. Zhang Y, Yoshida Y, Nameta M, Xu B, Taguchi I, Ikeda T, et al. Glomerular proteins related to slit diaphragm and matrix adhesion in the foot processes are highly tyrosine phosphorylated in the normal rat kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2010;25(6):1785-95.
97. Derycke LD, Bracke ME. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *The International journal of developmental biology*. 2004;48(5-6):463-76.
98. Lamalice L, Le Boeuf F, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research*. 2007;100(6):782-94.
99. Vogel V, Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(4):265-75.
100. Geiger B, Bershadsky A. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 2002;110(2):139-42.
101. Nobes CD, Hall A. Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility. *Biochemical Society transactions*. 1995;23(3):456-9.
102. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 1995;81(1):53-62.
103. Small JV, Stradal T, Vignat E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends in cell biology*. 2002;12(3):112-20.
104. Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*. 2006;173(3):383-94.
105. Shemesh T, Verkhovsky AB, Svitkina TM, Bershadsky AD, Kozlov MM. Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellipodium-lamellum interface [corrected]. *Biophysical journal*. 2009;97(5):1254-64.
106. Vicente-Manzanares M, Ma X, Adelstein RS, Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(11):778-90.
107. Vicente-Manzanares M, Koach MA, Whitmore L, Lamers ML, Horwitz AF. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *The Journal of cell biology*. 2008;183(3):543-54.
108. Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of cell science*. 2000;113 (Pt 20):3563-71.

109. Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of cell biology*. 2007;179(5):1043-57.
110. Liu S, Ginsberg MH. Paxillin binding to a conserved sequence motif in the alpha 4 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(30):22736-42.
111. Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *The Journal of cell biology*. 1995;131(3):791-805.
112. Choi CK, Vicente-Manzanares M, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature cell biology*. 2008;10(9):1039-50.
113. Krylyshkina O, Kaverina I, Kranewitter W, Steffen W, Alonso MC, Cross RA, et al. Modulation of substrate adhesion dynamics via microtubule targeting requires kinesin-1. *The Journal of cell biology*. 2002;156(2):349-59.
114. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(1):56-68.
115. Ezratty EJ, Partridge MA, Gundersen GG. Microtubule-induced focal adhesion disassembly is mediated by dynamin and focal adhesion kinase. *Nature cell biology*. 2005;7(6):581-90.
116. Ilic D, Furuta Y, Kanazawa S, Takeda N, Sobue K, Nakatsuji N, et al. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*. 1995;377(6549):539-44.
117. Zheng Y, Xia Y, Hawke D, Halle M, Tremblay ML, Gao X, et al. FAK phosphorylation by ERK primes ras-induced tyrosine dephosphorylation of FAK mediated by PIN1 and PTP-PEST. *Molecular cell*. 2009;35(1):11-25.
118. Nagano M, Hoshino D, Koshiba S, Shuo T, Koshikawa N, Tomizawa T, et al. ZF21 protein, a regulator of the disassembly of focal adhesions and cancer metastasis, contains a novel noncanonical pleckstrin homology domain. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(36):31598-609.
119. Nagano M, Hoshino D, Sakamoto T, Akizawa T, Koshikawa N, Seiki M. ZF21 is a new regulator of focal adhesion disassembly and a potential member of the spreading initiation center. *Cell adhesion & migration*. 2011;5(1):23-8.
120. Kistler AD, Altintas MM, Reiser J. Podocyte GTPases regulate kidney filter dynamics. *Kidney international*. 2012;81(11):1053-5.
121. Wang L, Ellis MJ, Gomez JA, Eisner W, Fennell W, Howell DN, et al. Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney international*. 2012;81(11):1075-85.
122. Mundel P, Reiser J. Proteinuria: an enzymatic disease of the podocyte? *Kidney international*. 2010;77(7):571-80.
123. Reiser J, Oh J, Shirato I, Asanuma K, Hug A, Mundel TM, et al. Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(33):34827-32.
124. Reiser J, Sever S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annual review of medicine*. 2013;64:357-66.
125. Hohne M, Ising C, Hagmann H, Volker LA, Brahler S, Schermer B, et al. Light microscopic visualization of podocyte ultrastructure demonstrates oscillating glomerular contractions. *The American journal of pathology*. 2013;182(2):332-8.

126. Saleem MA, Zavadil J, Bailly M, McGee K, Witherden IR, Pavenstadt H, et al. The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(4):F959-70.
127. Peterson JC, Adler S, Burkart JM, Greene T, Hebert LA, Hunsicker LG, et al. Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease Study. *Annals of internal medicine*. 1995;123(10):754-62.
128. Zheng L, Baumann U, Reymond JL. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic acids research*. 2004;32(14):e115.
129. Gobert RP, van den Eijnden M, Szyndralewicz C, Jorand-Lebrun C, Swinnen D, Chen L, et al. GLEPP1/protein-tyrosine phosphatase phi inhibitors block chemotaxis in vitro and in vivo and improve murine ulcerative colitis. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(17):11385-95.
130. Wharram BL, Goyal M, Gillespie PJ, Wiggins JE, Kershaw DB, Holzman LB, et al. Altered podocyte structure in GLEPP1 (Ptp^{ro})-deficient mice associated with hypertension and low glomerular filtration rate. *The Journal of clinical investigation*. 2000;106(10):1281-90.
131. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological reviews*. 2003;83(1):253-307.
132. Turner CE. Paxillin interactions. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 23:4139-40.
133. Kim YH, Goyal M, Wharram B, Wiggins J, Kershaw D, Wiggins R. GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptp^{ro}) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron*. 2002;90(4):471-6.
134. George B, Holzman LB. Signaling from the podocyte intercellular junction to the actin cytoskeleton. *Seminars in nephrology*. 2012;32(4):307-18.
135. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Frontiers in endocrinology*. 2014;5:160.
136. Ma H, Togawa A, Soda K, Zhang J, Lee S, Ma M, et al. Inhibition of podocyte FAK protects against proteinuria and foot process effacement. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010;21(7):1145-56.
137. Xu W, Ge Y, Liu Z, Gong R. Glycogen synthase kinase 3beta dictates podocyte motility and focal adhesion turnover by modulating paxillin activity: implications for the protective effect of low-dose lithium in podocytopathy. *The American journal of pathology*. 2014;184(10):2742-56.
138. Harder KW, Moller NP, Peacock JW, Jirik FR. Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(48):31890-900.
139. Burrige K, Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual review of cell and developmental biology*. 1996;12:463-518.
140. QIAgen. QIAfilter Plasmid Purification Handbook 2012 [cited 2012]. 13-21]. Available from: <https://http://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=4d3825fd-23ec-4878-b48b-89f29f96e6b3&lang=en>.

6 Anhang

Protokoll von Kapitel 2.7.4. und 2.7.5. Mini- und Maxi-Präparation (Seiten 27-28) vom Maxi QIAfilter™ Plasmid Kit von QIAGEN (140):

Protocol: Plasmid or Cosmid DNA Purification using QIAGEN Plasmid Mini Kit

This protocol is designed for preparation of up to 20 µg of high-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Mini Kit. For additional protocols, such as for cosmid, low-copy-number plasmid, BACs, PACs, P1s, and double-stranded M13 replicative form purification, see the recommendations at www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.

Important notes before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.
- **Optional:** Remove samples at indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 41)

Things to do before starting

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

Procedure

1. **Pick a single colony from a freshly streaked selective plate and inoculate a starter culture of 2–5 ml LB medium containing the appropriate selective antibiotic. Incubate for approximately 8 h at 37°C with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**
Use a tube or flask with a volume of at least 4 times the volume of the culture.
2. **Dilute the starter culture 1/500 to 1/1000 into 3 ml selective LB medium. Grow at 37°C for 12–16 h with vigorous shaking (approx. 300 rpm).**
Use a flask or vessel with a volume of at least 4 times the volume of the culture. The culture should reach a cell density of approximately $3\text{--}4 \times 10^9$ cells per milliliter, which typically corresponds to a pellet wet weight of approximately 3 g/liter medium.

3. Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x g for 15 min at 4°C.

⊗ If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at -20°C.

4. Resuspend the bacterial pellet in 0.3 ml of Buffer P1.

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1.

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

5. Add 0.3 ml of Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

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

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

6. Add 0.3 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for 5 min.

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulphate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

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

7. Centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 10 min. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed at maximum speed in 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (e.g., 10,000–13,000 rpm in a microcentrifuge). Maximum speed corresponds to 14,000–18,000 $\times g$ for most microcentrifuges. After centrifugation, the supernatant should be clear. If the supernatant is not clear, a second, shorter centrifugation should be carried out to avoid applying any suspended or particulate material to the column. Suspended material (which causes the sample to appear turbid) will clog the column and reduce or eliminate flow.

Optional: Remove a 50 μ l sample from the cleared lysate and save it for an analytical gel (sample 1).

8. Equilibrate a QIAGEN-tip 20 by applying 1 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.

Place QIAGEN-tips into a QIArack over the waste tray or use the tip holders provided with each kit (see "Setup of QIAGEN-tips" page 13). Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

9. Apply the supernatant from step 7 to the QIAGEN-tip 20 and allow it to enter the resin by gravity flow.

The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.

Optional: Remove a 50 μ l sample of the flow-through and save for an analytical gel (sample 2).

10. Wash the QIAGEN-tip 20 with 2 x 2 ml Buffer QC.

Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow.

Optional: Remove a 220 μ l sample of the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

11. Elute DNA with 0.8 ml Buffer QF.

Collect the eluate in a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tubes (not supplied).

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

Optional: Remove a 45 μ l sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4).

- 12. Precipitate DNA by adding 0.7 volumes (0.56 ml per 0.8 ml of elution volume) of room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at $\geq 15,000 \times g$ rpm for 30 min in a microcentrifuge. Carefully decant the supernatant.**

All solutions should be at room temperature to minimize salt precipitation. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt-containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

- 13. Wash DNA pellet with 1 ml of 70% ethanol and centrifuge at $15,000 \times g$ for 10 min.**

Redissolve the DNA pellet by rinsing the walls to recover the DNA. Pipetting the DNA up and down in the presence of suspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best

speohoph ol26O nm and nMMNe mW s onon ogqroe geL For mtllE
speWcphMomahk- DNA qeonfi@Wkm@@ mo@n@ ed heMHwe<+n OH onB LO.

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be procedure where the problem occurred (see page 41).

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

This protocol is designed for preparation of up to 100 µg of high- or low-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Midi Kit, or up to 500 µg using the QIAGEN Plasmid Maxi Kit. For additional protocols, such as for purification of very low-copy plasmids or cosmids of less than 10 copies per cell, see page 29 or visit www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.

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

Table 3. Maximum recommended culture volumes*

	QIAGEN-tip 100	QIAGEN-tip 500
High-copy plasmids	25 ml	100 ml
Low-copy plasmids	100 ml	500 ml

* For the QIAGEN-tip 100, the expected yields are 75–100 µg for high-copy plasmids and 20–100 µg for low-copy plasmids. For the QIAGEN-tip 500, the expected yields are 300–500 µg for high-copy plasmids and 100–500 µg for low-copy plasmids.

Important points before starting

- New users are advised to familiarize themselves with the detailed protocol provided in this handbook. In addition, extensive background information is provided on our plasmid resource page www.qiagen.com/goto/plasmidinfo.
- If working with low-copy vectors, it may be beneficial to increase the lysis buffer volumes to increase the efficiency of alkaline lysis, and thereby the DNA yield. In case additional Buffers P1, P2, and P3 are needed, their compositions are provided in Appendix B: Composition of Buffers, on page 44. Alternatively, the buffers may be purchased separately (see page 49).
- **Optional:** Remove samples at the indicated steps to monitor the procedure on an analytical gel (see page 41).
- Blue (marked with a ▲) denotes values for QIAGEN-tip 100 using the QIAGEN Plasmid Midi Kit; red (marked with a ●) denotes values for QIAGEN-tip 500 using the QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Things to do before starting

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

Procedure

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

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

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

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

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

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

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

5. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed**

tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.

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

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

6. **Add ▲ 4 ml or ● 10 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for ▲ 15 min or ● 20 min.**

Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulfate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution.

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

7. **Centrifuge at $\geq 20,000 \times g$ for 30 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed in non-glass tubes (e.g., polypropylene). After centrifugation the supernatant should be clear.

Note: Instead of centrifugation steps 7 and 8, the lysate can be efficiently cleared by filtration using a QIAfilter Kits or Cartridges (see www.qiagen.com/products/plasmid/LargeScaleKits).

8. **Centrifuge the supernatant again at $\geq 20,000 \times g$ for 15 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

This second centrifugation step should be carried out to avoid applying suspended or particulate material to the QIAGEN-tip. Suspended material (causing the sample to appear turbid) can clog the QIAGEN-tip and reduce or eliminate gravity flow.

Optional: Remove a ▲ 240 μ l or ● 120 μ l sample from the cleared lysate supernatant and save for an analytical gel (sample 1) to determine whether growth and lysis conditions were optimal.

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

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

10. **Apply the supernatant from step 8 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.**

The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again or filtered before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Determination of yield

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

Agarose gel analysis

We recommend removing and saving aliquots during the purification procedure (samples 1–4). If the plasmid DNA is of low yield or quality, the samples can be analyzed by agarose gel electrophoresis to determine the stage of the purification procedure where the problem occurred (see page 41).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin für die Schaffung der Rahmenbedingungen für diese Arbeit, die Überlassung dieses spannenden Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für seine konstruktive Kritik. Zusätzlich möchte ich Frau Dr. med. Eva Königshausen für die Hilfestellung bei der Auswahl des Themas, für ihre hervorragende fachliche Betreuung dieser Arbeit und die verständnisvolle Unterstützung während des gesamten Zeitraums danken. Für die ausgezeichnete Einarbeitung, die technische Unterstützung, das freundliche Arbeitsklima sowie die stete Beratung und Hilfsbereitschaft bedanke ich mich herzlich bei Blanka Duvnjak und dem gesamten Team des nephrologischen Labors.