

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

**FRMD3/Protein 4.1O ist ein neuer durch MAP-Kinasen regulierter Nephrin-
Adaptor an F-Aktin und ist mit Diabetes mellitus assoziiert**

Dissertation

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

vorgelegt von

Aida Bajraktarevic

2024

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: PD Dr. rer. nat. Dennis Sohn

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Eine genomweite Assoziationsstudie zum Thema diabetische Nephropathie stellte eine signifikante Assoziation zwischen einem Genlocus in der Nähe der Promotorregion von FRMD3 und dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie fest. FRMD3 codiert für das Protein 4.1O. Über die molekulare Funktion von Protein 4.1O ist bislang wenig bekannt. Es stellt sich die Frage, welche Funktionen Protein 4.1O hat und inwieweit es an der Ausbildung einer diabetischen Nephropathie beteiligt ist.

Protein 4.1O und der Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran, Nephrin, wurden in HEK 293T-Zellen überexprimiert und mit verschiedenen Kinase-Inhibitoren stimuliert. Anschließend wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Es wurden in der Aminosäuresequenz von Protein 4.1O eine Mitogenaktivierte Proteinkinase-*site* und eine *Docking site for ERK FXXF* identifiziert. Innerhalb dieser Interaktionsstellen wurden Punktmutationen generiert. Anschließend wurden sowohl Nephrin als auch die punktmutierten Protein 4.1O-Varianten in HEK 293T-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Es wurden Immunfluoreszenzen zur Lokalisation von Protein 4.1O in Zellen und im Glomerulus durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Protein 4.1O mit podozytären Proteinen phosphorylierungsabhängig ist: Protein 4.1O bindet bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin und Nephrin bindet bevorzugt an phosphoryliertes Protein 4.1O. Protein 4.1O ist insbesondere in der Zellperipherie und den Lamellipodien lokalisiert und co-lokalisiert mit F-Aktin.

Die Interaktionsmuster von Protein 4.1O lassen auf seine Ankerfunktion von Schlitzmembranproteinen an das Aktinzytoskelett schließen. Protein 4.1O scheint an der dynamischen Regulation des Aktinzytoskeletts beteiligt zu sein, es lässt sich insbesondere in den Lamellipodien, also den motilen Anteilen der Zellen nachweisen. Da Protein 4.1O bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin bindet, könnten somit Signale aus der Zellperipherie von Nephrin über Protein 4.1O an das Aktinzytoskelett weitergeleitet werden. Die Bindung von Nephrin an Protein 4.1O ist abhängig vom Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O: eine Phosphorylierung führt zu einer vermehrten Interaktion mit Nephrin, hierüber könnte eine schnelle Anpassung an sich verändernde Bedingungen erfolgen.

Zusammenfassend handelt es sich bei Protein 4.1O um einen durch Mitogenaktivierte Proteinkinasen regulierten Nephrin-Adaptor an das Aktinzytoskelett.

Summary

A genome wide association scan regarding diabetic nephropathy stated a significant association within a gene locus nearby the promotor region of FRMD3. FRMD3 encodes protein 4.1O. The molecular function of protein 4.1O is currently unknown. The aim of the following work is to elucidate the function of protein 4.1O and its role in developing diabetic nephropathy.

To ascertain the function of protein 4.1O for the glomerular slit diaphragm, protein 4.1O and the main protein of the glomerular slit diaphragm, nephrin, were overexpressed in HEK 293T-cells. The cells were stimulated with different kinase inhibitors and co-immunoprecipitations were performed. A mitogen-activated protein kinase-site and a docking site for ERK FXX were identified within the amino acid sequence of protein 4.1O. Point mutations within these interaction-sites were generated. To observe any changes regarding the interaction of the point mutated protein 4.1O-variants and nephrin, both were overexpressed in HEK 293T-cells. Subsequently co-immunoprecipitations were performed. To localize protein 4.1O within cells and the glomerulus, immunofluorescence stainings were performed.

It could be shown that the interaction of protein 4.1O and nephrin is phosphorylation-dependent. Phosphorylation of nephrin ameliorates the interaction with protein 4.1O. Similarly, phosphorylation of protein 4.1O ameliorates the interaction with nephrin. Protein 4.1O is localized in the cell periphery and the lamellipodia and co-localizes with F-actin.

Regarding the interaction pattern of protein 4.1O it can be concluded that protein 4.1O serves as an anchor of slit diaphragm proteins to the actin cytoskeleton. Protein 4.1O seems to be involved in the dynamic regulation of the actin cytoskeleton, as it is mainly localized in the lamellipodia of the cells, which are the motile parts of the cell. The interaction of protein 4.1O and nephrin is ameliorated by phosphorylation of nephrin. Therefore, it is possible that protein 4.1O is involved in nephrin-signaling. Phosphorylation of protein 4.1O may serve as a rapid adjustment to changing conditions in the glomerulus.

In conclusion, protein 4.1O seems to be a novel nephrin-adaptor to F-actin and is regulated by mitogen-activated protein-kinases.

Abkürzungsverzeichnis

4.1	Bande 4.1 Protein	HEBS	HEPES-buffered saline
4.1B	Bande 4.1 Protein, brain type	HEK	Human Embryonic Kidney
4.1G	Bande 4.1 Protein, general type	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
4.1N	Bande 4.1 Protein, neuronal type	HRP	Horseradish Peroxidase
4.1O	Bande 4.1 Protein, ovary type	IF	Immunfluoreszenz
4.1R	Bande 4.1 Protein, red blood cell type	IgG	Immunglobulin G
A	Alanin	kDa	Kilodalton
AA	Aminosäure	LB	Lysogeny broth
Abb.	Abbildung	M	Molar (mol/l)
a.d.	Aqua destillata	M2	Antikörper gegen Flag-Tag
APS	Ammoniumperoxidsulfat	mA	Milliampere
bp	Basenpaar	MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
BSA	Rinderserumalbumin	mg	Milligramm
C-Terminus	Carboxy-Terminus	min	Minuten
CD2AP	CD2-associated protein	ml	Milliliter
cm	Zentimeter	mM	Millimolar (mmol/l)
Co-IP	Co-Immunopräzipitation	mm	Millimeter
COS	CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material	mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Cyt	Cytoplasmatische Domäne	n	Stichprobenumfang
D	Asparaginsäure	N-Terminus	Amino-Terminus
DEF-site	Docking site for ERK FXF	Nck	Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein
DMSO	Dimethyl Sulfoxid	ng	Nanogramm
DNA	Desoxyribonukleinsäure	nM	Nanomolar (nmol/l)
DTT	1,4-Dithiothreitol	nm	Nanometer
E. coli	Escherichia coli	p	Signifikanzwert
ECL	Elektrochemilumineszenz	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	PCR	Polymerasekettenreaktion
ESRD	Endstage renal disease	PFA	Paraformaldehyd
EtBr	Ethidiumbromid	PMSF	Phenylmethanesulfonylfluorid
F	Flag Tag	RNA	Ribonukleinsäure
F	Phenylalanin	SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
FCS	Fötales bovines Serum	SNP	Single nucleotide polymorphism
FERM	4.1-Ezrin-Radixin-Moesin	TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	TEMED	Tetramethylethyldiamid
FRMD3	FERM Domain Containing 3	U/min	Umdrehungen/Minute
Gfp	Grün fluoreszierendes Protein	WT	Wildtyp
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate	Y	Tyrosin
g	Erdbeschleunigung	ZO-1	Zonula occludens protein 1
g	Gramm	µg	Mikrogramm
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie	µl	Mikroliter
		µm	Mikrometer
		µM	Mikromolar (µmol/l)
		°C	Grad Celsius

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Diabetes mellitus und die Diabetische Nephropathie	1
1.2 Der glomeruläre Filter	5
1.2.1 Aufbau und Aufgaben	5
1.2.2 Der Podozyt	7
1.2.3 Allgemeine Struktur der glomerulären Schlitzmembran	9
1.3 Proteine der glomerulären Schlitzmembran	10
1.3.1 Nephlin	10
1.3.2 Neph1	12
1.3.3 Podocin	13
1.3.4 <i>Tight-</i> und <i>adherens junction</i> -Proteine	15
1.4 Das Zytoskelett des Podozyten	16
1.5 Ankerproteine an das Aktinzytoskelett	17
1.5.1 CD2AP	17
1.5.2 Die Nck-Proteinfamilie	17
1.6 <i>Signaling</i> an der glomerulären Schlitzmembran	18
1.7 Podozytäre Reaktion auf Stress	19
1.8 Protein 4.1O	21
1.9. Ziele der Arbeit	24
2. Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Chemikalien	25
2.1.2 Geräte	29
2.1.3 Zellkultur	31
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	31
2.1.5 Transformation und Mutagenese	32
2.1.6 Transfektion	34
2.1.7 Immunfluoreszenz/-histochemie	34
2.1.8 Co-Immunopräzipitation, SDS-Page, Westernblot und ECL	36
2.1.9 Software	37
2.2 Methoden	37
2.2.1 Restriktionsenzymverdau und DNA-Elektrophorese	37
2.2.2 Herstellung rekombinanter DNA	38
2.2.3 Transformation und Präparation Plasmid-DNA	40
2.2.4 Zellkultur	43

2.2.5 Transfektion	44
2.2.6 Stimulation Zellen	46
2.2.7 Zellernte	47
2.2.8 SDS-Page und Western Blot	50
2.2.9 Immunhistochemische Färbung Maus	52
2.2.10 Auswertung	53
3. Ergebnisse	54
3.1 Protein 4.1O wird in Glomeruli exprimiert und co-lokalisiert mit Neph rin	54
3.2 Protein 4.1O co-lokalisiert mit F-Aktin	55
3.3 Die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin hängt vom Phosphorylierungszustand von Neph rin ab	56
3.4 Die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin hängt von dem Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O ab	57
3.4.1 Identifizierung einer MAPK- und DEF-site in Protein 4.1O	57
3.4.2 p38-Inhibition reduziert die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin	59
3.4.3 ERK2-Inhibition reduziert die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin	60
3.4.4 Punktmutationen in der DEF- und in der MAPK-site führen zu einer verringerten Interaktion zwischen Protein 4.1O und Neph rin	61
4. Diskussion	63
4.1 Allgemeine Erkenntnisse	63
4.1.1 Protein 4.1O ist ein Ankerprotein von Neph rin an das Aktinzytoskelett	63
4.1.2 Protein 4.1O ist essenziell für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran	65
4.1.3 Die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin ist abhängig von dem Phosphorylierungszustand von Neph rin	67
4.1.4 Die Interaktion von Protein 4.1O und Neph rin ist abhängig von dem Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O	68
4.1.5 Protein 4.1O ist unter diabetischen Bedingungen hochreguliert	70
4.2 Limitationen und Ausblick	73
4.3 Schlussfolgerungen	74
5. Literatur- und Quellenverzeichnis	75

1. Einleitung

1.1 Diabetes mellitus und die Diabetische Nephropathie

Diabetes mellitus ist weltweit zu einer Volkskrankheit geworden. Im Zeitraum zwischen 1980 und 2014 zeigte sich weltweit eine Zunahme der Prävalenz, die absolute Anzahl an erwachsenen Individuen mit Diabetes mellitus hat sich in diesem Beobachtungszeitraum nahezu vervierfacht (NCD Risk Factor Collaboration, 2016). Durch steigende Inzidenzzahlen des Diabetes mellitus müssen sich die Gesundheitssysteme weltweit auch mit den Komplikationen dieser Krankheit auseinandersetzen. Unter diese Komplikationen fallen auch die diabetischen Mikroangiopathien. Beispiele für mikroangiopathische Erkrankungen sind die diabetische Retinopathie und die diabetische Nephropathie. Davon ist die diabetische Nephropathie diejenige Komplikation mit der höchsten Mortalität (Martini et al., 2008). Zusätzlich erhöht eine bereits bestehende diabetische Nephropathie das Risiko, an einem kardiovaskulären Ereignis zu versterben (Martini et al., 2008, Lewis and Maxwell, 2014).

Die diabetische Nephropathie ist die häufigste Ursache für die Entwicklung einer Proteinurie und einer terminalen Niereninsuffizienz in industrialisierten Ländern (Adler et al., 2003, Wolf and Ziyadeh, 2007, Lewis and Maxwell, 2014, Reidy et al., 2014, Li and Pezzolesi, 2018). Diabetes mellitus kann die Wahrscheinlichkeit, an einer terminalen Niereninsuffizienz zu erkranken, bis zu verzweifelfachen (Adler et al., 2003). Die häufigste Ursache für die Durchführung von Nierenersatzverfahren in einem Patientenkollektiv aus dem Vereinigten Königreich ist die diabetische Nephropathie (Adler et al., 2003).

Das Vorliegen einer diabetischen Nephropathie erhöht die Mortalität. So konnte gezeigt werden, dass die 10-Jahresüberlebensrate von britischen Diabetes mellitus Typ 2-Patienten mit diabetischer Nephropathie nur 8,5 % beträgt. Im Vergleich dazu liegt die 10-Jahresüberlebensrate bei Patienten ohne diabetische Nephropathie bei 87,1 % (Adler et al., 2003). Insgesamt ist die diabetische Nephropathie die Haupttodesursache bei Patienten mit insulin- und nicht insulinpflichtigem Diabetes mellitus (Krolewski, 1999).

Wie stellt sich nun der Krankheitsverlauf der diabetischen Nephropathie dar? Zu Beginn der Erkrankung liegt eine mehrere Jahre dauernde Latenzzeit, in der sich keine Auffälligkeiten zeigen. In manchen Fällen können lediglich eine renale Hypertrophie und eine Zunahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) durch Hyperfiltration beobachtet werden (Wolf and Ziyadeh, 2007). Der typische klinische Verlauf der diabetischen Nephropathie beginnt mit einer Mikroalbuminurie, entwickelt sich weiter zu einer

unselektiven Proteinurie, die sich schließlich bis zu einem nephrotischen Syndrom weiterentwickeln kann. Das Endstadium der diabetischen Nephropathie ist die terminale Niereninsuffizienz (Wolf and Ziyadeh, 2007, Reidy et al., 2014).

Die histopathologischen Veränderungen einer diabetischen Nephropathie umfassen eine zunehmende glomeruläre Sklerose, das Mesangium nimmt an Volumen zu (Pagtalunan et al., 1997, Wolf and Ziyadeh, 2007). Desweiteren weisen auch die einzelnen Glomeruli eine Volumenzunahme auf. Die glomerulären Kapillaren sind zum Teil kollabiert (Pagtalunan et al., 1997).

Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine Verdickung der glomerulären Basalmembran (Pagtalunan et al., 1997, Wolf and Ziyadeh, 2007, Martini et al., 2008, Reidy et al., 2014). Der Abstand zwischen den podozytären Fußfortsätzen nimmt zu (Pagtalunan et al., 1997) und die Form verplumpt (Wolf and Ziyadeh, 2007). Dieser Prozess wird als podozytäres *Effacement* bezeichnet (Li and Pezzolesi, 2018). Die Anzahl der Podozyten in den Glomeruli nimmt ab (Pagtalunan et al., 1997, Wolf and Ziyadeh, 2007), während gleichzeitig die noch vorhandenen Podozyten hypertrophieren. Auf diese Weise wird versucht, die von den Podozyten bedeckte Kapillaroberfläche annähernd konstant zu halten (Pagtalunan et al., 1997). Dennoch gehen im Krankheitsverlauf der diabetischen Nephropathie zunehmend Nephrone unter (Li and Pezzolesi, 2018). Die Zusammensetzung der glomerulären Schlitzmembran verändert sich: die Nephrinexpression an der Schlitzmembran ist reduziert und Nephrin wird vermehrt über den Urin ausgeschieden (Wolf and Ziyadeh, 2007).

Was sind Faktoren, die einen renal protektiven Effekt bei Diabetes mellitus ausüben? An erster Stelle ist eine strenge Blutzuckerkontrolle zu nennen. In der ADVANCE-Studie konnte gezeigt werden, dass bei einem HbA1c von weniger als 6,5 % signifikant seltener eine diabetische Nephropathie auftritt. Auch eine Mikro- oder Makroalbuminurie konnten seltener beobachtet werden (Patel et al., 2008). Ebenfalls im Hinblick auf die Entwicklung einer Mikro- und Makroalbuminurie bewirkt eine intensive Blutzuckerkontrolle eine relative Risikoreduktion von 20 %. Sie begünstigt auch die Rückbildung einer bereits bestehenden Albuminurie (Zoungas et al., 2017). Weitere Faktoren, die die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie verlangsamen können, sind die Blutdruckkontrolle und die Senkung einer Hyperlipidämie (Martini et al., 2008).

Im Gegensatz dazu zählen eine lange Diabetes-Dauer, eine schlechte Blutzuckerkontrolle und eine arterielle Hypertonie als begünstigende Faktoren für die

Entwicklung und das Voranschreiten einer diabetischen Nephropathie (Lewis and Maxwell, 2014).

Das Auftreten einer diabetischen Nephropathie lässt sich allerdings nicht ausschließlich durch die Dauer des Diabetes mellitus oder den Erfolg der Blutzuckereinstellung erklären: Patienten mit einem kontrollierten Diabetes mellitus können eine diabetische Nephropathie erleiden, während andere Patienten mit einem schlecht eingestellten Diabetes mellitus keine renalen Komplikationen aufweisen (Conway and Maxwell, 2009). Nach 10-20 Jahren andauernder Diabetes-Erkrankung hat die diabetische Nephropathie die höchste Inzidenz. Danach nimmt die Inzidenz wieder ab (Conway and Maxwell, 2009, Buffon et al., 2015). Somit scheinen die Dauer der Diabeteserkrankung und das gleichzeitige Vorliegen einer Hyperglykämie keine alleinigen Ursachen für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie zu sein.

Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass für das Auftreten einer diabetischen Nephropathie eine genetische Veranlagung eine wichtige Rolle spielt. Es wurde beobachtet, dass die Erkrankung familiär gehäuft auftritt (Martini et al., 2008, Krolewski, 1999, Conway and Maxwell, 2009, Reidy et al., 2014, Li and Pezzolesi, 2018, Buffon et al., 2015). Außerdem haben bestimmte Bevölkerungsgruppen wie die *Black*, *Mexican* und *Native Americans*, ein höheres Risiko, an einer diabetischen Nephropathie zu erkranken (Martini et al., 2008). Der Beitrag einer genetischen Komponente zur Entwicklung einer diabetischen Nephropathie wird auf 30-75 % geschätzt (Li and Pezzolesi, 2018).

Wie bereits oben beschrieben, ist davon auszugehen, dass das Auftreten einer diabetischen Nephropathie durch bestimmte genetische Komponenten begünstigt wird. So konnten Pezzolesi et al. nach Auswertung des GoKinD-Studienkollektivs *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) identifizieren, die mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie assoziiert sind. Von den identifizierten SNPs, die eine Assoziation mit einer diabetischen Nephropathie aufwiesen, konnte keines eine genomweite Signifikanz erreichen. Allerdings konnte die stärkste Assoziation bei einem SNP auf Chromosom 9 identifiziert werden. Dieses SNP befindet sich in der Nähe des 5'-Endes von FERM Domain Containing 3 (FRMD3). Weitere starke Assoziationen wurden bei SNPs auf den Chromosomen 7p, 11p und 13q festgestellt (Pezzolesi et al., 2009).

Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Daten aus einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) der DCCT/EDIC-Studie ausgewertet. Auch hier konnte eine

signifikante Assoziation zwischen SNPs im Bereich des FRMD3-Gens und dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie festgestellt werden (Pezzolesi et al., 2009).

Da das Studienkollektiv der GoKinD-Studie an Diabetes mellitus Typ 1 erkrankt war, wurde in einem familienbasierten Modell die Relevanz der dort identifizierten SNPs in Bezug auf die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie bei Typ 2 Diabetes überprüft. Auch hier konnte eine signifikante Assoziation zwischen rs1888747 auf Chromosom 9q21.32 in der Nähe des FRMD3-Gens und der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie nachgewiesen werden (Pezzolesi et al., 2013).

Im Studienkollektiv der Joslin Study of Genetics of Nephropathy in Type 2 Diabetes Family Collection war rs1888747 der einzige SNP, der signifikant mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie assoziiert war (Pezzolesi et al., 2013). Auch in einer Fall-Kontroll-Studie wurden SNPs im FRMD3-Gen als möglicher Faktor für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie untersucht. Allerdings konnte auch hier kein SNP eine genomweite Signifikanz erreichen (Williams et al., 2012).

Verschiedene SNPs sind bei bestimmten Ethnien mitverantwortlich für das Auftreten einer diabetischen Nephropathie. So sind SNPs im FRMD3-Gen bei europäischen Typ 1-Diabetikern mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie assoziiert (Mooyaart et al., 2011). Auch bei Afro-Amerikanern mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte eine Assoziation zwischen dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie und SNPs in der Nähe von FRMD3 festgestellt werden (Freedman et al., 2011). In einer isolierten mongolischen Population konnte gezeigt werden, dass SNPs in der Nähe von FRMD3 mit einer veränderten Nierenfunktion assoziiert sind (Park et al., 2013). SNPs in der Nähe des FRMD3-Gens scheinen hingegen nicht signifikant mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie in japanischen Populationen mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert zu sein (Maeda et al., 2010).

Zusammenfassend konnte in folgenden Studienkollektiven eine signifikante Assoziation zwischen der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie und SNPs auf Chromosom 9q21.32 nachgewiesen werden: Typ 1-Diabetiker aus dem GoKinD-Kollektiv, Typ 2-Diabetiker aus dem Joslin Study of Genetics of Nephropathy in Type 2 Diabetes Family-Kollektiv, kaukasische Patienten aus dem DCCT/EDIC-Kollektiv und Afro-Amerikaner mit *endstage renal disease* (ESRD) aufgrund eines Diabetes mellitus Typ 2 (Pezzolesi et al., 2013).

Die stärkste Assoziation für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie wies der SNP rs1888747 in FRMD3 auf. Dieses SNP befindet sich auf Chromosom 9q in der erweiterten Promotorregion von FRMD3 (Martini et al., 2013, Buffon et al., 2016).

Die hier dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Genprodukt von FRMD3 bedeutsam für die Nierenfunktion unter diabetischen Bedingungen sein könnte.

1.2 Der glomeruläre Filter

1.2.1 Aufbau und Aufgaben

Die Aufgaben der Nieren sind vielfältig. Diese Aufgaben umfassen die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Regulation des Säure-Basen- und Elektrolyt-Haushalts, die Regulation des Wasserhaushalts und des Blutvolumens, die Blutdruckregulation und Hormonbildung. Damit die Nieren harnpflichtige Substanzen ausscheiden können, erfolgt eine Filtration des Blutes. Über die Filtration des Blutes entsteht der Primärharn. Die einzelnen Filtereinheiten der Niere sind die Nephrone (Pape et al., 2019). Der Mensch besitzt ungefähr 2 Millionen dieser Nephrone pro Niere (Kriz et al., 2013). Ein Nephron besteht aus einem Glomerulus und dem sich anschließenden Tubulussystem. Die Glomeruli bestehen aus einem Kapillarkonvolut, welches von der Bowman-Kapsel umschlossen ist. Die Bowman-Kapsel mündet in die Tubuli. Die Filtration des Primärharns findet im Glomerulus am glomerulären Filter statt. Die Zusammensetzung des Primärharns unterscheidet sich kaum vom Blutplasma. Im Laufe eines Tages filtrieren die Glomeruli beider Nieren rund 180 Liter Primärharn. Um große Flüssigkeits- und Salzverluste zu vermeiden, erfolgt im Tubulussystem eine Reabsorption und eine Sekretion von Ionen und Molekülen (Pape et al., 2019).

Eine wichtige Eigenschaft des glomerulären Filters ist seine Selektivität: er ist form-, ladungs- und größenselektiv (Patrakka and Tryggvason, 2007). Einerseits müssen harnpflichtige Stoffe gefiltert werden, andererseits dürfen über den glomerulären Filter keine für den Organismus notwendigen Bestandteile wie Makromoleküle, Zellen und Proteine verloren gehen.

Um dieser Aufgabe gerecht zu werden, setzt sich der glomeruläre Filter aus drei Schichten zusammen: erstens dem fenestrierten Endothel der Kapillaren des Glomerulus, zweitens der Basalmembran und drittens der glomerulären Schlitzmembran (Pape et al., 2019).

Das fenestrierte Endothel ist das Endothel der glomerulären Kapillaren. Die Fenster sind 70-100 Nanometer (nm) groß und besitzen keine Membran (Tryggvason et al., 2006). Es ist noch nicht geklärt, welche Funktion das fenestrierte Endothel im Prozess der glomerulären Filtration übernimmt. Es konnte gezeigt werden, dass das Endothel eine negative Glykokalyx trägt. Es könnte somit sein, dass das Endothel eine Ladungsselektivität zum glomerulären Filter beiträgt, was allerdings nicht bewiesen werden konnte (Patrakka and Tryggvason, 2007, Tryggvason and Wartiovaara, 2005, Tryggvason et al., 2006).

Der zweite Anteil des glomerulären Filters ist die glomeruläre Basalmembran. An dieser sind sowohl die Endothelzellen als auch die Podozyten verankert (Patrakka and Tryggvason, 2007). Die Basalmembran ist mit ca. 300-350 nm dicker als die durchschnittliche humane Basalmembran. Die Hauptbestandteile der glomerulären Basalmembran sind Laminin, Kollagen Typ IV, Nidogen und Proteoglykane. Die Bestandteile der glomerulären Basalmembran werden von den Podozyten und den Endothelzellen synthetisiert (Perico et al., 2016, Tryggvason et al., 1999, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 2006, Tryggvason, 1999). In der glomerulären Basalmembran bilden Typ-IV-Kollagen-Moleküle ein Netzwerk, welches die glomeruläre Basalmembran verstärkt. Dieses Netzwerk scheint keine außerordentliche Rolle in der Aufrechterhaltung der Selektivität des glomerulären Filters zu besitzen, da Mutationen, die zu Veränderungen des Typ-IV-Kollagen führen, lediglich eine milde Proteinurie, dafür aber eine Hämaturie, nach sich ziehen (Tryggvason et al., 2006). Neben den Typ-IV-Kollagen-Molekülen bilden auch Laminin-Moleküle ein Netzwerk. Mutationen in dem für Laminin codierenden Gen führen zu einem rasch letal verlaufendem kongenitalem nephrotischen Syndrom (Tryggvason et al., 2006). Das Kollagen Typ IV- und das Laminin-Netzwerk sind über Nidogen miteinander verbunden (Tryggvason, 1999). Die Proteoglykan-Bestandteile der glomerulären Basalmembran besitzen Seitenketten aus Heparansulfat, was zu einer negativen Ladung der glomerulären Basalmembran führt. Auf diese Weise trägt die glomeruläre Basalmembran zu einer Ladungsselektivität des glomerulären Filters bei. Anionische Proteine werden somit an einer Passage durch die Filtrationsbarriere gehindert (Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 2006). Werden die anionischen Anteile der glomerulären Basalmembran entfernt, so zeigt sich eine erhöhte Proteinurieneigung (Tryggvason et al., 2006).

Der dritte Anteil des glomerulären Filters ist die glomeruläre Schlitzmembran. Die glomeruläre Schlitzmembran spannt sich im Sinne einer spezialisierten Zell-Zell-Verbindung zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten auf. Die Schlitzmembran kann in einen basalen und in einen apikalen Anteil unterteilt werden. Der basale Anteil der Schlitzmembran ist 23 nm, der apikale Anteil 45 nm breit. Die glomeruläre Schlitzmembran ist ein hochkomplexes Gerüst verschiedener Proteine, welche in den folgenden Unterpunkten vorgestellt werden (Conti et al., 2017). Sie dient als molekularer Filter und besitzt Poren, die kleiner als der Durchmesser eines Albumin-Moleküls sind (Huber and Benzing, 2005).

Aufgrund der komplexen Herausforderungen, die der glomeruläre Filter bewältigen muss, handelt es sich bei der glomerulären Schlitzmembran nicht um einen einfachen mechanischen Filter. Sie ist vielmehr ein dynamisches Netzwerk, das auf äußere Einflüsse reagieren und sich stetig anpassen kann (Conti et al., 2017).

Schäden am glomerulären Filter führen zu einer fehlerhaften Filtration, sodass es zunächst zu einer Albuminurie und einer Proteinurie kommt. Im weiteren Verlauf kann dies in einem Nierenversagen münden (Huber and Benzing, 2005, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999).

1.2.2 Der Podozyt

Die Podozyten sind spezialisierte, terminal differenzierte Zellen der Niere (Kriz et al., 2013, Yu et al., 2018). In einem Glomerulus befinden sich im Schnitt 800 Podozyten (Kriz et al., 2013). Der Aufbau der Podozyten ist in allen Vertebraten ähnlich (Kerjaschki, 2001): sie besitzen einen Zellkörper und schlanke Zellfortsätze, die sich von dem Zellkörper aus zur Peripherie hin entwickeln (Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003, Garg, 2018, Yu et al., 2018). Die podozytären Fortsätze bilden ein fein verzweigtes Netzwerk und können in primäre und sekundäre Fortsätze sowie tertiäre Fußfortsätze unterteilt werden (Yu et al., 2018, Benzing, 2004, Garg, 2018). Die podozytären Fußfortsätze benachbarter Podozyten interdigitieren miteinander (Benzing, 2004, Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003, Garg, 2018, Yu et al., 2018) und umschließen dabei die Glomerulus-Kapillaren (Benzing, 2004, Kerjaschki, 2001, Patrakka and Tryggvason, 2007). Die podozytären Fußfortsätze eines Podozyten können sich über mehrere Kapillarabschnitte stülpen (Burghardt et al., 2015). Die podozytären

Fußfortsätze desselben Podozyten interdigitieren nicht miteinander (Burghardt et al., 2015, Garg, 2018, Grahammer et al., 2016).

Der Podozyt kann in eine basale, apikale und laterale Domäne unterteilt werden. (Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003).

Die apikale Domäne ist derjenige Anteil des Podozyten, der dem Urinraum zugewandt ist (Kerjaschki, 2001). Sie ist geprägt von einer negativ geladenen Glykokalyx, die hauptsächlich aus Podocalyxin besteht (Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003, Patrakka and Tryggvason, 2007). Das podozytäre Aktinzytoskelett ist mit Podocalyxin verbunden. Ein *Knockout* von Podocalyxin führt zu unreifen Glomeruli und Podozyten und somit zu einer renalen Funktionseinschränkung (Kerjaschki, 2001).

Über die basale Domäne der Podozyten erfolgt die Verankerung an der glomerulären Basalmembran (Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003). Diese Domäne ist geprägt von Proteinen, die mit Bestandteilen der glomerulären Basalmembran interagieren (Kerjaschki, 2001). Zu diesen Proteinen gehören u.a. $\alpha3\beta1$ -Integrin, der Dystroglycan-Komplex und *Membrane-associated guanylate kinase 1* (Kerjaschki, 2001). Das Integrin $\alpha3\beta1$ ist das Hauptintegrin der Podozyten und bindet an Laminin, welches sich in der glomerulären Basalmembran befindet (Kriz et al., 2013). Weitere Integrine sind die $\alpha1\beta1$ - und $\alpha2\beta1$ -Integrine, die an Kollagen Typ IV binden. Eine Deletion der Integrine führt zu einem Funktionsverlust der Podozyten (Kriz et al., 2013).

Die glomeruläre Schlitzmembran, die sich zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten aufspannt (Kerjaschki, 2001), bildet die laterale Domäne und markiert die Grenze zwischen der apikalen und basalen Domäne (Kerjaschki, 2001, Pavenstadt et al., 2003). Es handelt sich bei der glomerulären Schlitzmembran um eine spezialisierte Zell-Zell-Verbindung. Nach neueren Untersuchungen scheinen die Podozyten zusätzlich zu der glomerulären Schlitzmembran weitere interzelluläre Verbindungen zu bilden. Diese Verbindungen könnten dazu dienen, einen annähernd konstanten Abstand zwischen den einzelnen Podozyten zu gewährleisten (Burghardt et al., 2015).

Die drei Domänen des Podozyten sind intrazellulär über ein hochspezialisiertes Aktinzytoskelett miteinander verbunden (Kerjaschki, 2001). Dieses Aktinzytoskelett ist dazu in der Lage, auf äußere Einflüsse zu reagieren, um so schnelle Anpassungen des Podozyten auszulösen (Yu et al., 2018).

Eine Verankerung der Podozyten an der glomerulären Basalmembran erfolgt über den Zellkörper und die größeren podozytären Fortsätze (Burghardt et al., 2015). Der

Zellkörper liegt dabei nicht direkt der Basalmembran auf, sondern es befindet sich zwischen den beiden Einheiten der subpodozytäre Raum (Burghardt et al., 2015).

Die Zellorganellen des Podozyten befinden sich im Zellkörper. Besonders erwähnenswert sind ein prominenter Zellkern, ein weit entwickeltes Golgi-System und ein ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum. In den podozytären Fußfortsätzen hingegen befinden sich fast keine Zellorganellen (Pavenstadt et al., 2003).

1.2.3 Allgemeine Struktur der glomerulären Schlitzmembran

Wie bereits oben dargestellt wurde, ist die glomeruläre Schlitzmembran eine spezialisierte Zell-Zell-Verbindung der Podozyten, sie ist eine modifizierte *adherens junction* (Pavenstadt et al., 2003). Sie spannt sich zwischen den interdigitierenden Fußfortsätzen benachbarter Podozyten auf und hat eine Breite von ca. 40 nm (Benzing, 2004).

Zu Beginn der Forschung an der glomerulären Schlitzmembran wurde von Rodewald und Karnovsky eine Reißverschluss-ähnliche Struktur als Modell für den Aufbau der glomerulären Schlitzmembran vorgeschlagen. Innerhalb dieser Reißverschlussartigen Struktur befänden sich Poren, deren Größendurchmesser in etwa der Größe von Albumin entsprechen (Holthofer, 2007, Tryggvason et al., 2006, Rodewald and Karnovsky, 1974). Nach diesem Modell würde die Funktion der glomerulären Schlitzmembran am ehesten der eines mechanischen Filters entsprechen (Holthofer, 2007).

Erst nach der Weiterentwicklung der Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie, konnten artefaktärmere Proben hergestellt werden. Darüber gelang der Nachweis, dass die glomeruläre Schlitzmembran vielmehr einen schichtartigen Aufbau aufweist (Tryggvason et al., 2006). Sie setzt sich aus dünnen neben- und übereinander liegenden Schichten zusammen, die in der Mitte überlappen (Tryggvason et al., 2006, Conti et al., 2017, Grahammer et al., 2016). In der Mitte der glomerulären Schlitzmembran befinden sich mehrere runde bis elliptische Poren. Diese Poren besitzen einen Durchmesser in der Größe eines Albuminmoleküls (Tryggvason et al., 2006).

Die glomeruläre Schlitzmembran kann in einen basalen, näher zur glomerulären Basalmembran liegenden und einen apikalen Anteil unterteilt werden. Der basale Anteil misst 23 nm und wird hauptsächlich durch Nephl-Moleküle gebildet. Der apikale Anteil misst 45 nm und enthält hauptsächlich Nephrin-Moleküle (Conti et al., 2017, Grahammer

et al., 2016). Das Verhältnis der Anzahl an Nephrin- zu Neph1-Molekülen beträgt ungefähr 1:2,5 (Grahammer et al., 2016).

Diese Proteine bilden das Grundgerüst der glomerulären Schlitzmembran und werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

1.3 Proteine der glomerulären Schlitzmembran

1.3.1 Nephrin

Nephrin ist ein 180 Kilodalton (kDa) schweres Protein und bildet den Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran (Pavenstadt et al., 2003, Yu et al., 2018). Es ist das erste Protein, welches der glomerulären Schlitzmembran zugeordnet werden konnte (Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999). Nephrin wird durch das Gen NPHS1 codiert, welches auf Chromosom 19q13.1 liegt (Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999). Eine glomeruläre Expression von NPHS1 erfolgt ausschließlich durch Podozyten (Pavenstadt et al., 2003, Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Conti et al., 2017, Kestila et al., 1998, Tryggvason, 1999) im Bereich der glomerulären Schlitzmembran (Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999, Ruotsalainen et al., 1999).

Das Nephrinmolekül besteht aus einem cytoplasmatisch gelegenen Carboxy-Terminus (C-Terminus), einer kurzen Transmembrandomäne und einem langen, extrazellulären Fibronektin Typ III-Motiv mit acht Immunglobulin G (IgG)-ähnlichen Motiven (Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999). Aufgrund dieser IgG-Motive zählt Nephrin zu der Ig-Superfamilie (Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999).

Auf welche Weise wurde die Bedeutung von Nephrin für die glomeruläre Filtration erkannt?

Das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typen ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die in Finnland mit einer Häufigkeit von 1:8200 auftritt (Tryggvason et al., 2006). Die Patienten, die von dieser Krankheit betroffen sind, weisen bereits *in utero* eine Proteinurie auf (Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999). Erkrankte Neugeborene weisen die Symptome eines nephrotischen Syndroms auf: Proteinurie, Hypalbuminämie, Hyperlipidämie, abdominelle Umfangsvermehrung und periphere Ödeme (Tryggvason et al., 2006). Ursächlich für diese Krankheit ist eine Mutation von NPHS1, dem Gen, das für Nephrin codiert

(Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999). Typischerweise sind die Nieren Erkrankter vergrößert, es fallen dilatierte proximale Tubuli auf. Elektronenmikroskopisch zeigt sich ein Verlust von podozytären Fußfortsätzen und der glomerulären Schlitzmembran, es findet ein podozytäres *Effacement* statt (Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999). Die Erkrankung verläuft chronisch-progredient und endet in der Regel innerhalb von zwei Jahren postnatal letal (Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999). Als einziges Heilmittel steht derzeit die Nierentransplantation zur Verfügung (Tryggvason et al., 2006, Kestila et al., 1998, Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999).

Analog zu dem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ führt ein Nephrin-*Knockout* im Mausversuch zu einem nephrotischen Syndrom mit zügigem letalen Verlauf. Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine verminderte Podozytenanzahl und eine fehlende glomeruläre Schlitzmembran, also zeigt sich auch hier ein podozytäres *Effacement* (Putala et al., 2001). Die interzellulären Kontakte wandeln sich in ein *tight junctions*-basiertes Modell um (Grahammer et al., 2016).

Bereits in der Nephrogenese übernimmt Nephrin eine bedeutsame Rolle für die Niere: liegt eine Mutation im NPHS1-Gen vor, so können sich im Verlauf der Nierenreifung keine physiologischen Verbindungen zwischen Podozyten ausbilden. Später bildet sich auch keine Schlitzmembran aus und die podozytären Fußfortsätze sind miteinander verschmolzen (Ruotsalainen et al., 2000).

Mitglieder der Ig-Superfamilie übernehmen häufig die Aufgabe von Adhäsionsmolekülen mit Signalwirkung. Daher ist es naheliegend anzunehmen, dass auch Nephrin eine ähnliche Funktion in der glomerulären Schlitzmembran übernimmt (Tryggvason et al., 1999). Mitglieder der Ig-Superfamilie sind dazu in der Lage homophile Bindungen einzugehen (Tryggvason, 1999, Ruotsalainen et al., 1999, Putala et al., 2000). Es konnte auch für Nephrin die Bildung von Homodimeren nachgewiesen werden (Gerke et al., 2003, Huber and Benzing, 2005).

Es befinden sich im Nephrin-Molekül freie Cystein-Reste, zwischen denen sich intermolekulare Disulfid-Brücken ausbilden können. Dies stabilisiert die glomeruläre Schlitzmembran zusätzlich (Tryggvason, 1999, Ruotsalainen et al., 1999, Putala et al., 2000). Werden diese freien Cystein-Reste im Tierversuch entfernt, so entwickeln die Tiere prompt eine Proteinurie und einen Symptomenkomplex, der den Symptomen des kongenitalen nephrotischen Syndroms gleicht (Tryggvason, 1999).

Was sind die Aufgaben der einzelnen Bestandteile des Nephrinmoleküls?

Der cytoplasmatische C-Terminus von Nephrin ist ein wichtiger Ausgangspunkt für Signalkaskaden. Er enthält insgesamt neun Tyrosinreste (Y), welche einen möglichen Angriffspunkt von Kinasen darstellen und somit phosphoryliert werden können (Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999, Verma et al., 2003, Lahdenperä et al., 2003, Li et al., 2004). Besonders hervorzuheben sind die hochkonservierten Tyrosinreste. Bezugnehmend auf das humane Nephrin sind dies Y1176, Y1193 und Y1217 (Lahdenperä et al., 2003).

Eine Phosphorylierung von Nephrin erfolgt unter anderem durch die Src-Kinase Fyn (Li et al., 2004). Diese Phosphorylierung setzt verschiedene Signalkaskaden in Gang. Phosphoryliertes Nephrin ist dazu in der Lage mit Hilfe anderer Proteine das Aktinzytoskelett zu modifizieren und zu regulieren (Yu et al., 2018). Desweiteren sendet die erfolgreiche Phosphorylierung von Nephrin antiapoptotische Signale an den Podozyten (Tryggvason et al., 2006). Die Bedeutung der Nephrinphosphorylierung durch Fyn lässt sich durch den Phänotypen Fyn-defizienter Mäuse verdeutlichen: die Mäuse entwickeln eine schwere Proteinurie und weisen ein podozytäres *Effacement* auf (Tryggvason et al., 2006).

Der extrazelluläre Anteil von Nephrin übernimmt Aufgaben einer spezialisierten Zell-Zell-Verbindung, ähnlich den Aufgaben anderer Mitglieder der Ig-Superfamilie (Kestila et al., 1998).

Was passiert nach einer podozytären Schädigung mit Nephrin? Eine Schädigung des podozytären Aktinzytoskeletts im Rahmen eines podozytären *Effacements* führt zu einer Phosphorylierung von Nephrin. Bei Umkehr des podozytären *Effacements* ging auch die Nephrin-Phosphorylierung zurück (Verma et al., 2006).

1.3.2 Neph1

Neben Nephrin ist Neph1 ein weiterer wichtiger Bestandteil der glomerulären Schlitzmembran (Liu et al., 2003). Neph1 ist 110 kDa schwer (Liu et al., 2003). Neph1 zeigt eine starke Expression in der Niere und weist einen ähnlichen Aufbau wie Nephrin auf: Neph1 besteht aus fünf IgG-Motiven, einer Signal-Domäne und einer Transmembrandomäne (Donoviel et al., 2001, Sellin et al., 2003, Gerke et al., 2005). Somit gehört Neph1 ebenfalls zur Ig-Superfamilie (Benzing, 2004). Der cytoplasmatische Anteil von Neph1 enthält zwei SH2-Gruppen, die potenzielle Phosphorylierungsstellen

darstellen (Liu et al., 2003). Ähnlich wie bei Nephrin führt eine Phosphorylierung des cytoplasmatischen Anteils von Neph1 zu einer verstärkten Signaltransduktion (Huber and Benzing, 2005).

Die Neph-Proteine der Säugetiere sind hochkonserviert, was auf eine große Bedeutung für die Funktion der Niere hinweist (Huber and Benzing, 2005, Gerke et al., 2005, Grahammer et al., 2016). Mittels *Knockout*-Versuchen konnte die Wichtigkeit von Neph1 für die Nierenfunktion verdeutlicht werden: bereits postnatal entwickeln Neph1-*Knockout*-Mäuse eine schwere Proteinurie, die letal endet (Tryggvason et al., 2006, Conti et al., 2017, Donoviel et al., 2001, Sellin et al., 2003). Histopathologisch zeigt sich auch bei einem Neph1-*Knockout* ein schweres podozytäres *Effacement*, vergleichbar mit den Veränderungen bei einem Nephrin-*Knockout*. Im Gegensatz zu einem Nephrin-*Knockout* verläuft der Neph1-*Knockout* insgesamt etwas milder: im Mausversuch versterben die betroffenen Tiere erst nach ca. 3-8 Wochen, während bei einem Nephrin-*Knockout* die betroffenen Tiere bereits nach 24 h versterben (Donoviel et al., 2001).

Genauso wie Nephrin bildet auch Neph1 Homodimere (Liu et al., 2003, Gerke et al., 2003). Desweiteren interagiert Neph1 mit Nephrin (Tryggvason et al., 2006, Huber and Benzing, 2005, Gerke et al., 2003). Die Interaktion erfolgt jeweils über die extrazellulären Domänen der beiden Proteine (Liu et al., 2003).

Neben Neph1 konnten auch Neph2 und Neph3 als strukturell ähnliche Proteine identifiziert werden (Sellin et al., 2003). Sowohl Neph2 als auch Neph3 werden in der Niere exprimiert. Bei Neph2 gelang die Lokalisierung im Bereich der glomerulären Schlitzmembran. Desweiteren interagierte Neph2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit Nephrin und ist dazu in der Lage Homodimere auszubilden. Eine Interaktion von Neph1 und Neph2 konnte nicht nachgewiesen werden. Die Funktion von Neph3 konnte nicht abschließend geklärt werden (Gerke et al., 2005).

1.3.3 Podocin

Podocin ist ein Stomatin-ähnliches Protein (Pavenstadt et al., 2003, Conti et al., 2017, Boute et al., 2000), welches durch NPHS2 codiert wird (Pavenstadt et al., 2003, Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Boute et al., 2000). Podocin ist 42 kDa schwer (Boute et al., 2000, Roselli et al., 2002). Eine Expression von Podocin konnte in der fetalen und adulten Niere nachgewiesen werden (Boute et al., 2000, Roselli et al., 2002) und erfolgt ausschließlich durch Podozyten (Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Conti et al.,

2017, Boute et al., 2000, Roselli et al., 2002, Schwarz et al., 2001). Podocin befindet sich fast ausschließlich an der Insertionsstelle der Schlitzmembran an der Plasmamembran (Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Conti et al., 2017, Roselli et al., 2002, Schwarz et al., 2001).

Die Struktur von Podocin ähnelt der einer Haarnadel: sowohl der C- als auch der Aminoterminus (N-Terminus) liegen intrazellulär. Beide Anteile enthalten jeweils eine Transmembrandomäne (Yu et al., 2018, Tryggvason et al., 2006, Conti et al., 2017, Huber et al., 2003).

Podocin bildet Oligomere aus und ist dazu in der Lage, hochorganisierte Komplexe in Form von *lipid rafts* zu bilden. *Lipid rafts* besitzen eine spezielle Lipidzusammensetzung aus Glycosphingolipiden, Cholesterol, GPI-verankerten Proteinen und Signalmolekülen. *Lipid rafts* sind funktionelle Einheiten der Zellmembran, an denen eine Vielzahl von Signalkaskaden abläuft (Schwarz et al., 2001).

Die Interaktion zweier Podocin-Moleküle erfolgt entweder jeweils über die beiden C- oder die beiden N-Termini. Die Interaktion von Podocin mit anderen Proteinen wie beispielweise Nephrin oder Neph1 erfolgt über Podocins PHB-Domäne (Huber et al., 2003). Podocin interagiert über seinen C-Terminus mit den intrazellulären Anteilen von Nephrin, Neph1 und *CD2-associated protein* (CD2AP) (Tryggvason et al., 2006, Schwarz et al., 2001)(zu Nephrin: (Huber et al., 2001)).

Eine Funktion von Podocin ist die Rekrutierung Nephrins an *lipid rafts*. (Yu et al., 2018, Conti et al., 2017, Huber et al., 2003). Dort interagiert Nephrin u.a. mit CD2AP, was die weiteren Interaktionen und Signalwege dieser Proteine erleichtert (Schwarz et al., 2001). Durch die Rekrutierung von Nephrin an *lipid rafts* wird die Signalwirkung Nephrins um ein Vielfaches verstärkt (Huber and Benzing, 2005, Li et al., 2004, Huber et al., 2003, Huber et al., 2001). Die Interaktion von Nephrin und Podocin wird durch die Tyrosin-Phosphorylierung von Nephrin mittels der Src-Kinase Fyn verstärkt.

Welche Folgen für die Nierenfunktion hat eine Schädigung von Podocin? Eine der am besten charakterisierten Erkrankungen, denen eine Mutation von Podocin zugrunde liegt, ist das familiäre steroid-resistente nephrotische Syndrom (Boute et al., 2000). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Erkrankte Patienten leiden bereits in der frühen Kindheit an einer Proteinurie (Tryggvason et al., 2006). Auch bei einem Podocin-*Knockout* zeigt sich ein schweres podozytäres Effacement mit z.T. fehlender glomerulärer Schlitzmembran. Desweiteren wird Nephrin in verminderten Umfang exprimiert. Somit scheint Podocin essenziell für

die Verteilung und Organisation von Nephrinmolekülen zu sein. Im Gegensatz zur Nephrinexpression wiesen *Zonula occludens protein 1* (ZO-1) und CD2AP ein erhöhtes Expressionslevel auf (Roselli et al., 2004). Eine Mutation in Podocin hat eine fehlende Nephrin-Rekrutierung an *lipid rafts* zur Folge (Huber et al., 2003). Im Mausmodell konnte eine schwere Proteinurie und ein frühes postnatales Versterben bei Podocin-Defizienz nachgewiesen werden (Tryggvason et al., 2006).

1.3.4 *Tight*- und *adherens junction*-Proteine

Nephrin als Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran bildet einen Protein-Komplex mit Cadherinen, Cateninen, ZO-1 und CD2AP (Huber and Benzing, 2005). Typische *adherens junction*-Proteine in der glomerulären Schlitzmembran umfassen Cadherin 3, FAT1 und die Catenine (Conti et al., 2017). Es konnten auch typische *tight junction*-Proteine wie ZO-1 (Tryggvason et al., 2006, Tryggvason et al., 1999, Huber and Benzing, 2005, Reiser et al., 2000, Schnabel et al., 1990), Densin, *Membrane-associated guanylate kinase 1*, (Tryggvason et al., 2006) Occludin, JAM-A und Cingulin (Conti et al., 2017) als Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran nachgewiesen werden.

In der glomerulären Schlitzmembran interagiert Nephrin sowohl mit den *tight* als auch mit den *adherens junction*-Proteinen (Conti et al., 2017). Im Folgenden wird auf einige wichtige Vertreter der oben genannten Proteine eingegangen.

ZO-1 kann sowohl in differenzierten als auch in undifferenzierten Podozyten auf der cytoplasmatischen Seite der glomerulären Schlitzmembran nachgewiesen werden. In differenzierten Podozyten befindet sich ZO-1 im Bereich der interdigitierenden podozytären Fußfortsätze (Reiser et al., 2000, Schnabel et al., 1990). ZO-1 ist sowohl Bestandteil von *tight* als auch von *adherens junctions*. In Podozyten können weder Symplekin noch Occludin als unabdingbare Bestandteile von *tight junctions* nachgewiesen werden. Dafür werden Proteine aus der Cadherin- und Catenin-Familie exprimiert. Diese Proteine sind typischerweise Bestandteile von *adherens junctions* (Reiser et al., 2000).

Zusammenfassend sind die Proteine aus der Familie der *tight* und *adherens junction*-Proteine sehr wichtig für die Aufrechterhaltung der glomerulären Schlitzmembran. Betrachtet man die Zusammensetzung der glomerulären Schlitzmembran genauer, so handelt es sich bei dieser um eine modifizierte *adherens junction*, da sie die Bestandteile

einer *adherens junction* enthält und deren Charakteristika aufweist (Huber and Benzing, 2005, Reiser et al., 2000).

1.4 Das Zytoskelett des Podozyten

Das podozytäre Zytoskelett gliedert sich in die 7 bis 9 nm dicken Mikrofilamente, die etwa 10 nm dicken intermediären Filamente und die 24 nm dicken Mikrotubuli (Pavenstadt et al., 2003). Im Zellkörper der Podozyten und in den größeren podozytären Fortsätzen wird das Zytoskelett vor allem durch Mikrotubuli und Intermediärfilamente gebildet. Die weiter verzweigten podozytären Fußfortsätze besitzen ein Zytoskelett, das sich aus Mikrofilamenten, vor allem F-Aktin, zusammensetzt (Pavenstadt et al., 2003, Garg, 2018). Die Fußfortsätze der Podozyten besitzen einen kontraktilen Apparat aus Aktin, Myosin-II, α -Actinin, Talin, Paxillin und Vinculin (Benzing, 2004).

Das podozytäre Aktinzytoskelett ist hochspezialisiert und gliedert sich in ein kortikales Aktin-Netzwerk und zentrale Aktinbündel (Huber and Benzing, 2005, Ichimura et al., 2003). Es ist dynamisch und kann sich an externe Einflüsse anpassen (Kerjaschki, 2001, Benzing, 2004, Huber and Benzing, 2005). Es erfolgt eine stetige Bildung und ein stetiger Abbau von Aktinfilamenten (Kerjaschki, 2001). Die Schlitzmembranproteine sind über Ankerproteine an das Aktinzytoskelett gebunden. Hierüber können die Schlitzmembranproteine Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen (Benzing, 2004, Garg, 2018).

Die basale Domäne des Podozyten ist über Dystroglycan/Utrophin, Integrine, Talin, Paxillin und Vinculin am Aktinzytoskelett verankert. Podocalyxin als Hauptbestandteil der apikalen Domäne des Podozyten bindet über NHERF-2 und Ezrin an Aktin. Die Proteine der Schlitzmembran sind unter anderem durch CD2AP an Aktin gebunden (Kerjaschki, 2001).

Wird der Podozyt geschädigt, so kommt es zu einer Konformationsänderung des Aktinzytoskeletts. Durch diese Vorgänge können eine Proteinurie und Veränderungen der Schlitzmembran zustande kommen (Benzing, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass ein Entfernen von Nephrin und Neph1 aus der glomerulären Schlitzmembran zu einer Veränderung des Aktinzytoskeletts und nachfolgend zu einem podozytären *Effacement* führt (Benzing, 2004, Huber and Benzing, 2005).

Zusammenfassend ist ein intaktes Aktinzytoskelett unabdingbar für die Funktion des Podozyten.

1.5 Ankerproteine an das Aktinzytoskelett

1.5.1 CD2AP

CD2AP ist ein 80 kDa schweres Protein, welches ein Teil der Ig-Superfamilie ist (Li et al., 2000). Es wird ubiquitär exprimiert und ist vor allem als ein Protein charakterisiert, welches T-Zellen die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen ermöglicht (Shih et al., 1999). Eine renale Expression von CD2AP kann in den Podozyten, in den epithelialen Zellen der Sammelrohre und in einigen Anteilen des Tubulussystems nachgewiesen werden (Li et al., 2000, Shih et al., 1999). In Podozyten wird CD2AP entlang der glomerulären Basalmembran exprimiert (Li et al., 2000, Shih et al., 2001).

Bei CD2AP handelt es sich um ein cytoplasmatisch gelegenes Protein, welches unter anderem mit den intrazellulären Domänen von Nephrin und Podocin interagiert (Tryggvason et al., 2006, Li et al., 2000, Wolf and Stahl, 2003). Das Protein ist beteiligt an der Endozytose und an Signalkaskaden der Schlitzmembran (Tryggvason et al., 2006, Wolf and Stahl, 2003).

CD2AP bindet über seinen N-Terminus am Aktinzytoskelett (Wolf and Stahl, 2003). Dadurch, dass CD2AP sowohl mit Nephrin als auch mit dem Aktinzytoskelett interagiert, ist CD2AP dazu in der Lage, Nephrin am Aktinzytoskelett zu verankern (Conti et al., 2017).

Im Maus-Modell verstarben nach *Knockout* des für CD2AP codierenden Gens nach 6-7 Wochen die Tiere aufgrund eines nephrotischen Syndroms (Tryggvason et al., 2006, Li et al., 2000, Shih et al., 1999). Somit ist CD2AP wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten glomerulären Schlitzmembran (Li et al., 2000, Shih et al., 1999).

Patienten mit einem CD2AP-Defekt weisen unterschiedliche Symptome auf, u.a. die Symptome einer Glomerulonephritis und einer Glomerulosklerose (Tryggvason et al., 2006). Eine CD2AP-Haploinsuffizienz führt zu einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber glomerulärer Schädigung (Benzing, 2004).

1.5.2 Die Nck-Proteinfamilie

Weitere Ankerproteine der glomerulären Schlitzmembranproteine an das Aktinzytoskelett sind die *Non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein* (Nck)-Proteine.

Nck1 und Nck2 werden von Podozyten exprimiert. Im Mausmodell wiesen weder Nck1- noch Nck2-*Knockout*-Tiere eine schwere Nierenschädigung auf. Erst bei einem doppelten Nck1/Nck2-*Knockout* verstarben die Mäuse bereits in der Embryonalzeit. Elektronenmikroskopisch zeigten sich Anzeichen eines podozytären *Effacements*: die podozytären Fußfortsätze sind verplumpt bis zur Verschmelzung von Fußfortsätzen, es zeigte sich ein genereller Verlust von Podozyten. Somit ist von einer überlappenden Funktion von Nck1 und Nck2 auszugehen, da erst eine kombinierte Fehlfunktion beider Proteine zu einem fatalen renalen Phänotyp führt (Jones et al., 2006).

Über eine Domäne sind die Nck-Proteine dazu in der Lage, an Aktin zu binden, über eine andere Domäne binden sie an Nephrin. Nck kann die Struktur des Aktinzytoskeletts modifizieren. Somit hat Nephrin über Nck die Möglichkeit, das Aktinzytoskelett zu verändern (Jones et al., 2006).

Sowohl Nck1 als auch Nck2 interagieren *in vivo* und *in vitro* über ihre SH2-Domäne mit einem phosphorylierten Tyrosinrest von Nephrin. Nephrin enthält mit den Tyrosinresten an den Positionen 1176, 1193 und 1217 mehrere potenzielle Interaktionsstellen für Nck. Mittels Mutationsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Nck an Nephrin bei einer Y1176F/Y1217F-Doppelmutation deutlich herabgesetzt und bei einer Dreifachmutation gar nicht mehr vorhanden war. Somit besitzt Nephrin mehrere Bindungsstellen für Nck (Jones et al., 2006).

Nck ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Struktur der podozytären Fußfortsätze in der adulten Niere. Nach einer Deletion von Nck2 in Nck1-*Knockout*-Mäusen nach abgeschlossener Nephrogenese in der vierten Lebenswoche zeigte sich ein podozytäres *Effacement* und die Tiere litten an einer Proteinurie (Jones et al., 2009).

1.6 *Signaling* an der glomerulären Schlitzmembran

Die Proteine der glomerulären Schlitzmembran übernehmen neben den strukturellen Aufgaben auch die Aufgabe der Signaltransduktion von der Schlitzmembran in das Zellinnere. Damit Signale von extrazellulär nach intrazellulär geleitet werden können, werden transmembranäre Rezeptoren benötigt, an die Liganden binden können. Nach der Bindung von Liganden erfolgt eine Aktivierung der Rezeptoren und eine Weiterleitung in das Zellinnere über weitere Proteine. Eine Regulierung solcher Signalwege kann über eine Phosphorylierung/Dephosphorylierung erfolgen. Durch diesen Mechanismus entstehen neue Bindungsstellen für Proteine und Enzyme.

Solche transmembranäre Proteine, wie sie oben beschrieben werden, sind Nephlin und Neph1. Die extrazellulären Anteile von Nephlin und Neph1 sind Bestandteile der glomerulären Schlitzmembran und sie besitzen jeweils eine transmembranäre Domäne. Die kurzen cytoplasmatischen Anteile enthalten Tyrosin-Reste, welche sowohl *in vivo* als auch *in vitro* von den Kinasen Fyn und Yes phosphoryliert werden. Durch diese Phosphorylierung wird wahrscheinlich die Signaltransduktion von Nephlin und Neph1 kontrolliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Nephlin und Neph1 über Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) den Transkriptionsfaktor AP-1 aktivieren können und somit die Transkription stimulieren (Benzing, 2004).

Die Signalwirkung von Nephlin wird durch die Interaktion mit Podocin verstärkt und durch eine Dephosphorylierung von Nephlin abgeschwächt. Die Signalwirkung von Neph1 wird durch die Interaktion mit ZO-1 verstärkt (Benzing, 2004).

Zur Weiterleitung von Signalen in das Zellinnere werden Adaptorproteine benötigt, welche an den cytoplasmatischen Anteil von Rezeptoren binden können. Ein Beispiel für ein solches Adaptorprotein ist p85. p85 bindet *in vivo* an den phosphorylierten cytoplasmatischen Anteil von Nephlin. p85 reguliert Phosphoinositid-3-Kinasen, welche dazu in der Lage sind, Lipide an der Innenseite von Zellmembranen zu phosphorylieren. An diese phosphorylierten Membranlipide können dann verschiedene Signalproteine binden und wichtige Zellprozesse wie die Endozytose, das Aktinzytoskelett, den Zellmetabolismus und insgesamt das Zellüberleben regulieren (Benzing, 2004).

1.7 Podozytäre Reaktion auf Stress

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Podozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, können sich diese nach einer glomerulären Schädigung nicht mehr teilen. Selbst unter physiologischen Bedingungen gehen täglich Podozyten verloren, was allerdings von den übrigen Podozyten kompensiert werden kann. Bei renalen Erkrankungen glomerulären Ursprungs zeigt sich ein vermehrter Verlust von Podozyten. Gehen in einem Glomerulus mehr als 60 % der Podozyten unter, so geht das gesamte Nephron unter. Podozyten müssen somit dazu in der Lage sein, trotz widriger Umstände lange überlebensfähig zu bleiben (Kriz et al., 2013).

Wird ein Glomerulus geschädigt, so reagieren die Podozyten in einer typischen Art und Weise: Der Zellkörper der Podozyten hypertrophiert, damit dieselbe Fläche der

glomerulären Kapillaren trotz geringerer Anzahl der Podozyten bedeckt wird (Kriz et al., 2013, Garg, 2018). Durch diese Hypertrophie sind die Podozyten vulnerabler gegenüber weiteren Schädigungen (Kriz et al., 2013). Die podozytären Fußfortsätze ziehen sich zum Zellkörper zurück, sie sind verbreitert und interdigitieren nicht mehr miteinander (Kerjaschki, 2001, Kriz et al., 2013, Benzing, 2004). Die Podozyten verplumpen und breiten sich aus (Garg, 2018). Diese Prozesse, die bei einer podozytären Schädigung ablaufen, werden als podozytäres *Effacement* bezeichnet.

Der Prozess des podozytären *Effacements* kann in zwei Stadien eingeteilt werden. Das erste Stadium ist gekennzeichnet durch den Rückzug der feinen Fußfortsätze und die Bildung kurzer, irregulär geformter Zellfortsätze. *Tight junctions* ersetzen die glomeruläre Schlitzmembran (Kriz et al., 2013). Im zweiten Stadium des podozytären *Effacements* ziehen sich die Fußfortsätze vollständig zurück und verschmelzen mit dem Zellkörper. Die Podozyten fusionieren mit der glomerulären Basalmembran und es kommt zu einer Verschmälerung des subpodozytären Raums (Kriz et al., 2013). Durch diese Umwandlung der glomerulären Schlitzmembran kommt es zu einer Schädigung des glomerulären Filters.

Zusätzlich verändert sich das podozytäre Aktinzytoskelett (Benzing, 2004). Es zeigt sich eine höhere Dichte an Mikrofilamenten, die an der Basis der Fußfortsätze Stressfasern ausbilden (Pavenstadt et al., 2003, Kriz et al., 2013).

Das podozytäre *Effacement* scheint keine reine Schädigungsform zu sein, sondern vielmehr eine komplexe Antwort auf Stress (Kriz et al., 2013, Garg, 2018). Kommt es zu keiner Aufhebung des podozytären *Effacements*, so kommt es zu einer Loslösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran (Kriz et al., 2013). Ein podozytäres *Effacement* ist reversibel, während eine komplette Loslösung der Podozyten nicht reversibel ist. Beim podozytären *Effacement* handelt es sich wahrscheinlich um einen Prozess, der eine Loslösung der Podozyten von der glomerulären Basalmembran verhindern soll (Kriz et al., 2013).

Ein weiteres Indiz dafür, dass das podozytäre *Effacement* keine reine Schädigungsform ist, ist die Tatsache, dass es hochorganisiert abläuft. Der Podozyt entwickelt nach einer Schädigung Filopodien und Lamellipodien aus. Die Basis beider Strukturen ist Aktin. Lamellipodien sind breite Membranausstülpungen, während Filopodien scharfe, dünne Strukturen sind. Desweiteren werden fokale Adhäsionen gelöst und wieder neu gebildet. Somit sind die Podozyten während des Ablaufes dieser Prozesse mobil (Garg, 2018). Nephrin wird nach einer podozytären Schädigung phosphoryliert.

Daraufhin kann Nck an Nephrin binden und eine Aktinpolymerisierung initiieren. So gelingt es dem Podozyten, dynamisch auf Veränderungen zu reagieren. Nephrin scheint somit dazu in der Lage zu sein, die Bildung von Lamellipodien zu steuern (Garg, 2018).

Klinisches Korrelat eines fortgeschrittenen podozytären *Effacements* ist eine Proteinurie (Benzing, 2004). Die Proteinurie gilt als eines der ersten Anzeichen einer glomerulären Schädigung (Pavenstadt et al., 2003) und nahezu jede glomeruläre Schädigung führt über eine Veränderung der podozytären Fußfortsätze zu einer Proteinurie (Conti et al., 2017).

1.8 Protein 4.1O

Wie bereits anfangs beschrieben wurde, konnten SNPs im Bereich des FRMD3-Gens im Rahmen einer GWAS als mögliche Ursache für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie identifiziert werden. FRMD3 codiert für das Bande 4.1 Protein, *ovary type* (Protein 4.1O). Doch was ist bislang über dieses Protein bekannt?

Das Protein 4.1O gehört zu den *4.1-ezrin-radixin-moesin (FERM)-Domain containing* Proteinen. Die *FERM-Domain containing* Proteine umfassen die Bande 4.1-Proteine (4.1-Proteine), Ezrin, Radixin und Moesin (Chishti et al., 1998). Eine Aufgabe dieser Proteine ist die Verankerung von Zellmembranproteinen mit dem Aktinzytoskelett (Chishti et al., 1998, Hoover and Bryant, 2000). Desweiteren lassen sich 4.1-Proteine im Bereich interzellulärer Verbindungen nachweisen (Hoover and Bryant, 2000).

Die FERM-Domäne wurde als erstes in den 4.1-Proteinen entdeckt. Bei den meisten Mitgliedern der *FERM-Domain containing* Proteine befindet sich die FERM-Domäne N-terminal (Chishti et al., 1998). Die 4.1-Proteine sind nach ihrer Position im Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)-*Page* benannt (Hoover and Bryant, 2000).

Was charakterisiert die 4.1-Proteine? Als erstes Mitglied der 4.1-Proteine konnte 4.1R identifiziert werden (Hoover and Bryant, 2000, Ni et al., 2003). Dieses Protein kommt in Erythrozyten vor und ist dort an der Aufrechterhaltung von Form, Stabilität aber auch Flexibilität der Erythrozyten beteiligt. 4.1R interagiert lateral mit Spektrin und Aktin, und vertikal mit Glykophorin C und Bande 3 (Ni et al., 2003). Weitere Mitglieder der 4.1-Familie sind 4.1G als *general type*, 4.1B als *brain type* und 4.1N als *neuron type*. Die Strukturen der 4.1-Proteine ähneln einander. Alle 4.1-Proteine besitzen eine FERM-Domäne, eine Spektrin/Aktin-bindende Domäne und eine C-terminale Domäne. (Hoover and Bryant, 2000, Ni et al., 2003, Diakowski et al., 2006).

Die FERM-Domäne befindet sich N-terminal und ist eine membranbindende Domäne. Desweiteren kann die FERM-Domäne den cytoplasmatischen Anteil integraler Membranproteine wie Glykophorin C oder Bande 3 binden (Ni et al., 2003). Die FERM-Domäne ist 30 kDa schwer (Diakowski et al., 2006) und enthält drei Subdomänen: die N-, alpha- und C-Untereinheit. Diese drei Untereinheiten bilden eine kleeblattartige Struktur (Diakowski et al., 2006).

Die Spektrin/Aktin-bindende Domäne befindet sich internal und ist 8-10 kDa schwer. Wie der Name bereits verrät, kann dieser Anteil der 4.1-Proteine an Spektrin/Aktin binden (Ni et al., 2003, Diakowski et al., 2006).

Die C-terminale Domäne ist 22-24 kDa schwer (Ni et al., 2003, Diakowski et al., 2006) und interagiert mit Proteinen, die Bestandteile von *tight junctions* sind, beispielsweise Occludin, ZO-1 und ZO-2 (Diakowski et al., 2006).

Protein 4.1O wurde als neues Mitglied der 4.1-Proteine entdeckt. Eine 4.1O-Expression konnte zunächst im Ovar nachgewiesen werden, daher auch die Namensbezeichnung „O“. Die Aminosäuresequenz des Proteins 4.1O ist 553 Aminosäuren (AA) lang. Die für die FERM-Proteine charakteristische FERM-Domäne befindet sich zwischen den AA 6-181. Das Gen, welches für 4.1O codiert, befindet sich auf Chromosom 9q21-9q22. Bei einem Vergleich der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz und der komplementären DNA-Sequenz kann man feststellen, dass das Gen von 4.1O aus 14 Exons und 13 Introns besteht (Ni et al., 2003).

Um der Funktion von Protein 4.1O auf den Grund zu gehen, wurde das 4.1O-Ortholog im Zebrafisch – *mosaic eyes* – untersucht. Ursprünglich wurde *mosaic eyes* als Protein charakterisiert, das für eine regelrechte Gewebeorganisation im Auge benötigt wird. *Mosaic eyes* ist ein *FERM-Domain containing* Protein, welches in Podozyten exprimiert wird. Zebrafischlarven mit einem homozygoten *Knockdown* von *mosaic eyes* zeigen 80 *hours post fertilisation* ein schweres perikardiales Ödem, ein frühes Zeichen eines nephrotischen Syndroms. Elektronenmikroskopisch zeigen sich der glomerulären Basalmembran anhaftende podozytäre Fußfortsätze mit fehlender glomerulärer Schlitzmembran (Kramer-Zucker et al., 2005). Um die Durchlässigkeit des glomerulären Filters zu überprüfen, wird 500 kDa Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran in die Hauptvene der Zebrafischlarven injiziert und anschließend die retinale Fluoreszenz gemessen. Bei Wildtyp (WT)-Larven zeigt sich kein Verlust von fluoreszierendem Dextran, der glomeruläre Filter ist intakt. Sowohl bei homozygoten Nephrin-, Podocin-, als auch *mosaic eyes*-Mutanten zeigt sich ein deutlicher Verlust von fluoreszierendem

Dextran, der glomeruläre Filter ist durchlässig. Somit sind Nephrin, Podocin und *mosaic eyes* unabdingbar für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des glomerulären Filters (Kramer-Zucker et al., 2005).

Aufgrund der Bedeutung von *mosaic eyes* im Zebrafisch sowie dessen Assoziation mit der diabetischen Nephropathie, ist es naheliegend, die Funktion von Protein 4.1O zu untersuchen.

1.9. Ziele der Arbeit

Um die Funktion von Protein 4.1O zu charakterisieren, wurden bereits die ersten Erkenntnisse in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gesammelt (Ohlsson, 2018).

So konnte gezeigt werden, dass Protein 4.1O in humanen Podozyten exprimiert wird. Desweiteren interagiert Protein 4.1O mit dem Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran, Nephrin. Auch eine Interaktion mit Neph1 konnte nachgewiesen werden (Ohlsson, 2018).

Bisher charakterisierte Mitglieder der 4.1-Familie interagieren mit dem Aktinzytoskelett. Tatsächlich konnte auch für Protein 4.1O eine Interaktion mit G-Aktin nachgewiesen werden (Ohlsson, 2018).

Da Protein 4.1O einerseits mit Nephrin und andererseits mit Aktin interagiert, wurde untersucht, ob Protein 4.1O eine Ankerfunktion von Nephrin an das Aktinzytoskelett übernimmt. Bisher sind vor allem die Proteine der Nck-Familie ausführlich als Ankerproteine von Nephrin an Aktin beschrieben worden. Protein 4.1O hemmt diese Interaktion zwischen Nephrin und Nck2, somit scheint Protein 4.1O eine ähnliche Aufgabe wie Nck2 zu übernehmen (Ohlsson, 2018).

Das Ziel dieser Arbeit ist es die Funktion von Protein 4.1O weiter zu beleuchten. Insbesondere sollen folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie ist Protein 4.1O in Glomeruli verteilt?
2. Welche Rolle spielt Protein 4.1O für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran?
3. Hat der Phosphorylierungszustand von Nephrin einen Einfluss auf die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin?
4. Hat der Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O einen Einfluss auf die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
2-Propanol $\geq 99.7\%$, AnalaR NORMAPUR® ACS, Reag. Ph. Eur. zur Analyse	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
2-Propanol 70% v/v für Zellkultur	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
4% Paraformaldehyd, in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,4 (PFA)	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Agarose medium electroendosmosis (MEE0) Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bromphenol Blau Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Complete Mini	Roche Diagnostics International AG, Rotkreuz, Schweiz
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromidlösung (EtBr) 0,025 % i. d. Tropfflasche	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
GammaBind Plus Sepharose antibody purification resin (Protein G)	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Immersol 518F	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Lysogeny broth (LB) Broth Base	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
LB Broth with agar (Lennox)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Low melting Agarose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Luminol in Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol für Analyse, 100%	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Natriumhydroxid, BAKER ANALYZED®	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Natriumorthovanadat (Lösung 0,1 M)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Octoxinol 9 (Triton® x-100)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
p-Coumarinsäure in DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA), Protease-frei	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tween® 20 (Polysorbat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
10 Molar (M) Natriumhydroxid (NaOH)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Wässrige 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung im Verhältnis 37,5:1 (Rotiphorese)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Pufferlösungen

Bestandteile

1 % Triton Lysispuffer für Co- Immunopräzipitation (Co-IP)	25 Milliliter (ml) 2fach Lysispuffer 5 ml 10 % Triton-x-100 in aqua destillata (a.d.) 1 Complete Mini-Tablette auf 50 ml Puffer 1 mM Natriumorthovanadat auf 50 ml mit a.d. auffüllen 0,044 mM PMSF (Zugabe kurz vor Verwendung)
10fach Laufpuffer für SDS-Page	23,9 Millimolar (mM) Tris Base 574 mM Glycin 3,47 mM SDS
PBS-Puffer	136,89 mM NaCl 2,60 mM KCl 4,28 mM Na ₂ HPO ₄ 1,46 mM KH ₂ PO ₄
10fach Transferpuffer für Tank-Blotting	2,48 mM Tris Base 19,2 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
25fach Proteinwaschpuffer	323 mM Tris pH 7,5 3,23 M NaCl 3,23 % (v/v) Tween 20
2fach Lysispuffer	20 mM Tris HCl pH 7,5 150 mM KCl 1,25 mM EDTA

Lämmli-Puffer	62,5 mM Tris HCl pH 6,8 1 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerin 0,005 % (w/v) Bromphenol Blau 5 % (v/v) beta-Mercaptoethanol 50 mM DTT
---------------	---

Sammelgelpuffer pH 6,9	484 mM Tris HCl 16 mM Tris Base 14 mM SDS
------------------------	---

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer)	40 mM Tris-acetat 1 mM EDTA
--------------------------------------	--------------------------------

Trenngelpuffer pH 8,8	360 mM Tris HCl 1140 mM Tris Base 14 mM SDS
-----------------------	---

Gele

Bestandteile

Agarose-Gel 1% mit EtBr

1 Gramm (g) Agarose
100 ml 1fach TAE-Puffer
4 Tropfen EtBr 0,025 %

Sammelgel für SDS-Page 10 %
(für 2 Sammelgele)

0,535 ml Rotiphorese
1,135 ml a.d.
1,665 ml Sammelgelpuffer pH 6,9
5,19 mM APS
9,88 mM TEMED

Trenngel für SDS-Page 10 %
(für 2 Trenngele)

3 ml Rotiphorese
1,5 ml a.d.
4,5 ml Trenngelpuffer pH 8,8
4.43 mM APS
11mM TEMED

Reagenzien

Bestandteile

10% Triton-x-100

5 ml Triton-x-100
Auf 50 ml mit a.d. auffüllen

ECL, Lösung B

100 mM Tris pH 8,5
7,41 mM H₂O₂

Elektrochemilumineszenz (ECL), Lösung A	2,5 mM Luminol 100 mM Tris pH 8,5 0,396 mM Coumarinsäure
---	--

LB-Medien Bakterienkultur

Bestandteile

LB-Agar	250 ml a.d. 8 g LB-Agar 3 mM NaOH
LB-Medium mit Ampicillin	LB-Medium mit Ampicillin 0,1 Milligramm (mg)/ml
LB-Medium mit Ampicillin/Tetracyclin	LB-Medium mit Ampicillin 0,025 mg/ml und Tetracyclin 0,0075 mg/ml
LB-Medium mit Kanamycin	LB-Medium mit Kanamycin 0,05 mg/ml
LB-Medium für Bakterienkultur	6 g Broth Base auf 300 ml mit a.d. auffüllen und anschließend autoklavieren
Ampicillin-Stammlösung	10 mg/ml Ampicillin, Lösungsmittel: a.d.
Tetracyclin-Stammlösung	1 mg/ml Tetracyclin, Lösungsmittel: 1:1 a.d. und Ethanol
Kanamycin-Stammlösung	0,5 mg/ml Kanamycin, Lösungsmittel: a.d.

2.1.2 Geräte

Geräte

Bezugsquelle

Analysenwaage	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Easypet 3 Pipettierhilfe	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech GmbH, Uppsala, Schweden

Heracell™ 150i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heracell™ 240i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Function Line Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 4KR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HS 260 control Shaker	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Labor pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Labquake™ Rührchenrotator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroskop HBO 50	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
MJ Research PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research, Quebec, Canada
MultiImage Light Cabinet	Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, Deutschland
Multitron Standard Schüttler	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PowerPac Universal für SDS-Page	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage	Bizerba SE & Co. KG, Balingen, Deutschland
RET basic Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Rotixa/RP Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	JP SELECTA S.A., Barcelona, Spanien

Konfokalmikroskop Leica TCS SP2	Leica, Wetzlar, Deutschland
Sterilbank HERA safe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexmischer Reax control	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

2.1.3 Zellkultur

<u>Material</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Dulbecco's MEM 4,5g/l D-Glucose, very low endotoxin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's MEM mit stabilem Glutamin und 1,0g/l D-Glucose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's MEM mit stabilem Glutamin und 4,5g/l D-Glucose, low endotoxin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fötales Bovines Serum (FCS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution (0,05%/0,02%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Corning® 10 Zentimeter (cm) Kulturschalen für Zellkultur	Corning Incorporated, NY, USA
Costar® 12 well Platten	Corning Incorporated, NY, USA
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 Mikrometer (µm)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nunc™ EasYFlask™ Zellkulturflaschen T75	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Runde Deckgläser, 12 Millimeter (mm)	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
UniMark® Objektträger, weiß	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
UVette® Routine Pack 220 nm – 1.600 nm	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Transformation und Mutagenese

Bakterienkultur

Bezugsquelle

Ampicillin Na-Salz	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kanamycin Sulfat aus <i>Streptomyces kanamyceticus</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>OneShot</i> Cells	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
S.O.C. Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tetracyclin Hydrochlorid (>95%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MC 1061 P3 <i>Escherichia coli</i> (E. coli)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MC 1061 E. coli	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Präparationskits

Bezugsquelle

Maxiprep Kit	Qiagen N.V., Hilden
Miniprep Kit	Qiagen N.V., Hilden

Restriktionsenzyme, Puffer und Marker

Bezugsquelle

100 Basenpaar (bp)-Marker	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
---------------------------	--

Aci I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Bgl II	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
BstB I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Bsu 36	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
CIP	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Dpn I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
EcoR I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
EcoR I-Puffer	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Lambda-Marker	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Mlu I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Not I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Primer	Eurofins Scientific SE, Luxemburg
Puffer 3	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Puffer 4	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase Puffer	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
T4 Ligase	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA

Xba I	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
AccuPrime Taq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.6 Transfektion

<u>Materialien für Transfektion</u>	<u>Bestandteile/Bezugsquelle</u>
CaCl ₂ 0,25 M	Nach Sterilfiltration Lagerung bei -20 Grad Celsius (°C)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)-buffered saline (HEBS), pH 7,05-7,12	0,35 M NaCl 0,06 M HEPES 1,48 mM Na ₂ HPO ₄ Nach Sterilfiltration Lagerung bei -20°C
Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

<u>Stimulationsversuche</u>	<u>Bezugsquelle</u>
11e	Tocris Biosciences, Bristol, UK
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PP2	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SB202190	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Immunfluoreszenz/-histochemie

<u>Antikörper und weitere Materialien für Immunfluoreszenz (IF)/-histochemie</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA

Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA
Anti-FRMD3 D16	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Anti-goat IgG	Vector, Burlingame, USA
Anti-Nephrin guinea pig polyclonal, serum	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Anti-rabbit-IgG Texas Red	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fluoresceinisothiocyanat (FITC) AffiniPure Sheep anti-mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA, USA
FRMD3 monoclonal antibody	Abnova, Taipeh City, Taiwan
Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody Alexa Fluor 633 conjugate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ProLong™ Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Texas Red™-X Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
UMOD purified MaxPab mouse polyclonal antibody	Abnova, Taipeh City, Taiwan
V5-Tag antibody	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ziegenerum	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Biotin Block	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

Protein Block	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Rabbit anti-FRMD3 Antibody	Biorbyt Ltd., Cambridge, UK
Biotinylated Anti-Rabbit Antibody	Dianova, Hamburg, Deutschland
Streptavidin-Cy2	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-guinea pig Alexa Fluor 647	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Co-Immunoprecipitation, SDS-Page, Westernblot und ECL

<u>Antikörper und Proteinmarker</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Amersham ECL Human IgG Horseradish peroxidase (HRP)-linked whole Ab (from sheep)	GE Healthcare, Chicago, IL, USA
Anti-FRMD3 A14	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Anti-Nephrin guinea pig polyclonal, serum	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Deutschland
Donkey anti-Guinea Pig IgG Antibody, HRP conjugate, Species Adsorbed	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Monoclonal ANTI-FLAG® (M2) antibody produced in mouse	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Prestained Protein Marker Broad Range	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Purified Mouse Anti-NCK	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
V5 Tag Monoclonal Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.9 Software

<u>Software</u>	<u>Bezugsquelle</u>
AlphaView	Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, Deutschland
FluorChem FC2	Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, Deutschland
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, MD, USA
GraphPad Prism 7.0	Graphpad Software, La Jolla, CA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Restriktionsenzymverdau und DNA-Elektrophorese

2.2.1.1 *Restriktionsenzymverdau*

Um Plasmid-DNA zu schneiden, wurden Restriktionsenzymverdaue durchgeführt. Hierfür wurden 1,5 Mikrogramm (μg) Plasmid-DNA in einem Mikroreaktionsgefäß mit je 1 Mikroliter (μl) der passenden Restriktionsenzyme und 3 μl des passenden Puffers versetzt und gut vermischt. Als nächstes wurde die Mischung auf 30 μl mit HPLC H_2O aufgefüllt. Anschließend inkubierte der Versuchsansatz für eine Stunde bei 37°C .

2.2.1.2 *DNA-Elektrophorese*

Um die durch einen Restriktionsenzymverdau entstandenen DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen, wurde eine DNA-Elektrophorese durchgeführt. Hierfür wurde als erstes ein Elektrophorese-Gel hergestellt: für ein 1%iges Agarose-Gel wurden 100 ml einfacher TAE-Puffer mit 1 g Agarose versetzt und so lange erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war. Zuletzt wurden dem Gel 4 Tropfen 0.025 %iger EtBr-Lösung aus der Tropfflasche hinzugefügt. Anschließend wurde das Gel in eine passende Gelkammer eingefüllt und in eine Elektrophoresekammer gehängt. Die Elektrophoresekammer wurde mit einfachem TAE-Puffer + EtBr gefüllt. Im nächsten Schritt wurden die zu trennenden DNA-Proben auf das Elektrophoresegel geladen und die Elektrophoresekammer wurde geschlossen. Eine Spannung von 90 Volt trennte die DNA-Fragmente ihrer Größe nach auf. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der erwarteten Größe der DNA-

Fragmente. Hierbei gilt: je größer die Fragmente, desto länger die Elektrophoresedauer. Für die folgenden Versuche wurde die DNA-Elektrophorese in der Regel für 30-45 Minuten (min) durchgeführt.

Alle DNA-Plasmide, die vervielfältigt oder neu generiert wurden, sind mittels Restriktionsenzymverdau überprüft worden.

2.2.2 Herstellung rekombinanter DNA

2.2.2.1 Mutagenese Polymerasekettenreaktion

Zur Generation der Punktmutationen von Protein 4.1O wurden Mutagenese PCRs durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer können der Tabelle 1 entnommen werden. Es wurden Versuchsansätze von 50 µl vorbereitet: 100 Nanogramm (ng) der zu verändernden DNA-Probe wurden mit jeweils 0,5 µl des *forward* und des *reverse* Primers und 5 µl des zugehörigen Puffers versetzt. Eine Liste mit passenden Pufferlösungen kann man vom Hersteller der Restriktionsenzyme beziehen. Anschließend wurde die Mischung auf 49 µl mit HPLC H₂O aufgefüllt. Zuletzt wurde 1 µl AccuPrime Taq DNA-Polymerase hinzugegeben.

Anschließend wurden die PCR-Ansätze in einen Thermocycler gegeben und der PCR-Zyklus gestartet. Der PCR-Zyklus beinhaltete ein einminütiges *annealing* bei 50°C und eine 10minütige Extension bei 68°C. Insgesamt liefen 19 Zyklen. Anschließend wurde mit den PCR-Produkten ein DpnI-Restriktionsenzymverdau durchgeführt. Hierzu wurde zu den PCR-Produkten 1 µl DpnI hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurden 4 µl der mit DpnI behandelten PCR-Produkte in kompetente *E. coli OneShot Top 10* transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin (c=100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Primer	Primer-Sequenz
T521A	Forward 5' GAAATCCGCCAGGCACCAGAGTTTGAGCAGTTT 3' Reverse 5' CTCTGGTGCCTGGCGGATTTCGCATAAGAAGGA 3'
T521D	Forward 5' GAAATCCGCCAGGACCCAGAGTTTGAGCAGTTT 3' Reverse 5' CTCTGGGTCCTGGCGGATTTCGCATAAGAAGGA 3'
Y529A	Forward 5' GAGCAGTTTCACGCGGAATACTACTGTCCCCTC 3' Reverse 5' GTATTCCGCGTGAAACTGCTCAAACCTCTGGTGT 3'
Y529F	Forward 5' GAGCAGTTTCACTTCGAATACTACTGTCCCCTC 3'

Tabelle 1: DNA-Sequenz der *forward* und *reverse* Primer: Zu sehen sind die *forward* und *reverse* Primer, die zur Generierung der Punktmutationen T521A, T521D, Y529A und Y529F von Protein 4.1O genutzt wurden.

2.2.2.2 Subklonierung

Um die in den Mutagenese-PCRs generierten Punktmutationen von Protein 4.1O aus ihrem Ursprungsvektor herauszuschneiden, wurde eine Subklonierung durchgeführt.

Für die Subklonierung wurde ein DNA-Verdau angesetzt: es wurden jeweils 1,5 µg der punktmultierten Plasmide und des WT-Plasmids von Protein 4.1O in verschiedene Mikroreaktionsgefäße vorgelegt. Die DNA des Protein 4.1O WT stellte den Vektor zur Verfügung. Anschließend wurden jeweils 1 µl der Restriktionsenzyme NotI und Bsu36 zu der DNA hinzugefügt. Nun erfolgte die Zugabe von jeweils 3 µl Puffer 3. Die DNA-Enzym-Puffer-Mischungen wurden auf 30 µl mit H₂O aufgefüllt und daraufhin für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zum Protein 4.1O WT-Verdau wurde im Anschluss 1 µl CIP hinzugegeben und die Mischung anschließend für eine weitere halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Als nächstes folgte die Ligation.

2.2.2.3 Ligation

Um die in der Subklonierung gewonnenen DNA-Fragmente mit den Protein 4.1O-Punktmutationen in den Protein 4.1O WT-Vektor (pCDNA3) zu integrieren, wurde eine Ligation durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst ein 1,5 %iges *low melting*-Agarose Gel hergestellt: 100 ml einfacher TAE-Puffer wurde mit 1,5 g *low melting*-Agarose vermischt und so lange erhitzt, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Das entstandene Gel wurde mit 4 Tropfen 0,025 %igem EtBr aus der Tropfflasche versetzt. Anschließend wurde das Gel in eine dünne Gelkammer gefüllt. Diese Gelkammer wurde in eine Elektrophoresekammer gehängt. Diese Elektrophoresekammer war mit einfachem TAE-Puffer mit EtBr gefüllt.

Als nächstes wurden die subklonierten Proben auf das Gel geladen. Zuletzt wurde die Elektrophoresekammer verschlossen und die DNA-Elektrophorese für eine halbe Stunde bei einer Spannung von 90 V durchgeführt.

Nach Abschluss der DNA-Elektrophorese waren 2 Banden pro geladener Probe sichtbar, eine Vektor- und eine *Insert*-Bande. Es wurden folgende DNA-Banden aus dem

Agarose-Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten: aus der Probe mit dem WT-Verdau die Vektorbande und aus der Probe mit den Protein 4.1O-Punktmutationen die *Insert*-Banden. Diese Banden wurden jeweils in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die ausgeschnittenen Gel-Stücke mit den *Insert*- und Vektorbanden bei 70°C geschmolzen.

Parallel dazu wurde folgende Mischung hergestellt: 87,5 µl HPLC H₂O, 1 µl T4-Ligase und 12,5 µl T4 DNA-Ligase Puffer. Die hier angegebenen Mengen reichen für 4 Insert-Banden. Anschließend wurden zu dieser Mischung 5 µl der geschmolzenen Vektorbande hinzupipettiert und vermischt.

Jeweils 21 µl dieser Mischung wurden auf vier Mikroreaktionsgefäße verteilt. Als nächstes wurden zu diesen 21 µl jeweils 4 µl der geschmolzenen Insert-Banden gegeben und vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur.

Als letztes wurden die subklonierten und ligierten Plasmide in kompetente *E. coli OneShot Top 10* transformiert.

2.2.3 Transformation und Präparation Plasmid-DNA

2.2.3.1 Transformation

Um ligierte Plasmid-DNA zu vervielfältigen und im Anschluss den Erfolg der Mutagenese mittels Sequenzierung zu überprüfen, wurden die Ligations-Reaktionsansätze in kompetente *E. coli OneShot Top 10* transformiert. Hierfür wurde das beiliegende Protokoll des Herstellers unter dem Punkt „*Chemical transformation procedure*“ befolgt. Laut Protokoll wurden demnach die Mikroreaktionsgefäße, die die Ligation enthielten, kurz zentrifugiert. Pro Ligationsansatz wurde jeweils ein Gefäß mit 50 µl *E. coli OneShot Top 10* auf Eis aufgetaut. Danach wurden jeweils 5 µl der Ligation zu den *E. coli OneShot Top 10* gegeben. Die Mischung wurde durch vorsichtiges Beklopfen vermischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die so transformierten Bakterien auf LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die hier durchgeführten Ligationen wurden LB-Agarplatten mit Ampicillin verwendet. Am nächsten Tag konnten Kolonien gepickt werden und anschließend in Minikulturen vermehrt werden (siehe Punkt 2.2.3.2 „Anlage Minikultur“).

Um Plasmid-DNA zu vervielfältigen, wurden die kompetenten Bakterienstämme MC 1061 *E. coli* für die Vektoren pcDNA3 und plegfp und MC 1061 P3 *E. coli* für den Vektor

CDM transformiert. MC 1061 E. coli wird nach der Transformation resistent gegen Ampicillin und MC 1061 P3 E. coli gegen Ampicillin und Tetracyclin.

Jeweils 1 µg der zu transformierenden Plasmide wurde in Mikroreaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurden zu diesen Ansätzen jeweils 50 µl der passenden Bakterien gegeben. Der Plasmid-Bakterien-Ansatz wurde vorsichtig durch leichtes Beklopfen der Mikroreaktionsgefäße vermischt. Die Plasmid-Bakterien-Mischung wurde für 15 min auf Eis inkubiert, damit sich die Plasmid-DNA an die Zellmembran der Bakterien anlagern kann. Nach der Inkubation auf Eis folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C im Thermomixer, damit die Bakterienmembran durchlässig wird und die Plasmid-DNA aufnehmen kann. Zuletzt wurden die Mikroreaktionsgefäße erneut auf Eis gelagert, damit sich die Bakterienzellmembran wieder schließen kann.

Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten ausgestrichen: transformierte MC 1061 P3 E. coli wurden auf LB-Agarplatten mit Ampicillin und Tetracyclin, und transformierte MC 1061 E. coli auf Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Wenn am Folgetag die LB-Agarplatten gleichmäßig mit einzelnen Bakterienkolonien bewachsen waren, so konnten diese gepickt und in Minikulturen vervielfältigt werden.

2.2.3.2 Anlage Minikultur

Um transformierte Bakterien zu vervielfältigen, wurden Minikulturen angelegt. Für die Minikulturen wurden jeweils 3 ml LB-Medium in 15 ml-Falcons gefüllt. Anschließend wurde das LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum der LB-Agarplatten versetzt. Pro Falcon wurde jeweils eine Kolonie von den mit den transformierten Bakterien bewachsenen LB-Agarplatten gepickt und in das vorgelegte LB-Medium überführt. Die Bakterien in den Falcons wurden für mindestens acht Stunden bei 225 Umdrehungen pro Minute (U/min) und 37°C geschüttelt. Wenn der Minikulturansatz nach Ablauf dieser acht Stunden gleichmäßig getrübt war, dann konnte er in eine Maxikultur überführt werden.

2.2.3.3 Anlage Maxikultur

Um transformierte Bakterien aus Minikulturen zu vervielfältigen und im Anschluss Plasmid-DNA präparieren zu können, wurden Maxikulturen angelegt. 200 ml autoklaviertes LB-Medium wurde in sterilisierte Erlenmeyerkolben vorgelegt und mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Das zugesetzte Antibiotikum musste

dasselbe sein wie das, welches für die Transformation und die Anlage der Minikulturen verwendet wurde.

Anschließend wurden 200 µl Bakteriensuspension aus den Minikulturen in die Erlenmeyerkolben überführt und die Kolben verschlossen. Die Mischung wurde über Nacht bei 37°C und 225 U/min geschüttelt. Am Folgetag konnte dann schließlich die Präparation der Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien erfolgen.

2.2.3.4 DNA-Isolierung aus Bakterien

Um die vervielfältigte Plasmid-DNA aus den in den Maxikulturen gezüchteten Bakterien zu isolieren, wurde das Maxiprep-Kit von Qiagen angewandt. Hierfür wurde das beiliegende Protokoll des Herstellers befolgt. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei 4°C statt. Hierfür wurde zunächst die Bakteriensuspension aus den Maxikulturen bei 2971 x Erdbeschleunigung (g) für 15 min zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde in 10 ml gekühltem P1-Puffer resuspendiert und in einen 50 ml-Falcon überführt. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 10 ml P2-Puffer, ein vorsichtiges Vermischen und zuletzt eine Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur. Die Suspension sollte sich nun blau eingefärbt haben. Als nächstes erfolgte die Zugabe von 10 ml P3-Puffer. Danach wurde so lange gemischt, bis sich die Suspension wieder entfärbt hatte. Es folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis. Danach wurde die Suspension bei 2971 x g für 1 Stunde zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde in einen neuen 50 ml-Falcon überführt und erneut bei 2971 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde über eine Säule mit Puffern gewaschen und zuletzt eluiert. Das Eluat wurde mit 10,5 ml 100 %igem Isopropanol gefällt und anschließend bei 2971 x g für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 5 ml 70 %igem Ethanol gereinigt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 2971 x g für 15 min. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde über Nacht getrocknet. Das Pellet wurde in 200 µl HPLC H₂O aufgelöst.

Um die vervielfältigte Plasmid-DNA aus den in den Minikulturen gezüchteten Bakterien zu isolieren und anschließend sequenzieren zu lassen, wurde das Miniprep-Kit von Qiagen angewandt. Hierfür wurde ebenfalls das beiliegende Protokoll des Herstellers befolgt. Hierfür wurde 1 ml aus einer Minikultur in 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde anschließend bei 5949 x g für 3 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 250 µl P2-Puffer und ein vorsichtiges Mischen,

woraufhin sich die Suspension blau färbte. Im nächsten Schritt wurden 350 µl N3-Puffer zugegeben und die Suspension so lange geschwenkt bis sie sich entfärbte. Es folgte eine Zentrifugation bei 15710 x g für 10 min. Der Überstand wurde über eine Säule aufgereinigt und eluiert.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Auftauen Zellen

Die Stocklösungen der Zellen wurden im Stickstofftank gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden diese langsam bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Die folgenden Schritte fanden alle unter sterilen Bedingungen statt. Es wurden ca. 6 ml auf 37°C erwärmtes Zellkulturmedium in 15 ml Falcons vorgelegt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie vollständig und vorsichtig in die 15 ml-Falcons überführt. Anschließend wurden die Zellen für 4 min bei 131 x g zentrifugiert. Nach diesen 4 min konnten die Zellen deutlich als Pellet am Boden des Falcons erkannt werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 10 ml frischem Zellkulturmedium versetzt. Für die *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T-Zellen wurde als Zellkulturmedium DMEM mit 4,5 g/l Glucose mit 10 % FCS verwendet. *CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material* (COS)-7-Zellen wurden ebenfalls in einem Medium mit 4,5 g/l Glucose mit 10% FCS kultiviert. Die im Medium gelösten Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen überführt und gleichmäßig verteilt. Sowohl die COS-7- als auch die HEK 293T-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet.

2.2.4.2 Splitten der Zellen

HEK 293T-Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose sowie 10% FCS kultiviert. Das Zellkulturmedium und das Trypsin wurden vor dem Splitten der Zellen im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Zunächst wurden die Zellen per Auflichtmikroskopie beurteilt und das Split-Verhältnis festgelegt. Dieses betrug in der Regel 1:6 oder 1:7. Im Folgenden wird von einem 1:7 Verhältnis ausgegangen.

Die folgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und vorsichtig ca. 5-10 ml Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) entlang des Randes der Kulturschale auf die Zellen gegeben. Das PBS wurde abgesaugt und anschließend 1 ml Trypsin gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Die mit dem Trypsin bedeckten Zellen wurden für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 6 ml

Zellkulturmedium in die Schale gegeben und die Zellen vollständig in ein 25 ml-Falcon überführt. Es wurde in 10 cm-Schalen jeweils 9 ml Zellkulturmedium vorgelegt. Die so vorbereiteten Schalen wurden mit jeweils 1 ml der Zellsuspension versetzt. Anschließend wurden die Zellen gleichmäßig verteilt. HEK 293T-Zellen wurden in der Regel alle zwei Tage gesplittet.

Das Splitten der COS-7-Zellen gestaltete sich analog zu dem oben beschriebenen Verfahren, allerdings wurde in der Regel ein Split-Verhältnis von 1:5 gewählt.

2.2.4.3 Aussäen HEK 293T-Zellen

Um HEK 293T-Zellen zu transfizieren, wurden die Zellen am Abend zuvor ausgesät. Das Aussäen erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie das Splitten der Zellen, allerdings mit folgenden Abweichungen: die Zellen wurden in einem 1,0 g/l Glucose-haltigem Zellkulturmedium mit 10 % FCS ausgesät. Außerdem wurde das Split-Verhältnis höher gewählt, sodass die Zellen einzeln lagen und sich keine Zelltrauben bilden konnten.

2.2.4.4 Aussäen COS-7-Zellen

Um COS-7-Zellen transfizieren zu können, wurden die Zellen am Abend zuvor ausgesät. Für die folgenden Versuche sollten die transfizierten COS-7-Zellen mittels IF ausgewertet werden. Um diese durchführen zu können, wurde zunächst in jedes Well einer 12 Well-Platte jeweils ein steriles rundes Deckgläschen eingesetzt. Das Aussäen erfolgte schließlich nach dem gleichen Verfahren wie das Splitten der Zellen. Hier wurde ebenfalls ein höheres Split-Verhältnis gewählt, damit die Zellen einzeln lagen. Pro Well wurde 1 ml der Zellsuspension gegeben.

2.2.5 Transfektion

2.2.5.1 HEK 293T

Um in HEK 293T-Zellen Proteine zu überexprimieren, wurden diese mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden die Zellen am Abend zuvor wie oben beschrieben ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen per Auflichtmikroskopie beurteilt: die Zellen sollten einzeln liegen, ungefähr einen Zellendurchmesser Abstand voneinander haben und keine abgerundete Form angenommen haben.

Als nächstes wurde Plasmid-DNA in Mikroreaktionsgefäße vorgelegt: pro zu transfizierender Schale mit Zellen wurden jeweils 10 µg Plasmid-DNA in ein

Mikroreaktionsgefäß gegeben. Die nachfolgenden Schritte fanden alle unter sterilen Bedingungen statt.

Zunächst wurden zu der DNA jeweils 500 µl CaCl_2 gegeben. Anschließend wurden unter Vortexen tröpfchenweise 500 µl 2fach HEBS hinzugegeben. Durch die vorsichtige Zugabe des 2fach HEBS zu der DNA- CaCl_2 -Mischung bilden sich kleine Kristalle. Anschließend wurde die Mischung gleichmäßig auf den HEK 293T-Zellen verteilt. Mit dem Mikroskop ließen sich nun die oben beschriebenen feine Kristalle im Zellkulturmedium erkennen. Diese Kristalle können von den HEK 293T-Zellen aufgenommen werden.

Nach sechs bis acht Stunden erfolgte ein Medienwechsel: das vorhandene Medium wurde abgesaugt und durch frisches 1,0 g/l D-Glucose-MEM mit 10% FCS ersetzt. Am nächsten Tag konnten die Zellen geerntet werden.

2.2.5.2 COS-7

Um in COS-7-Zellen Proteine zu überexprimieren, wurden diese mit der Lipofectamine-Methode transfiziert. Hierfür wurden die Zellen am Abend zuvor wie oben beschrieben ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen per Auflichtmikroskopie beurteilt: die Zellen sollten einzeln liegen und keine abgerundete Form angenommen haben.

Als nächstes wurde DNA in Mikroreaktionsgefäße vorgelegt: pro zu transfizierendem Well wurde je ein Gefäß mit DNA vorbereitet. Es wurden für die hier beschriebenen Versuche in der Regel 0,5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die nachfolgenden Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Pro zu transfizierendem Well wurden jeweils 25 µl Optimem-Medium zu der DNA hinzugegeben und vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur.

Währenddessen wurde ein Mastermix mit Lipofectamine und Optimem-Medium angesetzt: pro zu transfizierendem Well wurde doppelt so viel Lipofectamine wie DNA vorgelegt und mit 25 µl x Anzahl der zu transfizierenden Wells Optimem-Medium vermischt. Diese Mischung inkubierte ebenfalls für 5 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden jeweils 25 µl der Optimem-Lipofectamine-Mischung zu der DNA-Optimem-Mischung gegeben und gut vermischt. Diese Mischung inkubierte für 20 min bei Raumtemperatur. Zuletzt wurden die DNA-Optimem-Lipofectamine-Ansätze restlos auf die Zellen gegeben. Nach zwei Tagen konnten die COS-7-Zellen geerntet oder gefärbt werden.

2.2.6 Stimulation Zellen

2.2.6.1 Stimulation Zellen mit PP2

Um herauszufinden, ob die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O abhängig von dem Phosphorylierungszustand von Nephrin ist, wurden Stimulationsversuche mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 durchgeführt. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit pcDNA3.sIg.Nephrin.cyt und pcDNA3.V5.4.1O transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit der Kalziumphosphatmethode, allerdings wurde nach sechs Stunden das vorhandene Zellkulturmedium durch 10 ml frisches Zellkulturmedium mit 1,0 g/l D-Glucose ohne FCS ersetzt.

Am darauffolgenden Morgen wurden die Zellen eine Stunde vor der Ernte mit 10 μ M PP2 in DMSO stimuliert. Hierzu wurden 5 ml der bestehenden 10 ml Zellkulturmedium verworfen. Anschließend wurde eine Hälfte der Schalen mit jeweils 10 Mikromolar (μ M) PP2 in DMSO stimuliert und die andere Hälfte der Schalen wurde lediglich mit der gleichen Menge an DMSO als Kontrolle versetzt. Die Zellen wurden daraufhin bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde eine Co-IP durchgeführt.

2.2.6.2 Stimulation Zellen mit SB202190

Um zu untersuchen, ob die MAPK p38 die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O beeinflusst, wurden Stimulationsversuche mit dem p38-Inhibitor SB202190 durchgeführt.

Der Versuchsaufbau gleicht dem unter 2.2.6.1 beschriebenem Aufbau, allerdings wurden folgende Änderungen vorgenommen: die Stimulation erfolgte nicht mit 10 μ M PP2, sondern mit 50 μ M SB202190. Anschließend wurden ebenfalls Co-IPs durchgeführt.

2.2.6.3 Stimulation Zellen mit 11e

Um zu untersuchen, ob die MAPK ERK2 die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O beeinflusst, wurden Stimulationsversuche mit dem ERK2-Inhibitor 11e durchgeführt.

Der Versuchsaufbau gleicht dem unter 2.2.6.1 beschriebenem Aufbau, allerdings wurden folgende Änderungen vorgenommen: die Stimulation erfolgte nicht mit 10 μ M PP2, sondern mit 50 Nanomolar (nM) 11e. Anschließend wurden ebenfalls Co-IPs durchgeführt.

2.2.7 Zellernte

2.2.7.1 Ganzzelllyse

Um herauszufinden, ob eine bestimmte Plasmid-DNA in HEK 293T-Zellen abgelesen wird und Proteine exprimiert werden, wurden Ganzzelllysen durchgeführt. Hierfür wurden am Tag zuvor HEK 293T-Zellen mit der zu untersuchenden Plasmid-DNA mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert.

Am Folgetag wurde die Ganzzelllyse durchgeführt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen wurden einmalig mit jeweils 5 ml PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde das PBS vollständig abgesaugt. Als nächstes wurden 400 µl auf 95°C erhitztes 2fach Lämmli mit 1,4-Dithiothreitol (DTT) auf die Mitte der Kulturschale gegeben und mit einem Zellschaber auf der gesamten Oberfläche verteilt und abgeschabt. Die so entstandenen Zelllysate wurden in Mikroreaktionsgefäße umgefüllt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend können die so entstandenen Proben nach Zentrifugation auf ein SDS-Gel geladen und untersucht werden.

2.2.7.2 Co-Immunopräzipitation

Um zu untersuchen, ob Proteine miteinander interagieren, wurden Co-IPs durchgeführt. Hierfür wurden am Tag zuvor HEK 293T-Zellen mit der Plasmid-DNA der zu untersuchenden Proteine nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Pro Datenpunkt wurden jeweils zwei 10 cm-Schalen mit HEK 293T-Zellen transfiziert.

Am darauffolgenden Morgen konnte die Co-IP durchgeführt werden. Alle Arbeitsschritte der Co-IP fanden auf Eis statt, die Zentrifugen wurden auf 4°C heruntergekühlt.

Das Medium der Zellen wurde abgesaugt und anschließend wurden die Schalen so lange mit jeweils 5 ml PBS gespült, bis sich die Zellen von der Zellkulturschale gelöst hatten; es lag eine PBS-Zellsuspension vor. Die beiden jeweils einem Datenpunkt zugehörigen Schalen wurden gepoolt und in einen gemeinsamen 15 ml-Falcon überführt. Diese Falcons wurden anschließend für 5 min bei 345 x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnten ein Zellpellet am Boden des Falcons und ein Überstand bestehend aus PBS erkannt werden. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde je nach Größe mit 200-450 µl 1 % Triton-Lysispuffer (s.o.) versetzt, vorsichtig gelöst und in Mikroreaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Inkubation von 15 min auf Eis.

Anschließend wurden die Gefäße für 15 min bei 18220 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß umgefüllt und das Pellet verworfen. 10 % des Überstandes wurden in ein separates Röhrchen umgefüllt, um Lysat-Proben herzustellen. Mit dem restlichen Überstand wurde die Co-IP durchgeführt.

Die Lysat-Röhrchen wurden mit der gleichen Menge 2fach Lämmli+DTT versetzt und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt.

Zur Durchführung der Co-IP wurde zu dem Überstand 30 µl Protein G gegeben und für 1 Stunde auf einem IP-Shaker bei 4°C inkubiert. Je nach Versuchsansatz konnte vor der Inkubation mit Protein G ein anderer Antikörper für eine Stunde auf dem IP-Shaker bei 4°C inkubiert werden. Nach Beendigung der Antikörper-Inkubation erfolgte das Waschen der Proben. Zunächst wurden die IP-Röhrchen für 3 min bei 837 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 800 µl 1% Triton-Lysispuffer versetzt. Die Proben wurden daraufhin erneut für 3 min bei 837 x g zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Der letzte Zentrifugationsdurchgang wurde eine Minute lang bei 15710 x g durchgeführt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 30 µl 2fach Lämmli+DTT versetzt und anschließend für fünf Minuten auf 95°C erhitzt.

Anschließend konnten die so entstandenen Lysat- und Co-IP-Proben auf ein SDS-Gel geladen und ausgewertet werden.

2.2.7.3 Immunfluoreszenz

Um die Verteilungsmuster und Co-Lokalisationen von Proteinen zu beurteilen, wurden IF durchgeführt. Hierfür wurden zwei Tage vor Durchführung der IF COS-7-Zellen wie oben beschrieben mit der Lipofectamine-Methode transfiziert.

Am Tag der Zellernte wurden die Zellen zunächst per Auflichtmikroskopie beurteilt: es sollten weder zu viele Zellen abgestorben sein, noch sollten zu viele Zellteilungen stattgefunden haben. Falls ein Plasmid mit einem grün fluoreszierendem Protein (gfp)-Tag transfiziert wurde, konnte per Fluoreszenzmikroskopie die Transfektionseffizienz beurteilt werden. Je mehr Zellen grün fluoreszierten, desto höher war die Transfektionseffizienz.

Anschließend konnte die IF durchgeführt werden. Zunächst wurde das Zellkulturmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen wurden mit 1 ml/Well einfachem PBS-Puffer gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 10 Minuten fixiert. Nach 10 Minuten wurde das

Fixans abpipettiert. Nun wurde mit 500 µl/Well 4 % BSA + 0,5 % Triton in PBS für 5 Minuten geblockt und permeabilisiert.

Als nächstes folgten die Färbungen der Zellen: es wurde mit jeweils 250 µl in 4 % BSA in PBS gelöstem Antikörper für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss gefärbt. Anschließend wurde der Antikörper entfernt und die Zellen dreimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Wenn mehrere Antikörper benutzt wurden, so wurde dieses Vorgehen mehrfach wiederholt. Die Konzentrationsverhältnisse der verwendeten Antikörper können der Tabelle 2 entnommen werden.

Nach den erfolgten Färbungen konnten die in den Wells einliegenden Deckgläschen entnommen und vorsichtig auf einem Objektträger mit einem DAPI-haltigen Eindeckmedium eingedeckelt werden.

Die Zellen wurden mittels Konfokalmikroskopie mit einem 63x HCX PL Apo Wasser-Immersion-Objektiv untersucht. Anschließend wurden Bilder aufgenommen, die mit dem Programm ImageJ eingefärbt und ausgewertet wurden.

Antikörper	Konzentrationsverhältnis
Texas Red™-X Phalloidin	1:50
V5-Tag antibody	1:50
UMOD purified MaxPab mouse polyclonal antibody	1:50
FRMD3 monoclonal antibody	1:100
Anti-Nephrin guinea pig polyclonal, serum	1:100
Anti-FRMD3 D16	1:100
Goat anti-mouse IgG (H+L) Secondary Antibody Alexa Fluor 633 conjugate	1:500
Fluorescein (FITC) AffiniPure Sheep anti-mouse IgG (H+L)	1:500
Anti-rabbit-IgG Texas Red	1:500
Alexa Fluor® 647 AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	1:1000
Alexa Fluor® 488 AffiniPure F(ab') ₂ Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:1000
Goat anti-Guinea Pig IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:1000
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	1:2000

Tabelle 2: Antikörper für Immunfluoreszenz: Der Tabelle können die für die Immunfluoreszenz verwendeten Primär- und Sekundärantikörper einschließlich der Konzentrationsverhältnisse entnommen werden.

2.2.8 SDS-Page und Western Blot

2.2.8.1 SDS-Page

Die SDS-Page bzw. Proteinelektrophorese wurde durchgeführt, um Proteine und Proteininteraktionen ihrer Größe nach aufzutrennen. Dadurch wurden die nachfolgenden Schritte des Western Blots und der spezifischen Antikörperreaktion ermöglicht. Für die SDS-Page wurden SDS-Gele nach der obigen Anleitung hergestellt. Das SDS-Gel besteht aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Gele wurden anschließend in Elektrophoreseschlitten gespannt und in eine Elektrophoresekammer gehängt. Anschließend wurden die Proteinproben geladen. Die Elektrophoresekammer wurde bis zur entsprechenden Markierung mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurde das Elektrophoreseprogramm mit 70 Volt in der ersten halben Stunde für die Sammelgelphase gestartet. Danach folgte die Trenngelphase bei 20 Milliampere (mA) pro Gel, deren Dauer sich nach der erwarteten Proteingröße richtete. In der Regel wurde die Trenngelphase für eine bis zu anderthalb Stunden durchgeführt.

2.2.8.2 Western Blot

Um die in der SDS-Page der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen und die Proteine somit einer spezifischen Antikörperreaktion zugänglich zu machen, wurde der Western Blot durchgeführt. Für die hier dargestellten Versuche wurde das Verfahren des Tank Blottings angewandt.

Als Vorbereitung wurde 1fach Transferpuffer aus der oben beschriebenen Stocklösung hergestellt und kaltgestellt.

Von dem SDS-Gel aus der Proteinelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde in Transferpuffer überführt, genauso wie Blottingschwämme und eine Nitrocellulosemembran. Nun wurden die Schlitten zum Einhängen in die Blottingkammer vorbereitet: zunächst ein Blottingschwamm, dann Blottingpapier, das SDS-Gel, die Nitrocellulosemembran, Blottingpapier und zuletzt wieder ein Blottingschwamm. Der Schlitten wurde in die Blottingkammer eingehängt. Die Blottingkammer wurde mit einem Eisblock und Transferpuffer gefüllt. Anschließend wurde die Blottingkammer verschlossen und mit einer Stromquelle verbunden. Der

Western Blot lief in Abhängigkeit der erwarteten Proteingröße bis zu 1,5 Stunden bei 200 mA.

2.2.8.3 Spezifische Antikörperreaktionen

Um die durch den Western Blot auf eine Membran geblotteten Proteine zu detektieren, wurden spezifische Antikörperreaktionen durchgeführt. Hierfür wurden die Membranen aus dem Western Blot zunächst mit 5% BSA in Proteinwaschpuffer geblockt. Dies konnte entweder über Nacht für acht Stunden bei 4°C oder für eine Stunde bei 37°C geschehen. Anschließend wurden die Membranen in einfachen Proteinwaschpuffer überführt.

Für die Antikörperreaktionen wurden die Membranen in 15 ml verdünntem Antikörper inkubiert. Die hierfür gewählten Konzentrationsverhältnisse können der Tabelle 3 entnommen werden. Der Primärantikörper wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 5 min mit einfachem Proteinwaschpuffer gewaschen. Nun folgte der Sekundärantikörper, der ebenfalls für eine Stunde auf einem Shaker inkubiert wurde. Die Membran wurde erneut dreimal für jeweils 5 min mit einfachem Proteinwaschpuffer gewaschen. Nun konnte die ECL durchgeführt werden.

Antikörper	Konzentrationsverhältnis
Anti-Nephrin guinea pig polyclonal, serum	1:250
Monoclonal ANTI-FLAG® M2 antibody produced in mouse	1:400
ECL human IgG HRP linked	1:500
Anti-FRMD3 A14	1:500
Purified Mouse Anti-NCK	1:1000
V5 Tag Monoclonal Antibody	1:5000
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	1:10000
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	1:10000
Donkey anti-Guinea Pig IgG Antibody, HRP conjugate, Species Adsorbed	1:20000

Tabelle 3: Antikörper spezifische Antikörperreaktion: Der Tabelle können die für die spezifische Antikörperreaktion nach Western Blot verwendeten Primär- und Sekundärantikörper einschließlich der Konzentrationsverhältnisse entnommen werden.

2.2.8.4 Elektrochemilumineszenz

Um die durch die spezifische Antikörperreaktion detektierten Proteine sichtbar zu machen, wurde die Elektrochemilumineszenz (ECL) durchgeführt. Hierfür wurden nach der obigen Anleitung ECL Lösung A und ECL Lösung B hergestellt und im Kühlschrank gelagert. Es wurden jeweils 1 ml der beiden Lösungen miteinander vermischt und gleichmäßig auf der Membran nach abgeschlossener Antikörperreaktion gegeben. Nun konnten im Imager die Proteinbanden detektiert werden.

2.2.9 Immunhistochemische Färbung Maus

Es wurden die Nieren von WT FVB-Mäusen verwendet. Die Organentnahme wurde von Frau Dr. Eva Königshausen im Rahmen des Organentnahmeprojektes O 68/08 durchgeführt. Die Nieren wurden in PFA fixiert. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert und mit Citratpuffer pH 6,1 für 15 min bei 98°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Biotin Block und Protein Block behandelt. Danach folgte eine Färbung mit Anti-FRMD3-Antikörpern und Anti-Nephrin Antikörpern. Die Konzentrationen, die für die Färbungen verwendet wurden, lassen sich der Tabelle 4 entnehmen. Die Antikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

Um die Färbung mit Anti-FRMD3-Antikörpern zu verstärken, erfolgte eine Behandlung mit biotinyliertem Anti-*rabbit* Antikörper und anschließend eine Behandlung mit Streptavidin-Cy2. Der Sekundär-Antikörper zu Nephrin war Anti-*guinea pig* Alexa Fluor 647.

Die so entstandenen Proben wurden in einem Eindeckmedium mit Dapi eingebettet. Die Schnitte wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop mit einem 63x Plan-Neofluar oil M27 Objektiv untersucht. Die so entstandenen Bilder wurden analog zur IF mit ImageJ gefärbt und ausgewertet.

Antikörper	Konzentrationsverhältnis
Anti-Nephrin guinea pig polyclonal, serum	1:100
Rabbit Anti-FRMD3 (von Biorbyt)	1:100
Biotinylated Anti-Rabbit Antibody	1:1000
Streptavidin-Cy2	1:500
Anti-Guinea pig Alexa Fluor 647	1:1000

Tabelle 4: Antikörper Immunhistochemie: Der Tabelle können die für die immunhistochemische Färbung von Mausglomeruli verwendeten Primär- und Sekundärantikörper einschließlich der Konzentrationsverhältnisse entnommen werden.

2.2.10 Auswertung

2.2.10.1 Detektion und Densitometrie Western Blot

Um die Western Blots auszuwerten, wurde wie oben beschrieben eine ECL durchgeführt. Durch die dort ablaufende chemische Reaktion wird Licht emittiert. Diese Lichtsignale werden über das Programm FluorChem FC2 digitalisiert. Anschließend erfolgte eine Densitometrie der detektierten Bande mittels des Programms AlphaView. Für die statistische Auswertung wurde der Mann-Whitney-U-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test mittels des Programms GraphPad Prism 7.0 angewandt.

2.2.10.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 7.0.

Der Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, wenn zwei Gruppen verglichen wurden. Bei dem Mann-Whitney-U-Test handelt es sich um ein nicht-parametrisches Testverfahren, das dazu dient Werte zweier ungepaarter Gruppen miteinander zu vergleichen. Die zu vergleichenden Werte sollten mindestens einem Ordinalskalenniveau entsprechen.

Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Auch hier handelt es sich um einen nicht-parametrischen Test. Mit diesem Test können allerdings die Werte von mehr als zwei ungepaarten Gruppen miteinander verglichen werden.

2.2.10.3 Auswertung Image J

Die Auswertung der mikroskopischen Bilder erfolgte mittels ImageJ. Es wurden Bilder der mittels Immunfluoreszenz eingefärbten mikroskopischen Präparate angefertigt. Anschließend wurden die so entstandenen Bilder mittels ImageJ in der ihrem Sekundärantikörper entsprechenden Farbe eingefärbt. Die verschiedenen Farbkanäle desselben Bildes wurden im Anschluss übereinander gelegt und im Hinblick auf eine Co-Lokalisation untersucht. Eine Co-Lokalisation war nachgewiesen, wenn sich die beiden Farbkanäle genau übereinander legten und sich somit die Farben addierten. Überlagerten sich beispielsweise die Lichtfarben Rot und Grün, so entstand die Farbe Gelb.

3. Ergebnisse

3.1 Protein 4.1O wird in Glomeruli exprimiert und co-lokalisiert mit Nephrin

Um zu untersuchen, ob Protein 4.1O in Podozyten exprimiert wird und mit Nephrin *in vivo* co-lokalisiert, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von Mausglomeruli durchgeführt. Hierfür wurden Mausglomeruli fixiert und gegen Protein 4.1O und Nephrin gefärbt. Die Gewebeschnitte wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet.

Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, zeigt sich eine Färbung von Nephrin (grün) und Protein 4.1O (rot) in den Mausglomeruli. Wenn die separaten Aufnahmen von Nephrin und Protein 4.1O übereinandergelegt wurden, so ist eine deutliche Co-Lokalisation (gelb) von Nephrin und Protein 4.1O in den Mausglomeruli zu erkennen. In den Negativkontrollen färbte der Sekundärantikörper keine Glomerulusstrukturen an, was eine unspezifische Färbung ausschließt.

Die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenz-Färbung konnten zwei Dinge zeigen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Nephrin und Protein 4.1O in Mausglomeruli exprimiert werden. Zum anderen ist es gelungen, eine Co-Lokalisation von Nephrin und Protein 4.1O in glomerulären Strukturen *in vivo* zu beweisen.

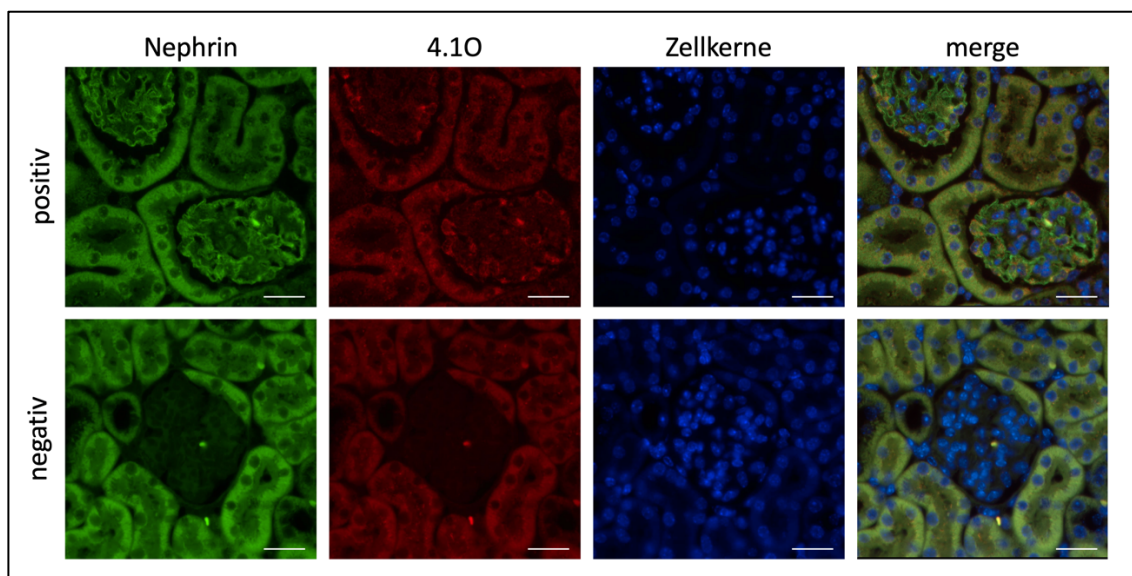


Abb. 1: Protein 4.1O interagiert mit Nephrin in Mausglomeruli: zu sehen ist eine Immunfluoreszenz-Färbung gegen Protein 4.1O (rot) und Nephrin (grün) in Mausglomeruli. In der oberen Reihe kann man eine Co-Lokalisation von Nephrin und Protein 4.1O erkennen (gelb). In der unteren Reihe ist die Negativkontrolle ohne Färbung mit Primärantikörpern dargestellt. Zellkerne sind blau gefärbt. Die Maßstabsleiste entspricht 20 Mikrometer. 63-fache Vergrößerung.

3.2 Protein 4.1O co-lokalisiert mit F-Aktin

Um zu untersuchen, ob Protein 4.1O mit F-Aktin co-lokalisiert, wurden IF von Protein 4.1O überexprimierenden COS-7-Zellen angefertigt. Hierfür wurden COS-7-Zellen mittels der Lipofectamine-Methode transfiziert. Die transfizierten COS-7-Zellen wurden fixiert und mit einem gegen Protein 4.1O gerichteten Antikörper angefärbt. Das Aktinzytoskelett wurde durch eine Färbung mit Phalloidin dargestellt. Die so angefertigten Präparate wurden mittels konfokaler Mikroskopie beurteilt und anschließend ausgewertet.

In der Abbildung 2 stellt sich das Aktinzytoskelett rot dar und spannt sich wie ein fein vernetztes Gerüst durch die gesamte Zelle. Protein 4.1O ist in grün dargestellt. Das Verteilungsmuster von Protein 4.1O ist im Zellkörper eher wabenartig, während es in der Zellperipherie ein punktuelles Verteilungsmuster entlang der Zellmembran und der Lamellipodien aufweist. Werden die beiden Färbungen von Protein 4.1O und Aktin übereinandergelegt, so kann man eine punktuelle Gelbfärbung im Bereich der Zellmembran und der Lamellipodien erkennen. Diese Gelbfärbung entspricht einer Co-Lokalisation von Protein 4.1O und Aktin.

Die Auswertung dieser Versuchsreihe konnte beweisen, dass Protein 4.1O und Aktin co-lokalisieren. Die Co-Lokalisation von Protein 4.1O und Aktin lässt sich vor allem in der Zellperipherie und in den Lamellipodien der Zellen nachweisen. Diese Anteile der Zellen entsprechen den motilen Anteilen der Zelle.

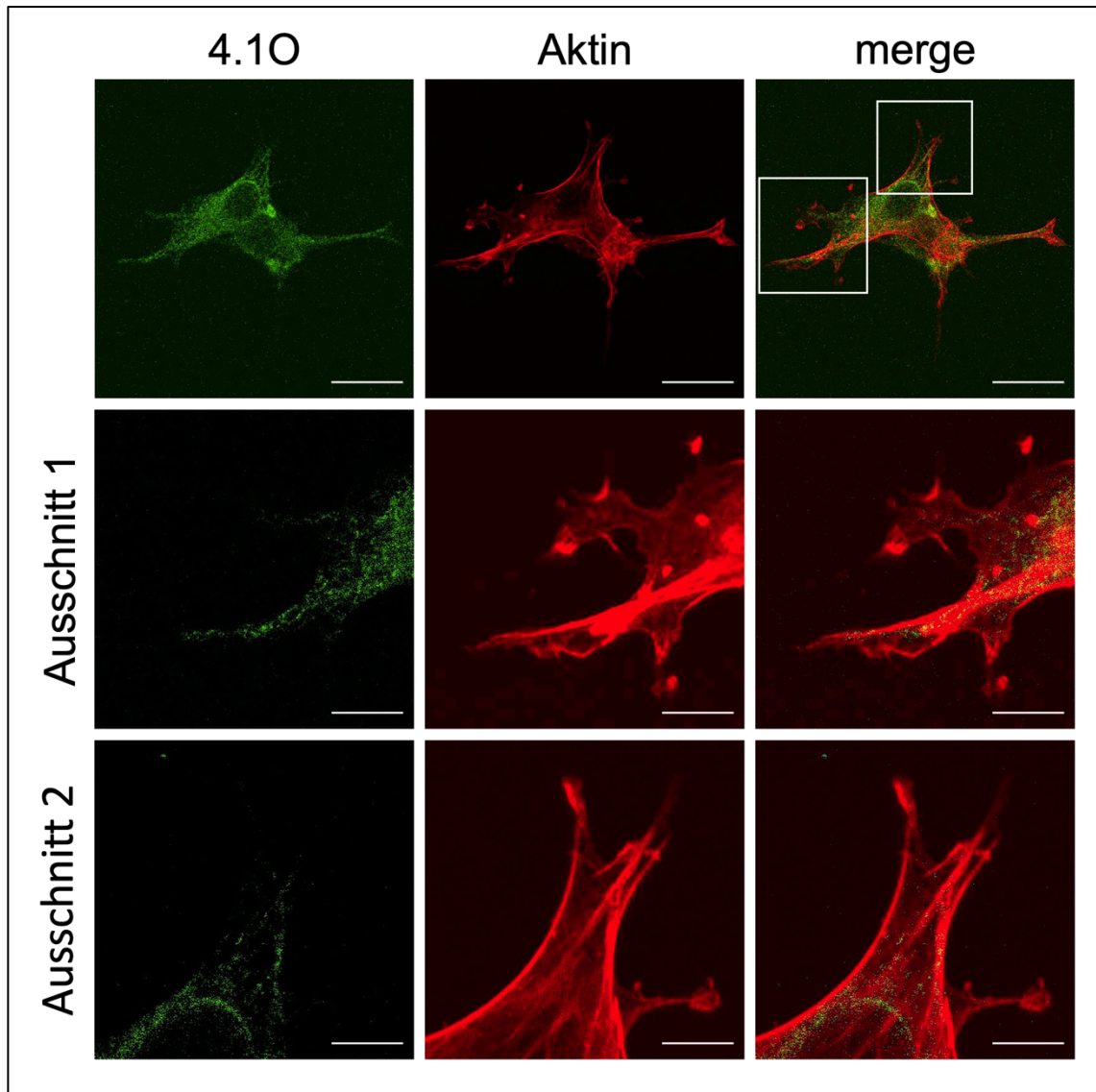


Abb. 2: Protein 4.10 co-lokalisiert mit F-Aktin: zu sehen ist eine Immunfluoreszenzfärbung von Protein 4.10 überexprimierenden COS-7-Zellen. In der oberen Reihe ist eine Übersichtsaufnahme der Zelle zu sehen, die beiden unteren Reihen zeigen vergrößerte Ausschnitte aus dieser Zelle. Protein 4.10 (grün) zieht sich wabenartig durch die gesamte Zelle, F-Aktin (rot) bildet ein fein verzweigtes Netzwerk. Bei den *merge*-Bildern in der rechten Spalte, stellt sich die Co-Lokalisation von Protein 4.10 und F-Aktin gelb dar. Die Co-Lokalisation findet vor allem punktuell in der Zellperipherie an der Zellmembran statt. Die Maßstabsleiste in der oberen Reihe entspricht 20 Mikrometer, in den beiden unteren Reihen entspricht sie 5 Mikrometer. 63-fache Vergrößerung.

3.3 Die Interaktion von Protein 4.10 und Nephrin hängt vom Phosphorylierungszustand von Nephrin ab

Nephrin ist der Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran. Über seinen Phosphorylierungszustand ist Nephrin dazu in der Lage, verschiedene Signalwege zu steuern. Um zu untersuchen, inwieweit der Phosphorylierungszustand von Nephrin für

die Interaktion mit Protein 4.1O von Bedeutung ist, wurden Stimulationsversuche mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 durchgeführt.

Hierfür wurden in HEK 293T-Zellen Nephrin und Protein 4.1O überexprimiert. Eine Stunde vor der Zellernte wurden die Zellen mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 stimuliert. Anschließend folgte eine Co-IP.

Wie in der Abbildung 3 zu erkennen ist, führt eine Stimulation mit PP2 zu einem signifikanten Abfall der Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O. Dieser Abfall betrug ca. 50%. Folglich ist der Phosphorylierungszustand von Nephrin für die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O von Bedeutung: Protein 4.1O bindet bevorzugt an tyrosinphosphoryliertes Nephrin.

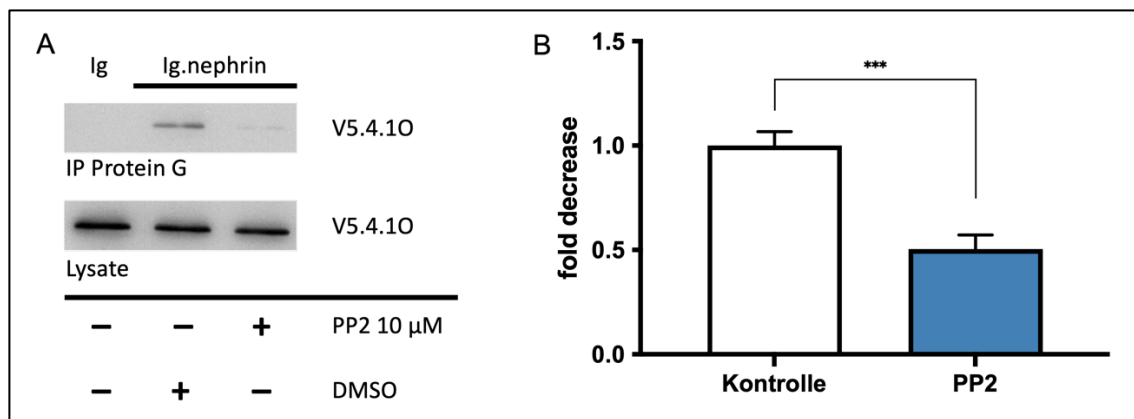


Abb. 3: Protein 4.1O bindet bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin: (A) Dargestellt ist ein Westernblot nach Durchführung einer Co-Immunopräzipitation. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin nach Stimulation mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 rückläufig ist. (B) Nach statistischer Auswertung zeigt sich ein Abfall der Interaktion um etwa 50 %. (***) $p = 0.008$, $n = 5$)

3.4 Die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin hängt von dem Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O ab

3.4.1 Identifizierung einer MAPK- und DEF-site in Protein 4.1O

Die Aminosäuresequenz von Protein 4.1O 506-553 wurde dahingehend untersucht, ob es Sequenzen gibt, an denen eine posttranslationelle Modifikation stattfinden könnte.

Die Aminosäuren T521 und Y529 wurden als Stellen identifiziert, an denen eine solche Modifikation stattfinden könnte (Scansite 2.0, Netphos 2.0)(Obenauer, 2003). Unter zu Hilfenahme von bekannten Motiven wurden die Aminosäuresequenzen um T521 und Y529 genauer untersucht. Die Aminosäuresequenz 527-530 mit FH(Y)E formt eine *docking site for ERK FxF* (DEF)-site. DEF-sites generieren in Substraten eine

weitere Andockstelle für Kinasen, um eine Substratspezifität zu erreichen und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$ zu erhöhen (Sheridan et al., 2008). Nach Phosphorylierung an Y529 wird eine *docking site* für MAPK freigelegt. Die Aminosäuresequenz 521-530 mit TPxxxxFxYE formt eine ideale *docking site* für die MAPK ERK2 und eine nahezu ideale *docking site* für die MAPK p38 α/β . T521 stellt ein potenzielles Substrat dieser MAPK dar.

Um die Bedeutung der Aminosäuren T521 und Y529 zu unterstreichen, wurde die Aminosäuresequenz 515-535 von Protein 4.1O verschiedener Spezies verglichen. In Abbildung 4 ist die Aminosäuresequenz 515-535 von Protein 4.1O dargestellt. Sie zeigt einen sehr hohen Grad an Konservierung. Am Beispiel des Zebrafischs (*danio rerio*) lässt sich die Bedeutung dieser Erkenntnis verdeutlichen. Die MAPK- und DEF-*site*, die sich innerhalb der Aminosäuresequenz 515-535 befinden, sind im Zebrafisch und im Menschen identisch. Werden die restlichen Aminosäuren miteinander verglichen, so besteht lediglich eine Übereinstimmung von 63,2%. Die DEF- und MAPK-*site* scheinen so entscheidend für die Funktion von Protein 4.1O und der orthologen Proteine in anderen Spezies zu sein, dass diese Aminosäuresequenzen durch die Evolution hindurch konserviert blieben. Es liegt nahe, dass die DEF- und MAPK-*site* eine wichtige Funktion in Protein 4.1O übernehmen.

Es sind somit zwei Stellen identifiziert worden, an denen eine posttranslationelle Modifikation stattfinden kann: die erste ist T521, welche eine MAPK-*site* ist, und die zweite Y529, welche eine DEF-*site* ist. Diese Aminosäuresequenzen sind evolutionär hochkonserviert.

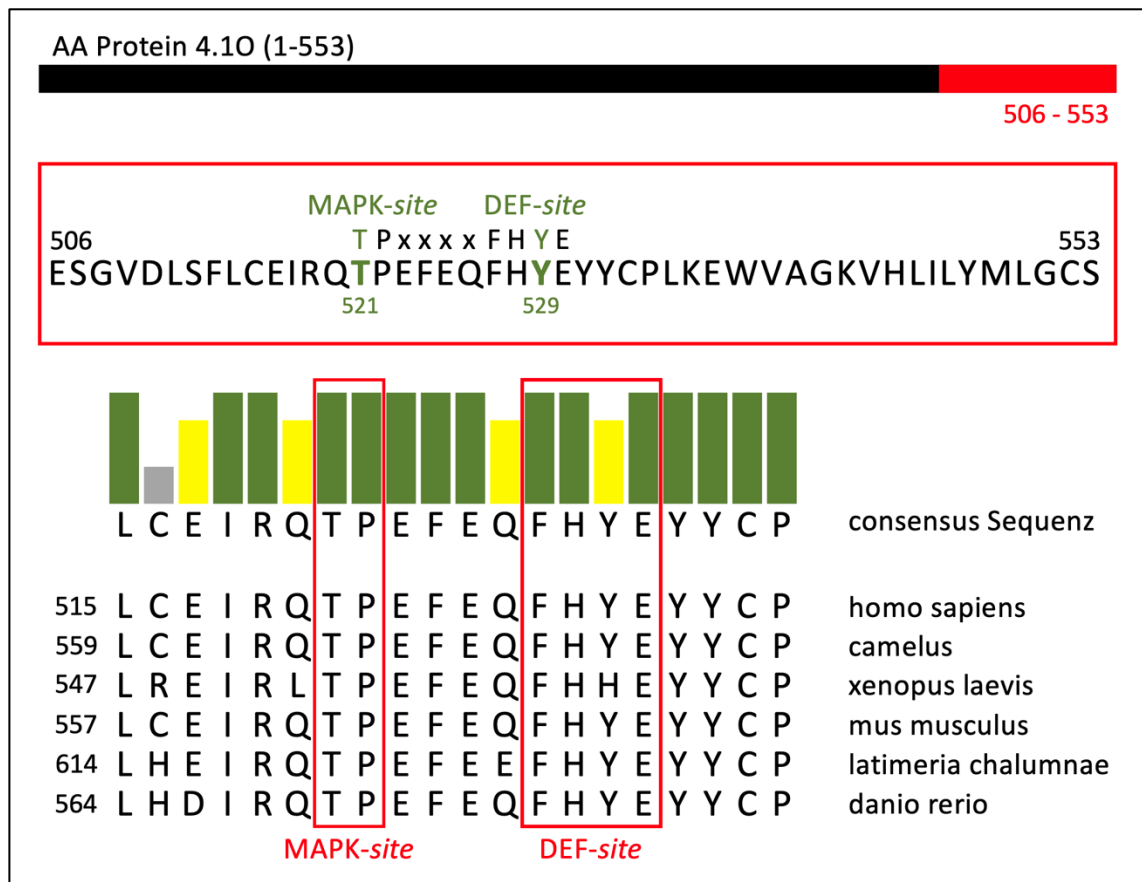


Abb. 4: Protein 4.1O Aminosäuren (AA) 506-553 sind hochkonserviert und enthalten eine MAPK- und DEF-site: An der Position Y529 befindet sich eine DEF-site, an der die MAPK EKR2, p38 α und p38 β binden können. T521 ist ein potenzielles Substrat dieser MAPK. In der unteren Hälfte wird die Aminosäuresequenz von humanem Protein 4.1O, die die DEF- und MAPK-site enthält, mit anderen Spezies verglichen. Die AA sind hochkonserviert.

3.4.2 p38-Inhibition reduziert die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Protein 4.1O durch MAPK das Interaktionsverhalten von Protein 4.1O verändert.

Hierfür wurden in HEK 293T-Zellen Protein 4.1O und Nephrin überexprimiert. Eine Stunde vor der Zellernte, wurden die Zellen mit dem p38-Inhibitor SB202190 stimuliert. Anschließend wurde eine Co-IP durchgeführt.

In der Abbildung 5 ist zu erkennen, dass nach der Inhibierung der MAPK p38 die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin signifikant um ungefähr die Hälfte abnimmt. Somit ist gezeigt worden, dass die MAPK p38 das Interaktionsverhalten von Protein 4.1O verändert. Dies unterstützt die Hypothese, dass die MAPK-site wichtig für die Funktion von Protein 4.1O ist.

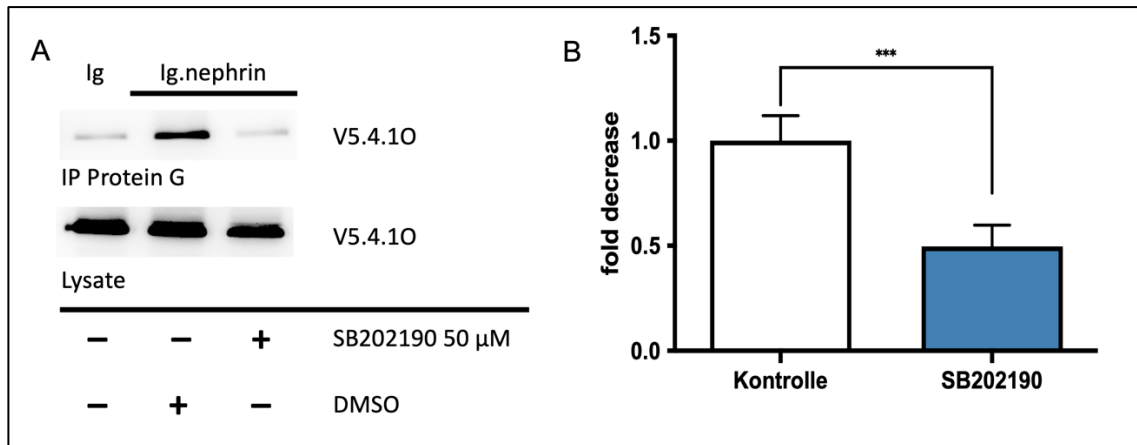


Abb. 5: p38-Inhibition vermindert die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin: (A) Dargestellt ist ein Westernblot nach Durchführung einer Co-Immunopräzipitation. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin nach Stimulation mit dem p38-Inhibitor SB202190 rückläufig ist. (B) Nach statistischer Auswertung zeigt sich ein Abfall der Interaktion um etwa 50 %. (** p = 0.028, n = 4)

3.4.3 ERK2-Inhibition reduziert die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Inhibition der MAPK ERK2 ebenfalls zu einer veränderten Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin führt.

Hierfür wurden in HEK 293T-Zellen Nephrin und Protein 4.1O überexprimiert. Eine Stunde vor der Zellernte wurden die Zellen mit dem ERK2-Inhibitor 11e stimuliert. Anschließend folgte eine Co-IP.

In Abbildung 6 ist zu erkennen, dass nach ERK2-Inhibition die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin signifikant um etwa die Hälfte abnahm. Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ERK2 die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin vermindert. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die Phosphorylierung an der MAPK-site entscheidend für die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin ist.

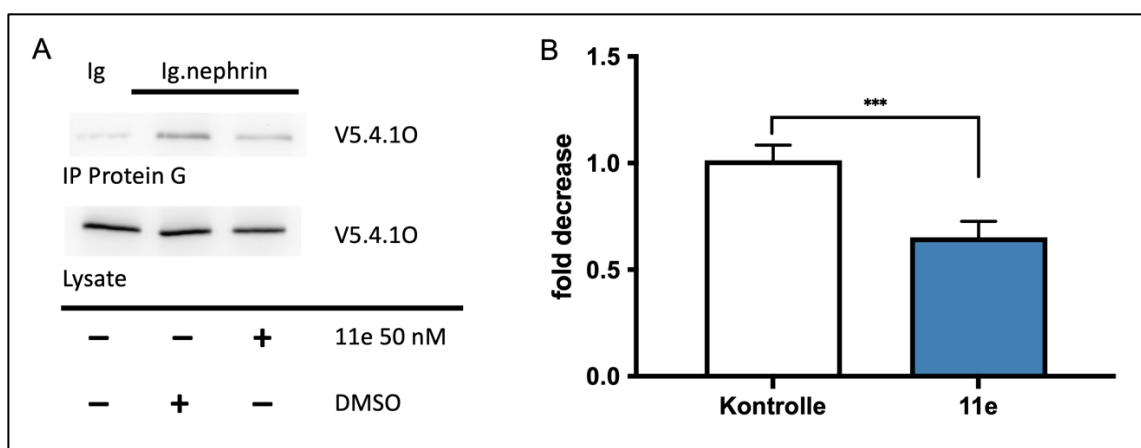


Abb. 6: ERK2-Inhibition vermindert die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin: (A) Es ist ein Westernblot nach Durchführung einer Co-Immunpräzipitation dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin nach Stimulation mit ERK2 rückläufig ist. (B) Nach statistischer Auswertung zeigt sich ein signifikanter Abfall der Interaktion. (***) $p = 0.028$, $n = 4$)

3.4.4 Punktmutationen in der DEF- und in der MAPK-site führen zu einer verringerten Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin

Nun sollte untersucht werden, ob Veränderungen in der DEF- und MAPK-site von Protein 4.1O zu einer verminderten Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin führen. Hierfür wurden mittels Mutagenese-PCRs jeweils zwei Punktmutationen in der MAPK-site T521 und in der DEF-site Y529 generiert.

Das Threonin (T) in der MAPK-site T521 wurde zum einen durch Alanin (A) und zum anderen durch Asparaginsäure (D) ersetzt. Die entstandene Punktmutation T521A zeichnet sich dadurch aus, dass Alanin nicht phosphorylierbar ist. Somit ist das punktmutierte Protein 4.1O T521A kein Substrat von MAPK mehr. Im Gegensatz dazu imitiert Asparaginsäure in dem punktmutierten Protein 4.1O T521D einen dauerhaft phosphorylierten Zustand.

Analog dazu wurde in der DEF-site Y529 das Tyrosin (Y) zum einen durch Alanin (A) und zum anderen durch Phenylalanin (F) ersetzt. Das punktmutierte Protein 4.1O Y529A lässt sich nicht phosphorylieren, was ein Andocken von Kinasen verhindert. Demgegenüber imitiert das Phenylalanin in der Punktmutation Y529F eine dauerhafte Phosphorylierung.

Nach der erfolgreichen Generierung der Punktmutationen in Protein 4.1O wurden Protein 4.1O und Nephrin und die Punktmutationen von Protein 4.1O und Nephrin in HEK 293T-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden Co-IPs durchgeführt.

In der Abbildung 7 ist die Auswertung dieser Versuche dargestellt. Sowohl die Punktmutationen der MAPK-site T521A und T521D als auch die Punktmutationen der DEF-site Y529A und Y529F zeigten zwar eine verminderte Interaktion mit Nephrin, diese war allerdings nicht signifikant.

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl Mutationen in der MAPK- als auch in der DEF-site zu einem nicht signifikantem Rückgang der Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin führen.

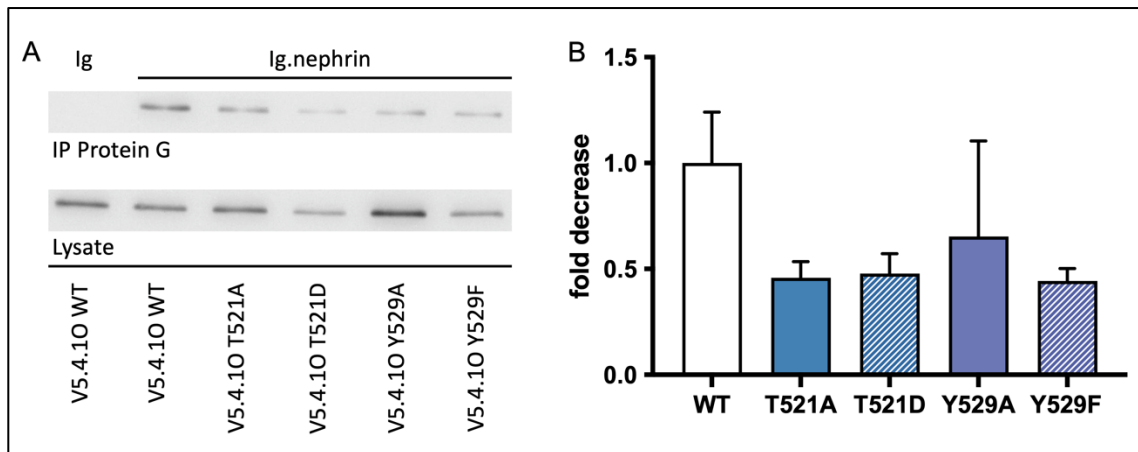


Abb. 7: Punktmutationen in der DEF-site vermindern die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin: (A) Es ist ein Westernblot nach Durchführung einer Co-Immunopräzipitation dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Mutationen in der MAPK- als auch in der DEF-site zu einer verminderten Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O führen. (B) Nach statistischer Auswertung ist zu erkennen, dass die Punktmutationen in der MAPK-site (T521A und T521D) und DEF-site (Y529A und Y529F) zu einer verminderten Interaktion zwischen Nephrin und Protein 4.1O führen, die allerdings nicht signifikant ist. (n = 4, Kruskal-Wallis Test)

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Erkenntnisse

4.1.1 Protein 4.1O ist ein Ankerprotein von Nephrin an das Aktinzytoskelett

Das Aktinzytoskelett des Podozyten ist hochspezialisiert: es sorgt für die Stabilität des Podozyten und ermöglicht eine rasche Anpassung an sich verändernde Umstände. Diese Konformationsänderungen des Aktinzytoskeletts sind insbesondere im Rahmen des podozytären *Effacements* von Bedeutung, der podozytären Reaktion auf Stress (Kriz et al., 2013). Um einen Zelluntergang zu vermeiden und das podozytäre *Effacement* einzuleiten, werden Signale von extrazellulär vor allem über Nephrin an das Aktinzytoskelett weitergeleitet (Garg, 2018). Die Interaktion von Nephrin an Aktin wird über Ankerproteine vermittelt (Conti et al., 2017, Jones et al., 2006).

Nachdem FRMD3 als Kandidatengen für die diabetische Nephropathie identifiziert worden ist (Pezzolesi et al., 2009), stellte sich die Frage nach der möglichen Funktion des Genproduktes, Protein 4.1O. Protein 4.1O gehört zu den *FERM-Domain-containing* Proteinen. Eine wichtige Funktion dieser Proteine ist die Verankerung von anderen Proteinen an das Aktinzytoskelett (Chishti et al., 1998). Bereits für andere Mitglieder der 4.1-Familie konnte eine essenzielle Funktion für das Aktinzytoskelett nachgewiesen werden: Mutationen im Gen für 4.1R führen zu dem Krankheitsbild der hereditären Elliptozytose, einem Strukturdefekt von Erythrozyten. Eine Mutation der Spektrin/Aktin-bindenden Domäne führt zu demselben Phänotypen wie der *Knockout* des gesamten Proteins 4.1R. Proteins 4.1R organisiert das Aktinzytoskelett (Hoover and Bryant, 2000).

Die Expression von Protein 4.1O konnte zunächst lediglich im Ovar nachgewiesen werden (Ni et al., 2003). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte eine Expression von Protein 4.1O in der humanen Niere und humanen Podozyten nachgewiesen werden (Ohlsson, 2018). Es konnte auch eine Interaktion der Spektrin/Aktin-bindenden Domäne mittels *Pulldown Assay* nachgewiesen werden (Ohlsson, 2018).

In der vorliegenden Arbeit sollten diese Interaktionen *in vivo* untersucht werden und die Ergebnisse bestätigt werden.

Es konnte in Protein 4.1O überexprimierenden COS-7-Zellen eine Co-Lokalisation von Protein 4.1O und F-Aktin nachgewiesen werden. Protein 4.1O zieht sich als wabenartige Struktur durch die Zelle und zeigt in den submembranösen Anteilen der Zelle ein punktförmiges Verteilungsmuster. Desweiteren konnte Protein 4.1O auch in Lamellipodien der COS-7-Zellen nachgewiesen werden. Das Aktinzytoskelett zieht sich

als feines kortikales Netzwerk durch die gesamte Zelle. Eine Co-Lokalisation von Aktin und Protein 4.1O zeigte sich in den submembranösen Anteilen und den Lamellipodien. Diese Anteile entsprechen den motilen Anteilen der Zelle. Lamellipodien sind flache Membranausstülpungen, die sich an der *leading edge* von Zellen befinden. Während der Zellmigration bewegen sich Zellen in Richtung dieser *leading edge*. Die Grundlage der Bewegung ist eine stetige Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin in den Lamellipodien. Dadurch werden die Zellen in Richtung der Lamellipodien gezogen (Le Clainche and Carlier, 2008). Es konnte ebenfalls für andere Mitglieder der 4.1-Familie eine Lokalisation im Bereich der *leading edge* von Zellen nachgewiesen werden. Protein 4.1R kann an der *leading edge* von Zellen nachgewiesen werden und scheint eine wichtige Funktion im Rahmen der Zellmigration zu übernehmen (Ruiz-Sáenz et al., 2011). Protein 4.1B lässt sich an der *leading edge* von murinen Fibroblasten nachweisen (Wang et al., 2014). Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Lokalisation von Protein 4.1O und eine Co-Lokalisation mit F-Aktin an der *leading edge* von Zellen nachgewiesen werden konnte, lässt sich annehmen, dass Protein 4.1O auch eine wichtige Rolle in der Zellmigration übernehmen könnte.

Die im Rahmen der Zellmigration erforderliche Aktinpolymerisation und -depolymerisation sind ein hochorganisierter Prozess. So konnte gezeigt werden, dass Nephrin über eine Tyrosinphosphorylierung an Nck binden kann und damit Einfluss auf das Aktinzytoskelett nimmt. Dieser Prozess wird vor allem während der Nierenreifung und bei podozytärer Schädigung initiiert. Bei einem podozytären *Effacement* lässt sich eine vermehrte Bildung von Lamellipodien nachweisen (Garg, 2018). Durch die Bildung von Lamellipodien kann der Podozyt durch das podozytäre *Effacement* zunächst eine Loslösung von der glomerulären Basalmembran und den Zelluntergang verhindern.

Nephrin ist ein Mitglied der Ig-Superfamilie und dazu in der Lage, Signale von extrazellulär nach intrazellulär weiterzuleiten. Unter anderem kann Nephrin so auch Einfluss auf das Aktinzytoskelett nehmen und dieses modifizieren (Benzing, 2004). Dadurch wird den Podozyten ermöglicht, dynamisch auf Veränderungen zu reagieren. Dies ist insbesondere wichtig, weil es sich bei den Podozyten um terminal differenzierte Zellen handelt, die sich nach einer Schädigung nicht mehr teilen können. Schädigungen des Podozyten äußern sich in einem podozytären *Effacement*.

Es wurde bereits beschrieben, dass Nephrin über Ankerproteine mit dem Aktinzytoskelett interagiert. Die bislang am besten charakterisierten Ankerproteine von Nephrin an das Aktinzytoskelett sind die Proteine der Nck-Familie. Die Bedeutung der

Nck-Proteine wird dadurch unterstrichen, dass ein *Knockout* dieser Proteine im Mausmodell einen ähnlichen Phänotypen wie ein Nephrin-*Knockout* aufweist. Somit ist Nck essenziell für die Funktion von Nephrin (Jones et al., 2006).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Funktion von Protein 4.1O als mögliches Ankerprotein von Nephrin an das Aktinzytoskelett untersucht. Protein 4.1O bindet über seine Spektrin/Aktin-bindende Domäne an Aktin und interagiert über den C-Terminus mit der cytoplasmatischen Domäne von Nephrin (Ohlsson, 2018). Diese cytoplasmatische Domäne Nephrens ist essenziell für die Weiterleitung von Signalkaskaden (Tryggvason et al., 1999, Tryggvason, 1999, Verma et al., 2003, Lahdenperä et al., 2003, Li et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, diese Interaktion *in vivo* in Mausglomeruli nachzuweisen. Es konnte bewiesen werden, dass Protein 4.1O im Bereich der Glomeruli exprimiert wird. Desweiteren zeigt sich im Bereich der Mausglomeruli eine Co-Lokalisation von Protein 4.1O und Nephrin.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei Protein 4.1O um ein Ankerprotein von Nephrin an das Aktinzytoskelett handelt: Protein 4.1O interagiert sowohl mit Aktin als auch mit Nephrin. Protein 4.1O lässt sich vor allem im Bereich der Lamellipodien nachweisen, also in den Bereichen, wo eine stetige Modifikation des Aktinzytoskeletts stattfindet. Nephrin könnte somit über Protein 4.1O eine Polymerisation/Depolymerisation des Aktinzytoskeletts steuern.

4.1.2 Protein 4.1O ist essenziell für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran

Bei der glomerulären Schlitzmembran handelt es sich um ein hochkomplexes Gerüst verschiedener Proteine, die alle einen wichtigen Beitrag zur Integrität der glomerulären Schlitzmembran leisten. Wird die glomeruläre Schlitzmembran und damit der glomeruläre Filter geschädigt, so zeigt sich klinisch eine Mikroalbuminurie, die sich zu einer unselektiven Proteinurie bis zum nephrotischen Syndrom entwickelt. Der glomeruläre Filter ist also für Makromoleküle durchlässig. Das mikroskopische Korrelat dieser Durchlässigkeit des glomerulären Filters ist das podozytäre *Effacement*. Bei einem podozytären *Effacement* sind die Podozyten verplumpt, die feinen Fußfortsätze ziehen sich zum Zellkörper zurück. Die Fußfortsätze verbreitern sich und verschmelzen

miteinander, eine glomeruläre Schlitzmembran lässt sich dann nicht mehr erkennen (Kriz et al., 2013, Garg, 2018).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Protein 4.1O mit Nephrin und F-Aktin interagiert, stellte sich nun die Frage, ob Protein 4.1O bedeutsam für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran ist.

Kramer-Zucker et al. konnten in Versuchen mit Zebrafischlarven nachweisen, dass ein *Knockout* des FRMD3 Orthologs *mosaic eyes* zu einer Schädigung der glomerulären Schlitzmembran führt. Die Zebrafischlarven entwickeln ein Dottersacködem, das phänotypische Korrelat eines nephrotischen Syndroms. Elektronenmikroskopisch zeigt sich ein podozytäres *Effacement*. Desweiteren zeigt sich eine vermehrte Durchlässigkeit des glomerulären Filters. Kramer-Zucker et al. konnten somit die essenzielle Rolle des Genprodukts von FRMD3 für die Integrität des glomerulären Filters nachweisen (Kramer-Zucker et al., 2005).

Nicht veröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe, die in Kooperation mit Prof. Dr. med. M. Schiffer (aktuell Medizinische Klinik 4, Nephrologie und Hypertensiologie des Universitätsklinikums Erlangen, zuvor Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der Medizinischen Hochschule Hannover) entstanden sich, bestätigten diesen Phänotyp nach *FRMD3-Knockdown*: die Zebrafischlarven entwickelten ein deutliches Dottersacködem, das makroskopische Korrelat einer Proteinurie. In den Pronephrosstrukturen der Zebrafischlarven nach *FRMD3-Knockdown* zeigten sich elektronenmikroskopisch verplumpte podozytäre Fußfortsätze, die zum Teil miteinander verschmolzen sind. Auch funktionell zeigten sich Einschränkungen: mittels retinaler Fluoreszenzmessung zeigte sich eine gesteigerte Durchlässigkeit des glomerulären Filters. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob dieser proteinurische Phänotyp nach *FRMD3-Knockdown* reversibel ist. Hierfür wurden den Zebrafischlarven nach erfolgreichem *FRMD3-Knockdown* humane AA-Sequenzen von Protein 4.1O injiziert. Es zeigte sich nach Injektion von Protein 4.1O ein Rückgang des Dottersacködems. Auch in der retinalen Fluoreszenzmessung zeigte sich ein Anstieg der Fluoreszenz. Es erfolgte somit ein *Rescue* des proteinurischen Phänotyps. Die AA-Sequenz, die den *Rescue* bewirkt, entspricht dem C-terminalen Ende von Protein 4.1O. Innerhalb dieser AA-Sequenz befindet sich die Interaktionsstelle von Nephrin an Protein 4.1O (Ohlsson, 2018). Die Ergebnisse von Kramer-Zucker et al. untermauern diese Beobachtungen: die *FRMD3*-Mutante, die den nephrotischen Phänotyp hervorruft, ist innerhalb der FERM-Domäne unterbrochen, somit fehlt der Mutante der C-Terminus des Wildtyp-Proteins

(Kramer-Zucker et al., 2005). Für die Funktion von Protein 4.1O und die Wiederherstellung der Integrität des glomerulären Filters bei *FRMD3 Knockdown*, übernimmt diese Interaktionsstelle somit eine herausragende Rolle.

Zusammenfassend verdeutlichen diese Ergebnisse die Bedeutung von Protein 4.1O für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran. Insbesondere die Interaktionsstelle von Nephrin an Protein 4.1O ist essenziell für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran.

4.1.3 Die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin ist abhängig von dem Phosphorylierungszustand von Nephrin

Die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Nephrin ist eine wichtige Schaltstelle für die Regulation der glomerulären Schlitzmembran und podozytärer Funktionen. Der cytoplasmatische C-Terminus von Nephrin enthält konservierte Tyrosinreste, die durch Src-Kinasen phosphoryliert werden können (Lahdenperä et al., 2003). Phosphoryliertes Nephrin ist dazu in der Lage, unter Zuhilfenahme anderer Proteine wie Nck, das Aktinzytoskelett zu modifizieren. Nck bindet bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin (Jones et al., 2006). Liegt im Mausmodell eine Triple-Mutation aller drei konservierter Nephrin-Tyrosinreste 1176, 1193 und 1217 vor, so lässt sich ein podozytäres *Effacement* und eine Proteinurie beobachten (New et al., 2016). Zusätzlich wird die Relevanz der Nephrin-Phosphorylierung für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran durch den Phänotyp Fyn-defizienter Mäuse verdeutlicht: Fyn *-/-* *Knockout*-Mäuse entwickeln eine schwere Proteinurie, elektronenmikroskopisch lässt sich ein podozytäres *Effacement* nachweisen (Tryggvason et al., 2006).

Es konnte in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt werden, dass Protein 4.1O vermutlich als ein Ankerprotein Nephrins an das Aktinzytoskelett dient. Die Proteine der 4.1-Familie sind bekannte Regulatoren des Aktinzytoskeletts (Hoover and Bryant, 2000). Es ist eine vergleichbare Funktion von Protein 4.1O und Nck anzunehmen. Ein gleichzeitiger *Knockout* von Nck1 und Nck2 führt im Mausmodell zu einem podozytären *Effacement* mit der Folge eines Versterbens der Mäuse in der Embryonalzeit (Jones et al., 2006). Ein *Knockdown* von *mosaic eyes* in Zebrafischlarven zeigt einen ähnlichen Phänotyp wie der *Knockout* von Nck1/2: die Pronephros-Strukturen der Zebrafischlarven weisen ein podozytäres *Effacement* auf, der renale Filter ist durchlässiger (Kramer-Zucker et al., 2005). In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass

die Nephrin-Nck-Interaktion in Anwesenheit von Protein 4.1O rückläufig ist (Ohlsson, 2018), es ist anzunehmen, dass die Funktion von Nck1/2 und Protein 4.1O in Anwesenheit von Protein 4.1O überlappen. Dadurch, dass Nck1 und Nck2 bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin binden (Jones et al., 2006) sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin durch eine Nephrinphosphorylierung verbessert wird.

Es ist gelungen, nachzuweisen, dass die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin unter Stimulation mit dem Src-Kinase-Inhibitor PP2 signifikant abnimmt. Bei PP2 handelt es sich um einen selektiven Src-Kinase-Inhibitor, der verschiedene Src-Kinasen hemmt, unter anderem Fyn. Protein 4.1O bindet somit bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin. Es ist bekannt, dass eine Phosphorylierung von Nephrin zu einer Rekrutierung von Nck mit einer nachfolgenden Aktinpolymerisierung führt (Martin and Jones, 2018). In Zusammenschau mit den hier dargestellten Ergebnissen sind dies Hinweise darauf, dass Protein 4.1O eine ähnliche Aufgabe wie die Nck-Proteine in der Niere übernehmen könnte – die der Verankerung von Nephrin am Aktinzytoskelett mit der nachfolgenden Modifikation des Aktinzytoskeletts.

4.1.4 Die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin ist abhängig von dem Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O

Protein 4.1O wird auf translationeller Ebene mittels alternativem Splicing reguliert (Ohlsson, 2018). Es wurde hier untersucht, in welcher Form Protein 4.1O auf posttranslationeller Ebene reguliert wird. Posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen/Dephosphorylierung werden vor allem zur schnellen Anpassung an sich rasch verändernde Umstände durchgeführt. Es konnte bereits für das am besten charakterisierte Mitglied der 4.1-Familie – Protein 4.1R – eine Phosphorylierung nachgewiesen werden. Eine Phosphorylierung von Protein 4.1R im Erythrozyten führt zu einer verminderten Stabilität des Zytoskeletts, was wichtig für die Flexibilität der Erythrozyten sein könnte (Ling et al., 1988). Über die Phosphorylierung von Protein 4.1R erfolgt somit eine kurzfristige Modulation des Aktinzytoskeletts (Manno et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass auch die anderen Mitglieder der 4.1-Familie durch eine Phosphorylierung modifiziert werden könnten.

Aufgrund des funktionellen *Rescues* von Protein 4.1O im Zebrafischmodell, wurde diese Aminosäuresequenz im Hinblick auf bekannte Motive untersucht. An der Position

Y529 konnte eine DEF-*site* identifiziert werden, die nach Phosphorylierung eine ideale docking *site* für die MAPK ERK2 und eine nahezu ideale docking *site* für die MAPK p38 α/β darstellt. Das Threonin an der Position 521 konnte als Substrat der MAPK identifiziert werden und bildet somit die MAPK-*site*. Interessanterweise sind sowohl die DEF- als auch die MAPK-*site* evolutionär hochkonserviert, was auf eine große Bedeutung für die Funktion von Protein 4.1O schließen lässt.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch MAPK relevant für die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin ist. Es wurden jeweils die MAPK p38 und ERK2 inhibiert und die Interaktionen von Protein 4.1O und Nephrin untersucht. Es zeigte sich in beiden Versuchsansätzen ein signifikanter Rückgang der Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin. Somit konnte gezeigt werden, dass Nephrin bevorzugt an phosphoryliertes Protein 4.1O bindet. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die MAPK p38 und ERK2 wichtig für die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin sind.

Als nächstes wurden direkte Veränderungen an der DEF- und MAPK-*site* von Protein 4.1O generiert. Zum einen wurde das Threonin an der MAPK-*site* T521 durch Alanin (A) und zum anderen durch Asparaginsäure (D) ersetzt. In T521A ist Alanin nicht phosphorylierbar, während in T521D Asparaginsäure eine dauerhafte Phosphorylierung imitiert. Analog dazu wurden auch Punktmutationen in der DEF-*site* generiert. Das Tyrosin (Y) in der DEF-*site* Y529 wurde zum einen durch Alanin (A) und zum anderen durch Phenylalanin (F) ersetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die punktmutierten Varianten von Protein 4.1O im Vergleich zum Protein 4.1O WT allesamt einen Rückgang der Interaktion mit Nephrin aufweisen. Ein signifikanter Rückgang der Interaktion mit Nephrin konnte allerdings weder bei den punktmutierten DEF- noch MAPK-*sites* nachgewiesen werden.

In bislang nicht veröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte erst unter Stimulation mit hohen Glucose-Konzentrationen ein signifikanter Rückgang der Interaktion zwischen Nephrin und den Y529A- und Y529F-Mutanten erreicht werden. Diese hohen Glucosekonzentrationen imitieren die Bedingungen einer schlechten Blutzuckerkontrolle bei Diabetikern. Somit scheint eine intakte DEF-*site* insbesondere im Rahmen erhöhter Glucose-Konzentrationen wichtig für die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O zu sein.

Interessanterweise führten sowohl die nicht phosphorylierbaren T521A- und Y529A-Mutanten als auch die dauerhaft phosphorylierten T521D- und Y529F-Mutanten zu

einem Rückgang der Interaktion zwischen Nephrin und Protein 4.1O. Dies scheint zunächst im Widerspruch zu den bisherigen Ergebnissen zu stehen, dass eine Phosphorylierung von Protein 4.1O von Vorteil für die Interaktion mit Nephrin ist. Es konnte bereits für andere Proteine gezeigt werden, dass eine dauerhafte Phosphorylierung, insbesondere an der Interaktionsstelle zweier Proteine, zu einer verminderten Stabilität der Bindung führen kann. Durch das Hinzufügen einer Phosphatgruppe an eine Interaktionsstelle zweier Proteine kann es zu sterischen Hinderungen der Bindung kommen. Es könnte sein, dass kurzfristige Phosphorylierungen in bestimmten Proteinkomplexen eher dazu dienen, dass eine Bindungsstelle erkannt wird, als dass die Bindung gestärkt wird (Nishi et al., 2011). Es wäre möglich, dass dies auch für die Bindung von Nephrin an Protein 4.1O gilt. Bei Phosphorylierungen handelt es sich rasche Änderungen: sie dienen einer schnellen Anpassung an sich verändernde Umstände, eine dauerhafte Phosphorylierung könnte somit für die Bindung unvorteilhaft sein. Es könnte sein, dass die Phosphorylierung an der DEF- und der MAPK-*site* eher dazu dient, dass die Bindungsstelle durch Nephrin erkannt wird und eine dauerhafte Phosphorylierung die Bindung zwischen den beiden Proteinen destabilisiert.

Zusammenfassend ist somit davon auszugehen, dass eine Phosphorylierung an der DEF- und MAPK-*site* von Vorteil für die Interaktion von Nephrin und Protein 4.1O ist. Bezugnehmend auf die bislang nicht veröffentlichten Ergebnisse, scheint insbesondere eine intakte DEF-*site* von besonderer Bedeutung für die Interaktion unter hohen Glucosekonzentrationen von Protein 4.1O und Nephrin zu sein.

4.1.5 Protein 4.1O ist unter diabetischen Bedingungen hochreguliert

Diabetes mellitus und die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie sind zu einem relevanten Gesundheitsproblem in unserer Gesellschaft geworden. Begünstigende Faktoren für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie sind eine lange Diabetesdauer, eine schlechte Blutzuckerkontrolle, eine arterielle Hypertonie und eine Hyperlipidämie (Lewis and Maxwell, 2014). Neben diesen Faktoren scheint eine genetische Komponente ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie zu spielen. Einige Patienten mit einem bereits lange andauerndem Diabetes mellitus und einer schlechten Blutzuckerkontrolle entwickeln keine diabetische Nephropathie, wohingegen Patienten mit vorbildlicher Blutzuckerkontrolle eine diabetische Nephropathie erleiden können (Conway and

Maxwell, 2009). Außerdem konnte eine familiäre Häufung der diabetischen Nephropathie festgestellt werden (Krolewski, 1999, Martini et al., 2008, Conway and Maxwell, 2009, Reidy et al., 2014, Buffon et al., 2015, Li and Pezzolesi, 2018).

In einer GWAS konnte eine relevante Korrelation zwischen SNPs in der Promotorregion von FRMD3 und der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie festgestellt werden (Pezzolesi et al., 2009).

SNPs in der Nähe des FRMD3-Gens korrelieren mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie. Daher erfolgt nun ein Ausblick, inwieweit sich unter diabetischen Bedingungen bei einer schlechten Blutzuckerkontrolle die Expressionslevel und -muster von Protein 4.1O verändern.

In nicht veröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass unter erhöhten Glucose-Konzentrationen von 25 mM Glucose die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) von Protein 4.1O in Protein 4.1O-exprimierenden Zellen hochreguliert ist. Um den osmotischen Effekt von Glucose als Ursache auszuschließen, wurden auch die mRNA-Level von Protein 4.1O nach Inkubation von 5.5 mM Glucose + 19.5 mM Mannitol untersucht. Hier zeigte sich keine Hochregulation der Protein 4.1O mRNA, somit ist die osmotische Wirkung von Glucose nicht die Ursache der Hochregulation. FRMD3 wird somit unter hohen Glucosekonzentrationen vermehrt exprimiert. Dies könnte ebenfalls die Ergebnisse der DEF-site-Mutationsversuche bestätigen: hier zeigte sich erst unter hohen Glucosekonzentrationen ein signifikanter Rückgang der Interaktion zwischen Nephrin und Protein 4.1O Y529F und Y529A. Protein 4.1O scheint somit unter hohen Glucosekonzentrationen vermehrt exprimiert zu werden und eine intakte DEF-site ist insbesondere dann wichtig für das Aufrechterhalten der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin.

In weiteren nicht veröffentlichten Versuchen unserer Arbeitsgruppe, die in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Thorsten Wiech (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf) entstanden sind, wurden Nierenbiopsien von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz aufgrund einer diabetischen Nephropathie untersucht. Alle Patienten hatten erhöhte HbA1c-Werte, was ein Hinweis auf eine bereits länger bestehende schlechte Blutzuckerkontrolle ist. Außerdem wiesen alle Patienten eine hohe Proteinurie zwischen 3,2 und 5,0 g/g Kreatinin auf. Die Patienten litten allesamt an einem fortgeschrittenen Stadium der *Chronic Kidney Disease* (Stadium 3b bis 5). Die Nierenbiopsien wurden gegen Protein 4.1O gefärbt. Als Kontrolle dienten Nullbiopsien gesunder Nieren vor Transplantation. Die Präparate wurden mittels

Fluoreszenzmikroskopie beurteilt: es zeigte sich bei den Biopsien der diabetischen Nieren eine intensivere Anfärbung gegen Protein 4.1O. Dementsprechend scheint Protein 4.1O in fortgeschrittenen Stadien der diabetischen Nephropathie hochreguliert zu sein.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass Protein 4.1O unter hohen Glucose-Konzentrationen vermehrt exprimiert wird. Diese vermehrte Expression von Protein 4.1O kann ein Versuch sein, die glomeruläre Funktion aufrecht zu erhalten und die glomeruläre Schlitzmembran zu stabilisieren, eine Art Schutzmechanismus. Warum zeigten die Patienten mit diabetischer Nephropathie trotz erhöhter Protein 4.1O-Expression dennoch eine Progression ihrer Erkrankung? Eine Erklärung könnte sein, dass bei so lange andauernd erhöhten Glucose-Spiegeln, selbst die Protein 4.1O-Hochregulation die Nierenfunktion nicht mehr aufrecht erhalten kann. Eine weitere Erklärung wäre, dass zu hohe Protein 4.1O-Konzentrationen die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie begünstigen. Es könnte sich alternativ um verschiedene Splicevarianten handeln, die verschiedene Funktionen übernehmen. Es wäre auch möglich, dass es sich um mutierte Protein 4.1O-Varianten handelt.

4.2 Limitationen und Ausblick

Eine Limitation dieser Arbeit ist, dass es sich bei den Versuchen zum großen Teil um *in vitro* Versuche handelt, deren Ergebnisse sich nicht einfach auf den lebenden Organismus übertragen lassen. Somit wäre es im nächsten Schritt sicherlich sinnvoll, weitere Versuche im Tiermodell zu untersuchen. Es wäre interessant zu klären, ob im Tiermodell unter diabetischen Bedingungen eine Veränderung der Protein 4.1O-Expression und der Protein 4.1O-Nephrin-Interaktion zu beobachten sind.

Eine weitere Limitation ist die Tatsache, dass es sich bei den hier durchgeführten transienten Transfektion in den HEK 293T- und COS-7-Zellen um Überexpressionen handelt. So hohe Proteinkonzentrationen, wie sie durch die Überexpression zustande kommen, sind wahrscheinlich *in vivo* nicht vorhanden. Dies ist ein weiteres Argument für die Durchführung weiterer Versuche, beispielsweise im Tiermodell. Auch eine Untersuchung weiterer humaner Nierenbiopsien in diesem Zusammenhang wäre zu überlegen.

Anhand der in der Diskussion dargestellten Untersuchungen der humanen Nierenbiopsien konnte gezeigt werden, dass Protein 4.1O bei fortgeschrittener diabetischer Nephropathie vermehrt exprimiert wird. Allerdings handelt es sich um eine kleine Fallzahl. Weitere Untersuchungen an Patienten mit diabetischer Nephropathie könnten zusätzlich Erkenntnisse zu der Funktion von Protein 4.1O erbringen. Es könnte auch untersucht werden, ob bei den Patienten eine Mutation von Protein 4.1O oder ob verschiedene Splicevarianten vorliegen.

4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Relevanz von Protein 4.1O für die Nierenfunktion weiter bestätigt werden. Es ist gelungen, eine Expression von Protein 4.1O *in vivo* nachzuweisen. Außerdem konnte die Co-Lokalisation von Protein 4.1O und F-Aktin bestätigt werden. Erstmals konnte auch die Co-Lokalisation von Protein 4.1O und Nephrin *in vivo* nachgewiesen werden. Diese Faktoren untermauern die vermutete Funktion von Protein 4.1O als Ankerprotein an die glomeruläre Schlitzmembran.

Protein 4.1O ist essenziell für die Integrität der Schlitzmembran: fehlt es, so tritt ein schweres podozytäres Effacement und eine massive Proteinurie auf. Die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin ist phosphorylierungsabhängig, sodass der Podozyt auf Veränderungen der Umgebung dynamisch reagieren kann. Protein 4.1O bindet bevorzugt an durch Src-Kinasen phosphoryliertes Nephrin und Nephrin bindet bevorzugt an durch MAPK phosphoryliertes Protein 4.1O.

Protein 4.1O wird unter hohen Glucose-Konzentrationen vermehrt exprimiert. Dabei kann es sich um einen Schutzmechanismus der Niere handeln, um die Funktion des glomerulären Filter so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Alternativ könnte es sich um verschiedene Splicevarianten oder mutierte Protein 4.1O-Varianten handeln. Für die Klärung dieser Frage sind weitere Untersuchungen notwendig.

In Zusammenschau mit den bisherigen Erkenntnissen über FRMD3 und Protein 4.1O kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei Protein 4.1O um einen durch MAPK regulierten Nephrin-Adaptor an F-Aktin handelt, der mit Diabetes mellitus assoziiert ist.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADLER, A. I., STEVENS, R. J., MANLEY, S. E., BILOUS, R. W., CULL, C. A. & HOLMAN, R. R. 2003. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*, 63, 225-32.
- BENZING, T. 2004. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 15, 1382-91.
- BOUTE, N., GRIBOUVAL, O., ROSELLI, S., BENESSY, F., LEE, H., FUCHSHUBER, A., DAHAN, K., GUBLER, M. C., NIAUDET, P. & ANTIGNAC, C. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24, 349-54.
- BUFFON, M. P., CARPENA, M. P., SORTICA, D. A., SANTER, A., CARLESSI, R., DE SOUZA, B. M., EDELWEISS, M. I., BERGER, M., CRISPIM, D. & CANANI, L. H. 2016. rs1888747 polymorphism in the FRMD3 gene, gene and protein expression: role in diabetic kidney disease. *Diabetol Metab Syndr*, 8, 3.
- BUFFON, M. P., SORTICA, D. A., GERCHMAN, F., CRISPIM, D. & CANANI, L. H. 2015. FRMD3 gene: its role in diabetic kidney disease. A narrative review. *Diabetol Metab Syndr*, 7, 118.
- BURGHARDT, T., HOCHAPFEL, F., SALECKER, B., MEESE, C., GRONE, H. J., RACHEL, R., WANNER, G., KRAHN, M. P. & WITZGALL, R. 2015. Advanced electron microscopic techniques provide a deeper insight into the peculiar features of podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 309, F1082-9.
- CHISHTI, A. H., KIM, A. C., MARFATIA, S. M., LUTCHMAN, M., HANSPAL, M., JINDAL, H., LIU, S. C., LOW, P. S., ROULEAU, G. A., MOHANDAS, N., CHASIS, J. A., CONBOY, J. G., GASCARD, P., TAKAKUWA, Y., HUANG, S. C., BENZ, E. J., JR., BRETSCHER, A., FEHON, R. G., GUSELLA, J. F., RAMESH, V., SOLOMON, F., MARCHESI, V. T., TSUKITA, S., TSUKITA, S., HOOVER, K. B. & ET AL. 1998. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*, 23, 281-2.
- CONTI, S., PERICO, L., GRAHAMMER, F. & HUBER, T. B. 2017. The long journey through renal filtration: new pieces in the puzzle of slit diaphragm architecture. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 26, 148-153.

- CONWAY, B. R. & MAXWELL, A. P. 2009. Genetics of diabetic nephropathy: are there clues to the understanding of common kidney diseases? *Nephron Clin Pract*, 112, c213-21.
- DIAKOWSKI, W., GRZYBEK, M. & SIKORSKI, A. F. 2006. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochem Cytobiol*, 44, 231-48.
- DONOVIEL, D. B., FREED, D. D., VOGEL, H., POTTER, D. G., HAWKINS, E., BARRISH, J. P., MATHUR, B. N., TURNER, C. A., GESKE, R., MONTGOMERY, C. A., STARBUCK, M., BRANDT, M., GUPTA, A., RAMIREZ-SOLIS, R., ZAMBROWICZ, B. P. & POWELL, D. R. 2001. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol*, 21, 4829-36.
- FREEDMAN, B. I., LANGEFELD, C. D., LU, L., DIVERS, J., COMEAU, M. E., KOPP, J. B., WINKLER, C. A., NELSON, G. W., JOHNSON, R. C., PALMER, N. D., HICKS, P. J., BOSTROM, M. A., COOKE, J. N., MCDONOUGH, C. W. & BOWDEN, D. W. 2011. Differential effects of MYH9 and APOL1 risk variants on FRMD3 Association with Diabetic ESRD in African Americans. *PLoS Genet*, 7, e1002150.
- GARG, P. 2018. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol*, 47 Suppl 1, 3-13.
- GERKE, P., HUBER, T. B., SELLIN, L., BENZING, T. & WALZ, G. 2003. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol*, 14, 918-26.
- GERKE, P., SELLIN, L., KRETZ, O., PETRASCHKA, D., ZENTGRAF, H., BENZING, T. & WALZ, G. 2005. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol*, 16, 1693-702.
- GRAHAMMER, F., WIGGE, C., SCHELL, C., KRETZ, O., PATRAKKA, J., SCHNEIDER, S., KLOSE, M., ARNOLD, S. J., HABERMANN, A., BRAUNIGER, R., RINSCHEN, M. M., VOLKER, L., BREGENZER, A., RUBBENSTROTH, D., BOERRIES, M., KERJASCHKI, D., MINER, J. H., WALZ, G., BENZING, T., FORNONI, A., FRANGAKIS, A. S. & HUBER, T. B. 2016. A flexible, multilayered protein scaffold maintains the slit in between glomerular podocytes. *JCI Insight*, 1.
- HOLTHOFER, H. 2007. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 2124-8.

- HOOVER, K. B. & BRYANT, P. J. 2000. The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 12, 229-34.
- HUBER, T. B. & BENZING, T. 2005. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 14, 211-6.
- HUBER, T. B., KOTTGEN, M., SCHILLING, B., WALZ, G. & BENZING, T. 2001. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem*, 276, 41543-6.
- HUBER, T. B., SIMONS, M., HARTLEBEN, B., SERNETZ, L., SCHMIDTS, M., GUNDLACH, E., SALEEM, M. A., WALZ, G. & BENZING, T. 2003. Molecular basis of the functional podocin-nephrin complex: mutations in the NPHS2 gene disrupt nephrin targeting to lipid raft microdomains. *Hum Mol Genet*, 12, 3397-405.
- ICHIMURA, K., KURIHARA, H. & SAKAI, T. 2003. Actin filament organization of foot processes in rat podocytes. *J Histochem Cytochem*, 51, 1589-600.
- JONES, N., BLASUTIG, I. M., EREMINA, V., RUSTON, J. M., BLADT, F., LI, H., HUANG, H., LAROSE, L., LI, S. S., TAKANO, T., QUAGGIN, S. E. & PAWSON, T. 2006. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*, 440, 818-23.
- JONES, N., NEW, L. A., FORTINO, M. A., EREMINA, V., RUSTON, J., BLASUTIG, I. M., AOUDJIT, L., ZOU, Y., LIU, X., YU, G. L., TAKANO, T., QUAGGIN, S. E. & PAWSON, T. 2009. Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1533-43.
- KERJASCHKI, D. 2001. Caught flat-footed: podocyte damage and the molecular bases of focal glomerulosclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, 108, 1583-1587.
- KESTILA, M., LENKKERI, U., MANNIKKO, M., LAMERDIN, J., MCCREADY, P., PUTAALA, H., RUOTSALAINEN, V., MORITA, T., NISSINEN, M., HERVA, R., KASHTAN, C. E., PELTONEN, L., HOLMBERG, C., OLSEN, A. & TRYGGVASON, K. 1998. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, 1, 575-82.
- KRAMER-ZUCKER, A. G., WIESSNER, S., JENSEN, A. M. & DRUMMOND, I. A. 2005. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol*, 285, 316-29.

- KRIZ, W., SHIRATO, I., NAGATA, M., LEHIR, M. & LEMLEY, K. V. 2013. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol*, 304, F333-47.
- KROLEWSKI, A. S. 1999. Genetics of diabetic nephropathy: evidence for major and minor gene effects. *Kidney Int*, 55, 1582-96.
- LAHDENPERÄ, J., KILPELÄINEN, P., LIU, X. L., PIKKARAINEN, T., REPONEN, P., RUOTSALAINEN, V. & TRYGGVASON, K. 2003. Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int*, 64, 404-13.
- LE CLAINCHE, C. & CARLIER, M. F. 2008. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev*, 88, 489-513.
- LEWIS, G. & MAXWELL, A. P. 2014. Risk factor control is key in diabetic nephropathy. *Practitioner*, 258, 13-7, 2.
- LI, C., RUOTSALAINEN, V., TRYGGVASON, K., SHAW, A. S. & MINER, J. H. 2000. CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F785-92.
- LI, H., LEMAY, S., AOUDJIT, L., KAWACHI, H. & TAKANO, T. 2004. SRC-family kinase Fyn phosphorylates the cytoplasmic domain of nephrin and modulates its interaction with podocin. *J Am Soc Nephrol*, 15, 3006-15.
- LI, M. & PEZZOLESI, M. G. 2018. Advances in understanding the genetic basis of diabetic kidney disease. *Acta Diabetol*, 55, 1093-1104.
- LING, E., DANILOV, Y. N. & COHEN, C. M. 1988. Modulation of red cell band 4.1 function by cAMP-dependent kinase and protein kinase C phosphorylation. *J Biol Chem*, 263, 2209-16.
- LIU, G., KAW, B., KURFIS, J., RAHMANUDDIN, S., KANWAR, Y. S. & CHUGH, S. S. 2003. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest*, 112, 209-21.
- MAEDA, S., ARAKI, S., BABAZONO, T., TOYODA, M., UMEZONO, T., KAWAI, K., IMANISHI, M., UZU, T., WATADA, H., SUZUKI, D., KASHIWAGI, A., IWAMOTO, Y., KAKU, K., KAWAMORI, R. & NAKAMURA, Y. 2010. Replication study for the association between four Loci identified by a genome-wide association study on European American subjects with type 1 diabetes and

- susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*, 59, 2075-9.
- MANNO, S., TAKAKUWA, Y. & MOHANDAS, N. 2005. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. *J Biol Chem*, 280, 7581-7.
- MARTIN, C. E. & JONES, N. 2018. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 302.
- MARTINI, S., EICHINGER, F., NAIR, V. & KRETZLER, M. 2008. Defining human diabetic nephropathy on the molecular level: integration of transcriptomic profiles with biological knowledge. *Rev Endocr Metab Disord*, 9, 267-74.
- MARTINI, S., NAIR, V., PATEL, S. R., EICHINGER, F., NELSON, R. G., WEIL, E. J., PEZZOLESI, M. G., KROLEWSKI, A. S., RANDOLPH, A., KELLER, B. J., WERNER, T. & KRETZLER, M. 2013. From single nucleotide polymorphism to transcriptional mechanism: a model for FRMD3 in diabetic nephropathy. *Diabetes*, 62, 2605-12.
- MOOYAART, A. L., VALK, E. J., VAN ES, L. A., BRUIJN, J. A., DE HEER, E., FREEDMAN, B. I., DEKKERS, O. M. & BAELEDE, H. J. 2011. Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabetologia*, 54, 544-53.
- NCD RISK FACTOR COLLABORATION 2016. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet*, 387, 1513-1530.
- NEW, L. A., MARTIN, C. E., SCOTT, R. P., PLATT, M. J., KEYVANI CHAHI, A., STRINGER, C. D., LU, P., SAMBORSKA, B., EREMINA, V., TAKANO, T., SIMPSON, J. A., QUAGGIN, S. E. & JONES, N. 2016. Nephrin Tyrosine Phosphorylation Is Required to Stabilize and Restore Podocyte Foot Process Architecture. *J Am Soc Nephrol*, 27, 2422-35.
- NI, X., JI, C., CAO, G., CHENG, H., GUO, L., GU, S., YING, K., ZHAO, R. C. & MAO, Y. 2003. Molecular cloning and characterization of the protein 4.1O gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary. *J Hum Genet*, 48, 101-6.
- NISHI, H., HASHIMOTO, K. & PANCHENKO, A. R. 2011. Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure*, 19, 1807-15.

- OBENAUER, J. C. 2003. Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Research*, 31, 3635-3641.
- OHLSSON, S. 2018. *Die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten [Dissertation]*, Düsseldorf, Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- PAGTALUNAN, M. E., MILLER, P. L., JUMPING-EAGLE, S., NELSON, R. G., MYERS, B. D., RENNKE, H. G., COPLON, N. S., SUN, L. & MEYER, T. W. 1997. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest*, 99, 342-8.
- PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2019. *Physiologie*, Stuttgart, Thieme.
- PARK, H., KIM, H. J., LEE, S., YOO, Y. J., JU, Y. S., LEE, J. E., CHO, S. I., SUNG, J., KIM, J. I. & SEO, J. S. 2013. A family-based association study after genome-wide linkage analysis identified two genetic loci for renal function in a Mongolian population. *Kidney Int*, 83, 285-92.
- PATEL, A., MACMAHON, S., CHALMERS, J., NEAL, B., BILLOT, L., WOODWARD, M., MARRE, M., COOPER, M., GLASZIOU, P., GROBBEE, D., HAMET, P., HARRAP, S., HELLER, S., LIU, L. S., MANCIA, G., MOGENSEN, C. E., PAN, C. Y., POULTER, N., RODGERS, A., WILLIAMS, B., BOMPOINT, S., DE GALAN, B. E., JOSHI, R., TRAVERT, F. & GRP, A. C. 2008. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 358, 2560-2572.
- PATRAKKA, J. & TRYGGVASON, K. 2007. Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends Mol Med*, 13, 396-403.
- PAVENSTADT, H., KRIZ, W. & KRETZLER, M. 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev*, 83, 253-307.
- PERICO, L., CONTI, S., BENIGNI, A. & REMUZZI, G. 2016. Podocyte-actin dynamics in health and disease. *Nat Rev Nephrol*, 12, 692-710.
- PEZZOLESI, M. G., JEONG, J., SMILES, A. M., SKUPIEN, J., MYCHALECKYJ, J. C., RICH, S. S., WARRAM, J. H. & KROLEWSKI, A. S. 2013. Family-based association analysis confirms the role of the chromosome 9q21.32 locus in the susceptibility of diabetic nephropathy. *PLoS One*, 8, e60301.
- PEZZOLESI, M. G., POZNIK, G. D., MYCHALECKYJ, J. C., PATERSON, A. D., BARATI, M. T., KLEIN, J. B., NG, D. P., PLACHA, G., CANANI, L. H.,

- BOCHENSKI, J., WAGGOTT, D., MERCHANT, M. L., KROLEWSKI, B., MIREA, L., WANIC, K., KATAVETIN, P., KURE, M., WOLKOW, P., DUNN, J. S., SMILES, A., WALKER, W. H., BORIGHT, A. P., BULL, S. B., GROUP, D. E. R., DORIA, A., ROGUS, J. J., RICH, S. S., WARRAM, J. H. & KROLEWSKI, A. S. 2009. Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes. *Diabetes*, 58, 1403-10.
- PUTAALA, H., SAINIO, K., SARIO, H. & TRYGGVASON, K. 2000. Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *J Am Soc Nephrol*, 11, 991-1001.
- PUTAALA, H., SOININEN, R., KILPELAINEN, P., WARTIOVAARA, J. & TRYGGVASON, K. 2001. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet*, 10, 1-8.
- REIDY, K., KANG, H. M., HOSTETTER, T. & SUSZTAK, K. 2014. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest*, 124, 2333-40.
- REISER, J., KRIZ, W., KRETZLER, M. & MUNDEL, P. 2000. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*, 11, 1-8.
- RODEWALD, R. & KARNOVSKY, M. J. 1974. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, 60, 423-33.
- ROSELLI, S., GRIBOUVAL, O., BOUTE, N., SICH, M., BENESSY, F., ATTIE, T., GUBLER, M. C. & ANTIGNAC, C. 2002. Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol*, 160, 131-9.
- ROSELLI, S., HEIDET, L., SICH, M., HENGER, A., KRETZLER, M., GUBLER, M. C. & ANTIGNAC, C. 2004. Early glomerular filtration defect and severe renal disease in podocin-deficient mice. *Mol Cell Biol*, 24, 550-60.
- RUIZ-SÁENZ, A., KREMER, L., ALONSO, M. A., MILLÁN, J. & CORREAS, I. 2011. Protein 4.1R regulates cell migration and IQGAP1 recruitment to the leading edge. *J Cell Sci*, 124, 2529-38.
- RUOTSALAINEN, V., LJUNGBERG, P., WARTIOVAARA, J., LENKKERI, U., KESTILA, M., JALANKO, H., HOLMBERG, C. & TRYGGVASON, K. 1999. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7962-7.

- RUOTSALAINEN, V., PATRAKKA, J., TISSARI, P., REPONEN, P., HESS, M., KESTILA, M., HOLMBERG, C., SALONEN, R., HEIKINHEIMO, M., WARTIOVAARA, J., TRYGGVASON, K. & JALANKO, H. 2000. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am J Pathol*, 157, 1905-16.
- SCHNABEL, E., ANDERSON, J. M. & FARQUHAR, M. G. 1990. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol*, 111, 1255-63.
- SCHWARZ, K., SIMONS, M., REISER, J., SALEEM, M. A., FAUL, C., KRIZ, W., SHAW, A. S., HOLZMAN, L. B. & MUNDEL, P. 2001. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest*, 108, 1621-9.
- SELLIN, L., HUBER, T. B., GERKE, P., QUACK, I., PAVENSTADT, H. & WALZ, G. 2003. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *Faseb j*, 17, 115-7.
- SHERIDAN, D. L., KONG, Y., PARKER, S. A., DALBY, K. N. & TURK, B. E. 2008. Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem*, 283, 19511-20.
- SHIH, N. Y., LI, J., COTRAN, R., MUNDEL, P., MINER, J. H. & SHAW, A. S. 2001. CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol*, 159, 2303-8.
- SHIH, N. Y., LI, J., KARPITSKII, V., NGUYEN, A., DUSTIN, M. L., KANAGAWA, O., MINER, J. H. & SHAW, A. S. 1999. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science*, 286, 312-5.
- TRYGGVASON, K. 1999. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol*, 10, 2440-5.
- TRYGGVASON, K., PATRAKKA, J. & WARTIOVAARA, J. 2006. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med*, 354, 1387-401.
- TRYGGVASON, K., RUOTSALAINEN, V. & WARTIOVAARA, J. 1999. Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney. *Int J Dev Biol*, 43, 445-51.

- TRYGGVASON, K. & WARTIOVAARA, J. 2005. How does the kidney filter plasma? *Physiology (Bethesda)*, 20, 96-101.
- VERMA, R., KOVARI, I., SOOFI, A., NIHALANI, D., PATRIE, K. & HOLZMAN, L. B. 2006. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest*, 116, 1346-59.
- VERMA, R., WHARRAM, B., KOVARI, I., KUNKEL, R., NIHALANI, D., WARY, K. K., WIGGINS, R. C., KILLEN, P. & HOLZMAN, L. B. 2003. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem*, 278, 20716-23.
- WANG, J., SONG, J., AN, C., DONG, W., ZHANG, J., YIN, C., HALE, J., BAINES, A. J., MOHANDAS, N. & AN, X. 2014. A 130-kDa protein 4.1B regulates cell adhesion, spreading, and migration of mouse embryo fibroblasts by influencing actin cytoskeleton organization. *J Biol Chem*, 289, 5925-37.
- WILLIAMS, W. W., SALEM, R. M., MCKNIGHT, A. J., SANDHOLM, N., FORSBLOM, C., TAYLOR, A., GUIDUCCI, C., MCATEER, J. B., MCKAY, G. J., ISAKOVA, T., BRENNAN, E. P., SADLER, D. M., PALMER, C., SODERLUND, J., FAGERHOLM, E., HARJUTSALO, V., LITHOVIUS, R., GORDIN, D., HIETALA, K., KYTO, J., PARKKONEN, M., ROSENGARDBARLUND, M., THORN, L., SYREENI, A., TOLONEN, N., SARAHEIMO, M., WADEN, J., PITKANIEMI, J., SARTI, C., TUOMILEHTO, J., TRYGGVASON, K., OSTERHOLM, A. M., HE, B., BAIN, S., MARTIN, F., GODSON, C., HIRSCHHORN, J. N., MAXWELL, A. P., GROOP, P. H., FLOREZ, J. C. & CONSORTIUM, G. 2012. Association testing of previously reported variants in a large case-control meta-analysis of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 61, 2187-94.
- WOLF, G. & STAHL, R. A. 2003. CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet*, 362, 1746-8.
- WOLF, G. & ZIYADEH, F. N. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol*, 106, p26-31.
- YU, S. M., NISSAISORAKARN, P., HUSAIN, I. & JIM, B. 2018. Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach. *Front Med (Lausanne)*, 5, 221.
- ZOUNGAS, S., ARIMA, H., GERSTEIN, H. C., HOLMAN, R. R., WOODWARD, M., REAVEN, P., HAYWARD, R. A., CRAVEN, T., COLEMAN, R. L. & CHALMERS, J. 2017. Effects of intensive glucose control on microvascular

outcomes in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis of individual participant data from randomised controlled trials. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 5, 431-437.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. L. C. Rump für die Möglichkeit, die wissenschaftlichen Untersuchungen in der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikum Düsseldorf durchführen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. L. Sellin danke ich für die konstruktiven Ideen und Anmerkungen, den stetigen Austausch und die kompetente fachliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. E. Königshausen. Danke für die engagierte, motivierte und verlässliche Anleitung, für die vielen Gespräche und Hilfestellungen. Ich danke Dir dafür, dass Du mir die Freude an der Laborarbeit vermittelt hast, die bis heute anhält!

Für Ihre ausgezeichnete technische Unterstützung, praktische Anleitung im Labor und die sehr angenehme Zusammenarbeit danke ich Fr. B. Duvnjak, Fr. N. Kuhr und Fr. C. Schwandt. Für die bereichernde Zusammenarbeit danke ich allen Mitgliedern der experimentellen Nephrologie, aber insbesondere meinen Mitdoktoranden Hr. L. Heimann und Fr. C. Porwoll.

Naida Bajraktarevic, Nikolas Spindler und Ajdin Pajevic danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit, die hilfreichen Korrekturen und die moralische Unterstützung.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Azemina und Nezir Bajraktarevic für ihre liebevolle Unterstützung und ihr Verständnis. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet.