

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump

Charakterisierung von Protein 4.1O als Expressionsprodukt
eines Kandidatengens für diabetische Nephropathie
unter Berücksichtigung
seiner posttranslationalen Modifikationen sowie
des Interaktionsverhaltens mit podozytären Proteinen

Dissertation

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

vorgelegt von
Sonja Rieckmann

2025

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

Was immer du tun kannst oder erträumst zu können, fange damit an.

Johann Wolfgang von Goethe

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie stellt in Industrienationen die führende Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit dar und steigert signifikant die Gesamtmortalität von Patienten mit Diabetes mellitus. Genomweite Assoziationsstudien identifizierten einen Zusammenhang zwischen der Auftretenswahrscheinlichkeit des renalen Endorganschadens und dem Vorkommen bestimmter Genvarianten mit der höchsten Odds Ratio für einen SNP in der Nähe des 5'-Endes von FRMD3. Dessen Genprodukt, 4.1O, ist ein Mitglied der Proteinfamilie 4.1 mit podozytärem Vorkommen. Es zeigt im Tiermodell eine physiologische Relevanz für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere, da es als Adapterprotein einige Komponenten der Schlitzmembran, unter ihnen Nephrin als deren Hauptstrukturelement, mit dem Aktin-Zytoskelett verbindet. Damit weist es eine funktionelle Ähnlichkeit zu Proteinen der Nck-Familie auf, die gut untersuchte Linkerproteine des Podozyten darstellen.

Zur weiteren Charakterisierung des Interaktions- und Bindungsverhaltens von Protein 4.1O sowie dessen posttranslationalen Modifikationen unter hyperglykämischen Bedingungen wurden (Co-)Immunpräzipitationen mit anschließendem Western Blotting durchgeführt. Als Expressionstool dienten transient transfizierte HEK 293T Zellen.

Nach Modifikation des Standard-Co-IP-Protokolls im Sinne eines zusätzlichen Preclearings durch Ultrazentrifugation wurden die Erkenntnisse rezenter Arbeiten zur Interaktion von 4.1O mit den podozytären Proteinen GLEPP1, IQGAP1 und Nephrin in optimierter Abbildungsqualität verifiziert und die vorbeschriebene Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin weiter eingegrenzt. Zudem wurde nachgewiesen, dass NCK2 konzentrationsabhängig die 4.1O/Nephrin-Interaktion schwächt und dass 4.1O vice versa bei Anlagerung an Nephrin dessen interaktionsrelevante Phosphorylierung an den NCK2-Bindungsstellen Y1176/1193 und Y1217 reduzieren kann. In einem ergänzenden Hyperglykämie-Modell ergab sich kein Effekt einer erhöhten Glukosekonzentration auf die Phosphorylierung der posttranslational modifizierbaren Threonine von Protein 4.1O, während eine (nicht signifikante) osmotisch bedingte Abnahme der Tyrosinphosphorylierung gezeigt werden konnte.

In Zusammenschau illustrieren die Daten v. a. eine primär über Phosphorylierung regulierte Konkurrenz der beiden strukturell, sowie funktionell ähnlichen Adapterproteine 4.1O und NCK2 um Bindung an die YDxV-Motive von Nephrin. Zellulärer Stress durch Hyperosmolarität, der infolge einer erhöhten Glukosekonzentration entsteht, könnte die 4.1O/Nephrin-Interaktionswahrscheinlichkeit durch 4.1O-Dephosphorylierung reduzieren, vermutlich mit dem Ziel einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts durch bevorzugte Bindung von NCK2 an Nephrin. 4.1O hingegen könnte eher eine Bedeutung im Steady State des Podozyten zukommen. Hier sind zusätzliche Funktionsstudien erforderlich, v. a. auch um die Rolle von 4.1O in der diabetischen Nephropathie weiter zu charakterisieren.

Abstract

Diabetic nephropathy is the leading cause of end-stage renal disease requiring dialysis in industrialized nations and significantly increases overall mortality in patients with diabetes mellitus. Genome-wide association studies identified a connection between the probability of renal end-organ damage and the incidence of certain gene variants with the highest odds ratio for a SNP near the 5' end of FRMD3. Its gene product 4.1O is a member of the 4.1 protein family which occurs in podocytes. In animal models, it shows a physiological relevance for the integrity of the glomerular filtration barrier because it works as an adapter protein connecting some components of the slit diaphragm, including nephrin as its main structural element, with the actin cytoskeleton. It is functionally similar to proteins of the nck family, which are well-studied linker proteins of the podocyte.

For further characterization of the interaction and binding behavior of protein 4.1O and its post-translational modifications under hyperglycemic conditions, (co-)immunoprecipitation followed by Western blotting were performed. Transiently transfected HEK 293T cells served as expression tools.

After modifying the standard co-IP protocol by adding a preclearing step consisting of ultracentrifugation, the findings of recent work on the interaction between 4.1O and the podocytic proteins GLEPP1, IQGAP1 and nephrin were verified in optimized figure quality and the previously described interaction domain of 4.1O with nephrin was narrowed down more precisely. It was also demonstrated that nck2 weakens the 4.1O/nephrin interaction in a concentration-dependent manner and that conversely, when attached to nephrin, 4.1O can reduce its interaction-relevant phosphorylation at the nck2 binding sites Y1176/1193 and Y1217. In a supplementary hyperglycemia model, there was no effect of increased glucose concentration on the phosphorylation of the post-translationally modifiable threonines of protein 4.1O, while a (non-significant) osmotically induced decrease in tyrosine phosphorylation was shown.

Taken together, these data illustrate a competition between the two structurally and functionally similar adapter proteins 4.1O and nck2 for binding to the YDxV motifs of nephrin, which is primarily regulated by phosphorylation. Cellular stress due to hyperosmolarity, resulting from increased glucose concentration, could reduce the 4.1O/nephrin interaction probability through 4.1O dephosphorylation, presumably aiming a reorganization of the actin cytoskeleton through preferential binding of nck2 to nephrin. On the other hand, 4.1O could be more important in the steady state of the podocyte. Additional functional studies are required here, especially concerning the role of 4.1O in diabetic nephropathy.

Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knockout
(Co-)IP	(Co-)Immunpräzipitation
α	Signifikanzniveau
4.1	Bande-4.1-Protein
4.1B	Protein 4.1 Brain Type
4.1G	Protein 4.1 General Type
4.1N	Protein 4.1 Neuronal Type
4.1O	Protein 4.1 Ovary Type
4.1R	Protein 4.1 Erythrocyte Type
A	Adenin
AA	Aminosäuren
Abb	Abbildung
ACE	Angiotensin I Converting Enzyme
ACR	Albumin-Kreatinin-Ratio
AKR1B1	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B
ANOVA	Analysis of Variance
APOC1	Apolipoprotein C1
APOE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arp2/3	Actin-related Proteins 2/3
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
Ca	Calcium
CARS	Cysteinyl-tRNA-Synthetase
CD	Cluster of Differentiation
CD2AP	CD2 Associated Protein
cDNA	Komplementäre DNA
CHN2	Chimerin 2
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CPVL	Carboxypeptidase Vitellogenic Like
CTD	C-terminale Domäne
D	Asparaginsäure
d	Durchmesser
DAG	1,2-Diacylglycerin
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
ddH₂O	Doppelt-destilliertes Wasser

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPB41	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1
EPO	Erythropoetin
ERK2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2
ESRD	End Stage Renal Disease
F	FLAG [®]
F	Phenylalanin
f	Frequenz
FA	FERM Adjacent
Fc	Fragment Crystallisable
FCS	Fetales Kälberserum
FERM	4.1/Ezrin/Radixin/Moesin
FP	Forward Primer
FRMD3	FERM Domain Containing 3
FSP	Forward Sequencing Primer
G	Guanin
G	Grade
g	G-Zahl
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
gDNA	Genomische DNA
GFP	Grün-fluoreszendierendes Protein
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLEPP1	Glomerular Epithelial Protein 1
GREM1	Gremlin 1
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEBS	HEPES-buffered Saline
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
HSD	Honestly Significant Difference
HSPG2	Heparan Sulfate Proteoglycan 2

I	Stromstärke
IgG	Immunglobulin G
IQGAP1	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein 1
K	Lysin
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
K_d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LB	Lysogeny Broth
LMA	Low Melting Agarose
MAGI	Membrane-associated Guanylate Kinase
MAP4K4	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase Kinase Kinase 4
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Mb	Megabase
Mg	Magnesium
mM	Millimol
moe	Mosaic Eyes
mRNA	Messenger-RNA
n	Anzahl der Versuchsdurchführungen
N-WASP	Neurales Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NC	Nitrocellulose
NCK	Non-catalytic Region of Tyrosine Kinase
NEPH1	Nephrin-like Protein 1
NIK	NCK-interacting Kinase
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3
OR	Odds Ratio
ORF	Open Reading Frame
p	p-Wert
P	Prolin
p	p-Arm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Par-3/Par-6	Partitioning Defective Protein 3/6
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Potential of Hydrogen

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
q	q-Arm
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RCF	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse Primer
RPKM	Reads per Kilobase of Transcript per Million Mapped Reads
rpm	Rounds per Minute
rs	Reference SNP Cluster ID
RSP	Reverse Sequencing Primer
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SAB	Spectrin/Actin binding
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFK	Src Family Kinase
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
SH2/SH3	Src Homology 2/3
slg	Surface Immunoglobuline
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Ste20	Sterile 20
supF	Supressor F
SV2B	Synaptic Vesicle Protein 2B
SV40	Simian Vacuolating Virus 40
T	Threonin
t	Zeit
T4	Type 4
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tbl	Tablette
TC	Tissue Culture
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
tRNA	Transfer-RNA
TRPC6	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 6
U	Spannung

U	Unit
U1/U2/U3	Unique 1/2/3
UNC13B	Unc-13 Homolg B
V	Valin
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
VLE-DMEM	Very Low Endotoxin DMEM
w/o	Without
WT1	Wilms-Tumorsuppressor 1
Y	Tyrosin
ZO-1	Zonula occludens 1
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetische Nephropathie als Hauptursache für ESRD	1
1.1.1	Epidemiologische Einordnung	1
1.1.2	Genetische Suszeptibilität für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie	1
1.2	Proteinfamilie 4.1 und ihre Funktion als Membran-Zytoskelett-Linker	2
1.2.1	4.1R und seine paraloge Proteine	2
1.2.2	Schematischer Aufbau der 4.1.-Proteine	3
1.2.3	Funktion von Protein 4.1R – dem Prototyp einer Proteinfamilie	4
1.3	Protein 4.1O – bisherige Erkenntnisse	5
1.3.1	Isoformen von Protein 4.1O	5
1.3.2	Protein-Protein-Interaktionen von 4.1O und ihre Regulation	6
1.3.3	Bedeutung von Protein 4.1O <i>in vivo</i> – Tiermodell <i>Danio rerio</i>	6
1.4	Proteinurie als Folge eines glomerulären Schadens	7
1.4.1	Anatomie des glomerulären Filters	7
1.4.2	Proteine der glomerulären Schlitzmembran	8
1.4.2.1	Extrazelluläre Komponenten der glomerulären Schlitzmembran	8
1.4.2.2	Scaffold-Proteine als Crosslinker zwischen glomerulärer Schlitzmembran und podozytarem Zytoskelett	9
1.4.3	Signaltransduktion an der glomerulären Schlitzmembran	10
1.4.3.1	Steuerung der Aktin-Reorganisation und -Polymerisation durch Nephrin-Tyrosinphosphorylierung	10
1.4.3.2	Nephrin-Y1193 als Sensor für die Intaktheit der glomerulären Schlitzmembran	11
1.4.4	Einfluss von Hyperglykämie auf die Integrität der glomerulären Schlitzmembran	12
1.4.4.1	Chronische vs. akute Hyperglykämie – verschiedene Mechanismen der Nephrin-Depletion	12
1.4.4.2	Hyperglykämie und Protein 4.1O – bisherige Erkenntnisse	12
1.5	Zielsetzung der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien & Gebrauchsgegenstände	16

2.1.3	Chemikalien/Reagenzien.....	17
2.1.4	Gele, Puffer und Lösungen.....	19
2.1.5	Fertigsysteme (kommerzielle Kits)	21
2.1.6	Zellen und Bakterien.....	22
2.1.7	Nährmedien	22
2.1.8	Antikörper	23
2.1.8.1	Primär-Antikörper.....	23
2.1.8.2	Sekundär-Antikörper	23
2.1.9	Primer	24
2.1.10	Plasmide	24
2.1.11	Enzyme.....	25
2.1.12	Software	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Zellkultur	26
2.2.1.1	Kultivierung der Zelllinie HEK 293T	26
2.2.1.2	Aussaat der HEK 293T Zellen	27
2.2.1.3	Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode	27
2.2.1.4	Zellernte und -lyse	27
2.2.2	Proteinisolierung und -analyse	28
2.2.2.1	(Co-)Immunpräzipitation	28
2.2.2.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	29
2.2.2.3	Western Blot	29
2.2.2.4	Dot Blot	30
2.2.2.5	Immundetektion	31
2.2.2.6	Densitometrie und statistische Auswertung	32
2.2.3	DNA-Klonierung und -Amplifikation	33
2.2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.2.3.3	DNA-Extraktion	34
2.2.3.4	Präparativer Restriktionsenzymverdau.....	35
2.2.3.5	Ligation	35
2.2.3.6	Transformation chemisch-kompetenter E. coli Stämme	36
2.2.3.7	Kultivierung transformierter Bakterien	37
2.2.3.8	Plasmid-Präparation	37
2.2.3.9	Diagnostischer Restriktionsenzymverdau.....	38
2.2.4	RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	39
2.2.4.1	RNA-Präparation	39
2.2.4.2	Reverse Transkription.....	40

3	Ergebnisse	42
3.1	Methodische Optimierung.....	42
3.1.1	Clearing von Zelllysaten mittels Ultrazentrifugation verbessert die Co-IP- Probenqualität und reduziert unspezifische Banden im Western Blot.....	42
3.1.1.1	Protein 4.1O interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil von GLEPP1.....	42
3.1.1.2	Protein 4.1O interagiert mit IQGAP1	44
3.1.1.3	Protein 4.1O interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil von Nephrin	44
3.1.1.4	Nephrin AA 1158-1190 enthält die 4.1O-Interaktionsdomäne	45
3.2	Interaktionsstudien	46
3.2.1	Protein 4.1O AA 484-553 enthält die Nephrin-Interaktionsdomäne	46
3.2.1.1	Protein 4.1O AA 506-553 ist nach Transfektion in HEK 293T Zellen auf mRNA- Ebene, nicht aber auf Protein-Ebene nachweisbar	48
3.2.2	NCK2 beeinflusst konzentrationsabhängig die 4.1O/Nephrin-Interaktion	51
3.3	Phosphorylierungsuntersuchungen	54
3.3.1	Protein 4.1O beeinflusst die Nephrin-Phosphorylierung an den NCK2- Bindungsstellen Y1176/1193 und Y1217 nur in Anwesenheit der Interaktionsdomäne AA 484-553	54
3.3.2	Hohe Glukosekonzentrationen beeinflussen durch die resultierende Hyperosmolarität die Tyrosin- und die Threonin-Phosphorylierung von Protein 4.1O nicht signifikant.....	56
4	Diskussion	58
4.1	Diskussion der Methodik und ihrer Optimierung.....	58
4.1.1	Zelllinie HEK 293T als Expressionstool.....	58
4.1.2	Co-Immunpräzipitation/Western-Blot Assay	59
4.1.2.1	<i>High Background Troubleshooting</i> – Clearing durch Ultrazentrifugation.....	60
4.2	Diskussion der Interaktions- und Phosphorylierungsergebnisse.....	63
4.2.1	Eingrenzung der Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin.....	63
4.2.2	Konkurrenz von 4.1O und NCK2 um Nephrin als Bindungspartner	64
4.2.3	Einfluss von Hyperglykämie und Hyperosmolarität auf den Phosphorylierungsstatus von Protein 4.1O	67
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	70

1 Einleitung

1.1 Diabetische Nephropathie als Hauptursache für ESRD

1.1.1 Epidemiologische Einordnung

Die diabetische Nephropathie stellt in Industrienationen die häufigste Ursache für eine dialysepflichtige Niereninsuffizienz dar (1) und steigert signifikant die Gesamtmortalität von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern (2, 3). Damit ist sie die klinisch und sozioökonomisch relevanteste mikrovaskuläre Komplikation von Diabetes mellitus Typ 1 und 2.

Die Lebenszeitprävalenz für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus beträgt 25-30 % (4). Circa 15 Jahre nach Diagnosestellung lässt sich bei 20-30 % der Typ 1 Diabetiker eine Mikroalbuminurie nachweisen, gut ein Fünftel der Typ 2 Diabetiker erfüllt schon bei Erstdiagnose der Stoffwechselerkrankung auch die diagnostischen Kriterien einer diabetischen Nephropathie (5).

Sequist et al. zeigten 1989, dass eine diabetische Nephropathie in familiären Clustern auftritt und dass das Vorkommen von Nierenerkrankungen bei nahen Verwandten den stärksten Prädiktor für das Auftreten einer Diabetes-assoziierten Nephropathie darstellt (6). Andere Studien konnten darüber hinaus signifikante Prävalenzunterschiede für eine diabetische Nephropathie zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen nachweisen (7) und gaben epidemiologische Hinweise darauf, dass Typ 1 Diabetiker entweder innerhalb der ersten 15 Jahre ihrer Erkrankung eine renale Organkomplikation entwickeln oder vor ihr geschützt zu sein scheinen (8). Diese Daten führten zu der Hypothese, dass es eine genetische Komponente in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie gibt.

1.1.2 Genetische Suszeptibilität für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie

671 genetische Assoziationsstudien identifizierten 21 Genvarianten, die in Random-Effects-Metaanalysen signifikant mit dem Auftreten einer diabetischen Nephropathie assoziiert waren (9). Diese Varianten sind in oder in der Nähe der Gene *ACE* (*Angiotensin I Converting Enzyme*), *AKR1B1* (*Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B*), *APOC1* (Apolipoprotein C1), *APOE* (Apolipoprotein E), *EPO* (Erythropoetin), *NOS3* (*Nitric Oxide*

Synthase 3), HSPG2 (*Heparan Sulfate Proteoglycan 2*), VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor A*), FRMD3 (*FERM Domain Containing 3*), CARS (*Cysteinyl-tRNA-Synthetase*), UNC13B (*Unc-13 Homolog B*), CPVL (*Carboxypeptidase Vitellogenic Like*), CHN2 (*Chimerin 2*) und GREM1 (*Gremlin 1*) lokalisiert oder liegen außerhalb codierender DNA-Bereiche (9). Unter ihnen finden sich Polymorphismen mit möglicherweise pathophysiologisch relevanter Assoziation zum RAAS-System, dem Polyol-Signalweg, dem Lipidmetabolismus sowie oxidativem Stress, Inflammation, Neoangiogenese, Zellapoptose und -differenzierung und der Assemblierung des glomerulären Filters (9).

Pezzolesi et al. zeigten 2009 in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) mit kaukasischen Typ 1 Diabetikern, dass es eine Häufung von signifikant mit diabetischer Nephropathie assoziierten *Single Nucleotide Polymorphism* (SNPs) in Genen gibt, die für Proteine mit FERM(4.1/Ezrin/Radixin/Moesin)-Domänen codieren (10). Hierbei handelt es sich um typischerweise N-terminal gelegene Module (11), die als Linker-Domänen für Zellmembran-Proteine an das Aktin-Zytoskelett fungieren und damit eine integrale Rolle im Erhalt der Zellintegrität innehaben (12).

Die stärkste Assoziation für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie fand sich für den SNP rs10868025 (OR = 1.45, $p = 5 * 10^{-7}$), der eine A→G-Nukleotidsubstitution an Position 85.4 (Mb) des langen Arms von Chromosom 9 vermittelt (10). Er ist damit in unmittelbarer Nähe zum 5'-Ende des FRMD3-Gens (9q21.32) lokalisiert (10), das für Protein 4.1O, ein Mitglied der Proteinfamilie 4.1, codiert (13). Diese Daten machen FRMD3 zu einem der aktuell bedeutendsten Kandidatengene für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie in Typ 1 Diabetikern (14) und sein Genprodukt 4.1O zu einem möglichen neuen Ansatzpunkt auf dem Weg zu einem molekularen Krankheitsverständnis.

1.2 Proteinfamilie 4.1 und ihre Funktion als Membran-Zytoskelett-Linker

1.2.1 4.1R und seine paralogen Proteine

Yu et al. gelang 1973, im Rahmen der gelelektrophoretischen Auftrennung von in Lösung gebrachten Komponenten der humanen Erythrozytenmembran, der Nachweis eines bis dato unbekanntes Proteins, das nach seiner SDS-Gelbande als *band 4.1 protein* benannt wurde (15).

Im Verlauf konnten, ausgehend von dem Prototyp 4.1R (*red blood cell*), in Vertebraten außerdem noch 4.1N (*neuron type*), 4.1G (*general type*), 4.1B (*brain type*) und 4.1O (*ovary type*) als weitere, paraloge Proteine identifiziert werden (16). Die hierfür codierenden Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen (4.1R: 1p33–p34.2 (17), 4.1N: 20q11.2–q12 (18), 4.1G: 6q22–q23 (19), 4.1B: 18p11.32 (16), 4.1O: 9q21.32 (14)) und haben spezifische Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben und Organen. 4.1R kommt primär in Knochenmark, Zerebellum, Lunge, Hoden und Thymus vor, 4.1G v. a. in Zerebrum, Rückenmark und Gonaden, 4.1N in Gehirn, Rückenmark und Nebennieren und 4.1B in Gehirn, Rückenmark und Nieren (20).

1.2.2 Schematischer Aufbau der 4.1.-Proteine

Gemeinsamkeit aller 4.1-Proteine ist die in Abb. 1 schematisch dargestellte Gliederung in funktionelle Domänen mit einer N-terminal gelegenen *unique domain* U1 (*headpiece*), gefolgt von der FERM-Domäne, der FA(*FERM adjacent*)-Domäne, der zweiten *unique domain* U2, der SAB(*spectrin/actin binding*)-Domäne, einer weiteren *unique domain* U3 und der Carboxy-terminalen Domäne CTD (21).

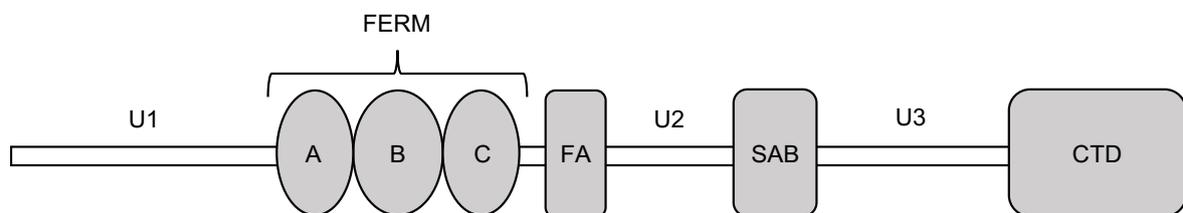


Abb. 1: Domänenstruktur der 4.1-Proteine. Alle Vertreter der 4.1-Familie stimmen in ihrem schematischen Aufbau überein, von N- nach C-terminal bestehend aus den Domänen U1 (*unique domain 1*), FERM (*4.1 protein/ezrin/radixin/moesin domain*), FA (*FERM adjacent domain*), U2 (*unique domain 2*), SAB (*spectrin/actin binding domain*), U3 (*unique domain 3*) und CTD (*C-terminal domain*). Modifiziert nach (22).

Die FERM-Domäne ist aufgrund ihrer funktionellen Relevanz für das Membran-Zytoskelett-Crosslinking die am stärksten konservierte Domäne mit geringen interspeziesunterschieden in der Primärstruktur und einer Aminosäure-Sequenzhomologie von 72-81 % (21) zwischen den verschiedenen Mitgliedern der 4.1-Proteinfamilie im Menschen (22). Kristallstrukturanalysen identifizierten drei Subdomänen (*Lobe A, B und C*),

die eine Kleeblatt-ähnliche Struktur ausbilden (23) und jeweils unterschiedliche Bindungsmotive für die Interaktion mit Membranproteinen aufweisen (24, 25). Für 4.1R ist beschrieben, dass die FERM-Domäne reguliert wird durch alternatives Spleißen (26), die Ca^{2+} /Calmodulin-Bindestelle der *headpiece*-Region (27) und den Phosphorylierungsstatus der FA-Domäne (28), deren Serinreste S312 und S331 den Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC) als Substrate dienen (29).

Die SAB-Domäne der 4.1-Familie, mit Ausnahme von Protein 4.1N (30), bindet Spectrin und Actin und ist aufgrund dessen als Linker-Domäne ebenfalls hoch konserviert (31). Sequenzalignments von humanem 4.1R, 4.1G und 4.1B ergeben eine Homologie von 53-66 % für diese Domäne (21).

Weiter Carboxy-terminal schließt sich die CTD an, in der sich die 4.1-Proteine relevant voneinander unterscheiden (32). Sie interagiert ebenfalls mit einer Vielzahl verschiedener Proteine (33).

Die große strukturelle Ähnlichkeit innerhalb der 4.1-Proteinfamilie und die hohe Sequenzhomologie, insbesondere der funktionell relevanten FERM- und SAB-Domänen, legt nahe, dass die paralogen Proteine 4.1G, 4.1N, 4.1B und auch 4.1O *in vivo* gewebsspezifisch an ähnlichen molekularen Prozessen beteiligt sind, wie das im Erythrozytenmodell bereits gut charakterisierte Protein 4.1R (34).

1.2.3 Funktion von Protein 4.1R – dem Prototyp einer Proteinfamilie

Feo et al. gelang 1980 erstmalig der Nachweis einer Assoziation von 4.1R-Defizienz und hereditärer Elliptozytose (35), einer genetisch bedingten hämolytischen Anämie, die auf einem aberranten horizontalen Erythrozytenskelett mit konsekutiv verminderter Membranstabilität beruht.

Hiervon ausgehende Funktionsstudien, *in vitro* und *in vivo*, identifizierten Protein 4.1R als Hauptstrukturelement des erythrozytären Membranskeletts und belegten seine Relevanz für den Erhalt der Zellintegrität mit Daten, die es als Adapterprotein zwischen multiplen Transmembranproteinen und dem Spectrin/Actin-Zytoskelett identifizierten (36).

Mutationen im 4.1R-codierenden EPB41-Gen, die zu quantitativen Proteindefekten führen, bedingen gleichzeitig auch ein signifikant vermindertes Vorkommen verschiedener erythrozytärer Membranproteine, u. a. Glycophorin C (37), CD44, CD47 (38) und DARC (*Duffy antigen/receptor for chemokines*) (39). 4.1R trägt also nicht nur zur mechanischen Zellstabilität bei, sondern ist auch essentiell für das zelluläre Signaling, indem es die Signalmoleküle korrekt an der Zelloberfläche verankert und lokal akkumuliert (22).

Die Funktion von Protein 4.1R im Erythrozyten wird über mehrere Mechanismen reguliert, die entweder seine Bindung an das Zytoskelett oder an die Membranproteine beeinflussen. In Anwesenheit von Ca^{2+} reduziert Calmodulin die Affinität von Protein 4.1R zum Spectrin/Actin-Komplex (40) und schwächt damit die Membranstabilität. Gleiche Effekte hat eine vermehrte Proteinphosphorylierung (41), die über verschiedene Tyrosinkinase-Familien sowie PKA und PKC vermittelt wird (42, 43). Zudem moduliert die Anlagerung von PIP_2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphonat) an die FERM-Domäne von 4.1R die Interaktion mit den Membranproteinen (44).

Obwohl 4.1R hauptsächlich als erythrozytäres Linker-Protein charakterisiert wurde, belegen tierexperimentelle Daten auch eine Funktion außerhalb des hämatopoetischen Systems, z. B. im Reizleitungssystem des Kardiomyozyten (45) oder in der Migration und Adhäsion von Keratinozyten im Rahmen der Wundheilung (46).

1.3 Protein 4.1O – bisherige Erkenntnisse

1.3.1 Isoformen von Protein 4.1O

Ni et al. gelang es 2002, ein bis dahin nicht beschriebenes Mitglied der Proteinfamilie 4.1 zu identifizieren, indem sie mithilfe einer cDNA-Bibliothek aus fetaler mRNA zerebralen Ursprungs, erstmalig das FRMD3-Gen als Teil des humanen Transkriptoms detektierten (13). Es besteht aus 22 Exons (47), aus denen durch alternatives Spleißen fünf Isoformen des Genproduktes 4.1O generiert werden können (48, 49), die sich in der Länge ihrer Primärsequenz voneinander unterscheiden. Die längste Isoform 1 besteht aus 597 Aminosäureresten, die von Ni *et al.* charakterisierte Isoform 5 aus 553 Aminosäureresten. Sie unterscheiden sich in den ersten 49 Aminosäureresten von Exon 1 (MFASCHCVPRGRRTMKMIHFRSSSVKLSLSQEMRCTIRLLDDSEISCHIQ→MQLSK) (50). Im Jahr 2002 gelang im adulten Organismus zunächst nur der 4.1O-Expressionsnachweis für das Ovar (13). Inzwischen konnten Isoformen von 4.1O aus mehr als 20 humanen Geweben isoliert werden, wobei sich die größte Expressionsstärke in Herz (RPKM $6,181 \pm 2,684$) und Nieren (RPKM $3.833 \pm 0,32$) fand (51). In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde erstmalig ein podozytäres Vorkommen der Isoformen 1 und 5 auf mRNA- und Proteinebene bewiesen. Dabei zeigte sich die Kürzere der beiden Splice-Varianten stärker exprimiert (52), was die Isoform 5 von Protein 4.1O zum Zielprotein dieser Arbeit werden ließ.

1.3.2 Protein-Protein-Interaktionen von 4.1O und ihre Regulation

Analog zu der Funktion von Protein 4.1R im Erythrozyten, konnte durch die eigene Arbeitsgruppe auch für 4.1O eine Rolle als Membran-Zytoskelett-Crosslinker identifiziert werden. In Pulldown-Experimenten bzw. Co-Immunpräzipitationsversuchen gab es Hinweise auf eine Interaktion von 4.1O sowohl mit Aktin, einer Komponente des Zytoskeletts, als auch mit den podozytären Proteinen GLEPP1 (*Glomerular Epithelial Protein 1*), IQGAP1, NEPH1 und Nephrin, dem Hauptstrukturelement des glomerulären Filters (52). Die für die 4.1O/Nephrin-Interaktion relevanten Domänen sind für beide Proteine als weit C-terminal liegend (Nephrin AA 1158-1190, 4.1O AA 506-553) vorbeschrieben (52).

Reguliert wird die Interaktion von 4.1O mit Nephrin durch posttranslationale chemische Modifikation von 4.1O im Sinne einer Phosphorylierung der Aminosäurereste T521 und Y529, die von Tyrosinkinasen der Src-Familie und den MAP-Kinasen ERK2 und p38 katalysiert wird. Der Einsatz von Kinaseinhibitoren führt *in vitro* zu einer reduzierten Protein-Protein-Interaktion von 4.1O und Nephrin (53).

1.3.3 Bedeutung von Protein 4.1O *in vivo* – Tiermodell *Danio rerio*

Die Larven des Zebrafischlings (*Danio rerio*) stellen, aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit ihrer Pronephrone mit den Nephronen des Menschen, ein etabliertes Tiermodell für Studien zur Nierenphysiologie und -pathophysiologie dar (54).

Jensen und Westerfield wiesen 2004 nach, dass *mosaic eyes (moe)*, ein Protein der FERM-Familie, im Zebrafisch-Podozyten exprimiert wird und, insbesondere N-terminal, eine hohe Sequenzhomologie mit dem humanen Protein 4.1O aufweist (55).

Moe^{-/-} Larven von *Danio rerio* entwickeln phänotypisch Dottersacködeme sowie Perikardergüsse und zeigen glomerulär elektronenmikroskopisch einen Verlust der regulären Schlitzmembranformation mit konsekutiv renalem Proteinverlust (56). In Rescue-Experimenten lässt sich die Selektivität des glomerulären Filters durch Injektion der für die Interaktion mit Nephrin relevanten Carboxy-terminalen Domäne des humanen 4.1O wiederherstellen (53).

Diese Daten belegen eine hohe funktionelle Relevanz von *moe* für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran im Zebrafisch und führen zu der Frage nach der pathophysiologischen Einordnung von Protein 4.1O in etablierte Proteinurie-Modelle des Menschen.

1.4 Proteinurie als Folge eines glomerulären Schadens

1.4.1 Anatomie des glomerulären Filters

Eines der Kardinalsymptome von Nierenerkrankungen und gleichzeitig auch der stärkste Prädiktor für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse ist eine Proteinurie (57), deren Formen anhand ihres Entstehungsortes in prärenal, glomerulär, tubulointerstitiell und postrenal differenziert werden (58).

Glomeruläre Proteinurie ist die Folge einer pathologischen Veränderung einer oder mehrerer Schichten der glomerulären Filtrationsbarriere, die im physiologischen Zustand durch selektive Permeabilität den Übertritt von Makromolekülen in das Primärfiltrat verhindert (Blut-Harn-Schranke).

Abb. 2 veranschaulicht schematisch den Aufbau des glomerulären Filters aus fenestriertem Endothel mit anliegender Glykokalyx, Basalmembran, Podozyten und glomerulärer Schlitzmembran (59).

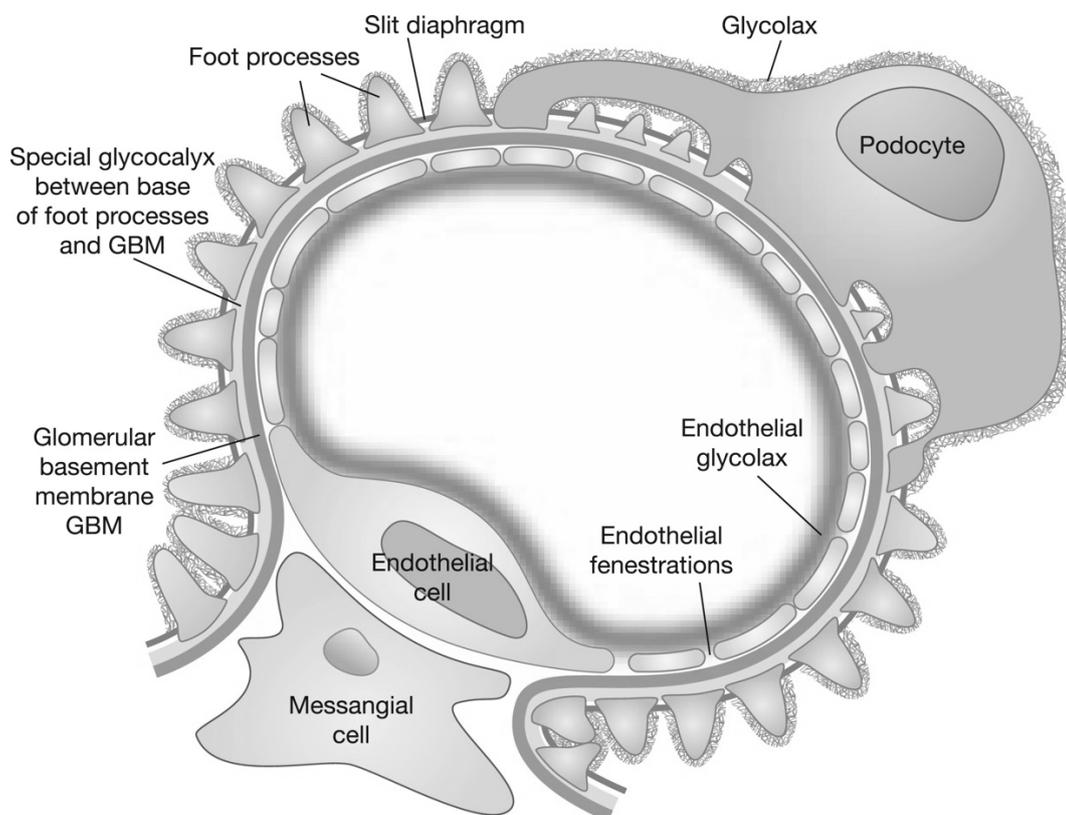


Abb. 2: Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere. Der glomeruläre Filter besteht aus endothelialer Glykokalyx, fenestriertem Endothel, Basalmembran und den Podozyten, deren interdigitierende Fußfortsätze von der glomerulären Schlitzmembran überbrückt werden (59).

Die erste grobe Barriere im Rahmen der Ultrafiltration stellt die endotheliale Glykokalix, ein negativ-geladenes Polysaccharid-Geflecht aus Glykosaminoglykanen, dar. Sie liegt der Zellmembran des fenestrierten Kapillarendothels lumenseitig auf und überbrückt dessen Fenestrae (60). Hieran schließt sich die glomeruläre Basalmembran (GBM) an, deren Grundgerüst, die Lamina densa, v. a. aus Kollagen Typ IV, Laminin und negativ-geladenen Heparansulfat-Proteoglykanen besteht (61). Sie wird flankiert von der Lamina rara interna (in Richtung Endothel) und der Lamina rara externa (in Richtung Podozyten) und vermittelt, neben ihrem Anteil an der Größenselektivität, v. a. die Ladungsselektivität des glomerulären Filters (62).

Podozyten, als letzte Hauptstrukturkomponente, sind hoch dynamische, terminal differenzierte Zellen (63), die über ihre Endverzweigungen an der Harnseite der glomerulären Basalmembran anhaften. Sie übernehmen nicht nur Barrierefunktionen, sondern auch Stützfunktionen und sind maßgeblich am glomerulären Signaling und sich daraus ableitenden Regulationsprozessen beteiligt (64). Benachbarte Podozyten bilden ein Raster aus interdigitierenden Fußfortsätzen, dessen offene Spalten durch die glomeruläre Schlitzmembran überbrückt werden. Diese extrazelluläre Proteinstruktur ähnelt ultrastrukturell einer spezialisierten Adhärensverbindung (65) und stellt den finalen und zugleich feinsten Selektivitätsfilter der Blut-Harn-Schranke dar (66). Sie ist daher von besonderer Relevanz für ein pathophysiologisches Verständnis der Entstehungsmechanismen von Proteinurie.

1.4.2 Proteine der glomerulären Schlitzmembran

1.4.2.1 Extrazelluläre Komponenten der glomerulären Schlitzmembran

Im Jahre 1998 wurde Nephrin von Kestilä et al. als erstes Protein der glomerulären Schlitzmembran identifiziert (67). Es besteht aus einem kurzen cytoplasmatischen Teil, einer einzelnen Transmembrandomäne sowie einer extrazellulären Domäne mit einem Fibronektin-Typ-III- und acht Immunglobulin-ähnlichen Modulen, über die die Nephrinmoleküle benachbarter Podozyten homophile Interaktionen eingehen (68).

Bis heute gilt Nephrin als molekulare Hauptkomponente der glomerulären Schlitzmembran mit besonderer Relevanz u. a. für die Permeabilität der Filtrationsbarriere, für Zell-Zell-Kommunikation, Assemblierung des podozytären Zytoskeletts, Zellmotilität und Zellüberleben (64, 69, 70). Mutationen im codierenden Gen *NPHS1* führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (67) mit schwerster Proteinurie, die sich bereits *in utero* manifestiert (71). Nephrin^{-/-} Mäusen fehlt die glomeruläre

Schlitzmembran mit konsekutiv nephrotischem Phänotyp und einer perinatalen Letalität von 100% innerhalb der ersten 24 h (72).

NEPH1, ein anderes Transmembranprotein der glomerulären Schlitzmembran, weist mit seinen fünf Immunglobulin-ähnlichen Modulen strukturelle Ähnlichkeit zu Nephrin auf (73). Die beiden Proteine bilden gemeinsam cis-heterooligomere Komplexe aus (74).

Weitere Schlitzmembrankomponenten mit extrazellulärer Domäne sind FAT (75), Ephrin-B1 (76), das direkt mit Nephrin interagiert (77), Neurexin (78) und die Rezeptor-ähnliche Tyrosinphosphatase GLEPP1, die regulatorische Funktionen innehat (79).

1.4.2.2 Scaffold-Proteine als Crosslinker zwischen glomerulärer Schlitzmembran und podozytärem Zytoskelett

Die Transmembranproteine der glomerulären Schlitzmembran werden durch zahlreiche zyttoplasmatisch lokalisierte Gerüstproteine mit dem Aktin-Zytoskelett des Podozyten verbunden. Dies schafft nicht nur mechanische Stabilität, sondern ermöglicht auch ein bidirektionales Signaling zwischen Zellinnerem und Extrazellulärraum (80).

Abb. 3 gibt eine Übersicht über einige der physiologischen Protein-Protein-Interaktionen.

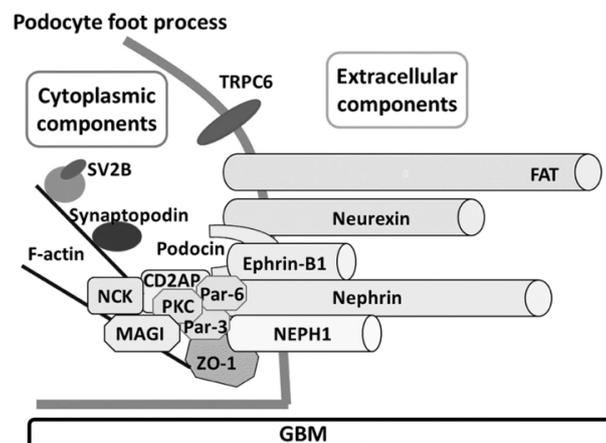


Abb. 3: Extra- und intrazelluläre Komponenten der glomerulären Schlitzmembran. Nephrin, NEPH1, Ephrin-B1, Neurexin und FAT stehen als transmembranäre Proteine mit dem Extrazellulärraum in Verbindung. Sie werden über zahlreiche cytoplasmatisch lokalisierte Scaffold-Proteine, darunter NCK, Podocin, CD2AP, ZO-1, Par-3, Par-6, PKC und MAGI, mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (80). GBM *glomeruläre Basalmembran*, NEPH1 *Nephrin-like protein 1*, NCK *Non-catalytic region of tyrosine kinase*, CD2AP *Cluster of differentiation 2 associated protein*, ZO-1 *Zonula occludens 1*, Par-3/6 *Partitioning defective protein 3/6*, PKC *Proteinkinase C*, MAGI *Membrane-associated guanylate kinase*, TRPC6 *transient receptor potential cation channel subfamily C member 6*, SV2B *Synaptic vesicle glycoprotein 2B*.

Aufgrund ihrer funktionellen Verbindung zu Protein 4.10 sind die Nck(*Non-catalytic region of tyrosine kinase*)-Subfamilie und IQGAP1 (*IQ motif containing GTPase activating protein 1*) als Scaffold-Proteine hervorzuheben (52).

NCK1 und NCK2 werden beide podozytär exprimiert (81) und bestehen aus einer *Src homology 2* (SH2)-Domäne für die Anlagerung an phosphorylierte YDxV-Motive von Nephrin sowie drei SH3-Domänen, über die sie mit Prolin-reichen Motiven multipler Effektorproteine der Zytoskelettorganisation und -regulation interagieren (82). Auf diese Weise kann NCK verschiedene Signalkaskaden mit Relevanz für die Aufrechterhaltung der physiologischen Podozytenmorphie aktivieren (83).

IQGAP1 (*IQ domain GTPase-activating protein 1*) ist im Podozyten v. a. relevant für Zellmigration, Crosslinking zwischen Mikrotubuli und Aktin-Gerüst und Aktin-Remodelling. Es interagiert ebenfalls mit dem Zytoskelett und diversen Komponenten der glomerulären Schlitzmembran, unter ihnen Nephrin und NCK1/2 (84).

1.4.3 Signaltransduktion an der glomerulären Schlitzmembran

1.4.3.1 Steuerung der Aktin-Reorganisation und -Polymerisation durch Nephrin-Tyrosinphosphorylierung

Über den Phosphorylierungsstatus des zytoplasmatischen Teils von Nephrin können intrazelluläre Signalkaskaden reguliert werden, die Einfluss auf Protein-Protein-Interaktionen an der glomerulären Schlitzmembran haben und die Struktur des Aktin-Zytoskeletts verändern können.

Nephrin-Moleküle, die im physiologischen Zustand in Clustern an der Zelloberfläche des Podozyten angeordnet sind, dienen als Substrat für Kinasen der Src-Familie wie Fyn, Lyn und Yes (85).

Eine Phosphorylierung der Tyrosinreste Y1114 und Y1138/1139 induziert eine Interaktion zwischen Nephrin und der regulatorischen p85-Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die daraufhin aktiviert wird und ihrerseits Signalmoleküle phosphoryliert (70). Folge ist eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts mit vermehrtem Vorkommen von Membranausstülpungen, sog. Lamellipodien, und einer Depletion von Stressfasern. Dies ist mit dem Untergang von podozytären Fußfortsätzen assoziiert (86).

Durch Übertragung von Phosphorylgruppen auf die Tyrosinresiduen Y1176, Y1193 und Y1217 (YDxV-Motive) wird die Rekrutierung der Adapterproteine NCK1 und NCK2 gesteigert (87). Auf diese Weise wird Nephrin am Zytoskelett verankert. Gleichzeitig kann aktiviertes NCK über seine SH3-Domäne andere zytoplasmatische Proteine, wie N-WASP

und WIP, binden, die dann einen positiv regulatorischen Effekt auf die Assemblierung des Aktin-Cytoskeletts haben (82). Die Phosphorylierung von Nephrin an Y1176, Y1193 und Y1217 ist somit protektiv für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran und schützt die Podozytenarchitektur in ihrer physiologischen Form. Dies konnte durch New et al. auch im Tiermodell bestätigt werden (88).

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass in Anwesenheit von Protein 4.1O die Phosphorylierung von Nephrin an den Positionen Y1176, Y1193 und Y1217 reduziert und die Interaktion von Nephrin mit NCK2 gehemmt wird (52).

1.4.3.2 Nephrin-Y1193 als Sensor für die Intaktheit der glomerulären Schlitzmembran

Die glomeruläre Schlitzmembran ist eine hochdynamische Struktur mit der Fähigkeit zur schnellen Adaptation an sich verändernde extrazelluläre Einflüsse. Ihre molekulare Zusammensetzung wird reguliert durch die Internalisierung transmembranärer Komponenten via Endozytose, an die sich entweder eine lysosomale Degradation oder eine Rückführung in die Plasmamembran im Sinne eines Recyclings anschließt (89).

Dieser Prozess betrifft insbesondere Nephrin als Hauptstrukturelement. Quack et al. zeigten 2006, dass β -Arrestin die Endozytose von Nephrin vermitteln kann und dass dieser Prozess über den Phosphorylierungsstatus von Nephrin an Y1193 reguliert wird. Die Anwesenheit einer Phosphorylgruppe an der genannten Position inhibiert die Interaktion mit β -Arrestin-2 und stimuliert die Bindung an das Scaffold-Protein Podocin. Damit hat die Y1193-Phosphorylierung einen negativ-regulatorischen Effekt auf die Nephrin-Endozytose und stabilisiert so die glomeruläre Schlitzmembran in ihrer temporären Architektur (90).

Kommt es hingegen zu einer Schädigung des Podozyten, verliert Nephrin seine intrazellulären Kontakte und sein Clustering geht verloren (85). Folge dessen ist eine Dephosphorylierung an Y1193 mit konsekutiver β -Arrestin-2-vermittelter, Clathrin-abhängiger Endozytose von Nephrin (90). Der Tyrosinrest hat damit gleichzeitig auch eine essenzielle Funktion für das podozytäre Sensoring zur Intaktheit der glomerulären Barriere.

1.4.4 Einfluss von Hyperglykämie auf die Integrität der glomerulären Schlitzmembran

1.4.4.1 Chronische vs. akute Hyperglykämie – verschiedene Mechanismen der Nephrin-Depletion

Eine unzureichend eingestellte diabetische Stoffwechsellage mit chronischer Hyperglykämie induziert eine Schädigung des Glomerulums auf allen Ebenen der Filtrationsbarriere mit Endotheldysfunktion, Ladungsverlust der Basalmembran und Podozytenuntergang (91). Klinisches Korrelat dessen ist eine progrediente Albuminurie, die bei diabetischer Nephropathie typischerweise einem GFR-Verlust vorausgeht (92).

Nierenbiopsate von Patienten, die die lichtmikroskopischen Kriterien einer diabetischen Nephropathie erfüllen, zeigen ebenso wie die Glomeruli von Tiermodellen mit renalem Endorganschaden infolge eines Streptozotocin-induzierten Diabetes, eine Depletion von Nephrin (93, 94). Menne et al. beschrieben, dass unter chronischer Einwirkung von Hyperglykämie die Nephrinexpression auf transkriptioneller Ebene supprimiert wird (95). Der zugrundeliegende Mechanismus beruht auf einer vermehrten Aktivität der PKC α , die wiederum WT1 (Wilms-Tumorsuppressor 1), einen Transkriptionsfaktor mit Bindungsstelle am Nephrin-Promotor (96), herunterreguliert (95). Entfällt dieser Effekt, wie in PKC α ^{-/-} Mäusen, wird Nephrin, trotz diabetischer Stoffwechsellage, unverändert glomerulär exprimiert und es entsteht keine Proteinurie (97).

Neben einer chronischen Hyperglykämie kann auch eine kurzfristige Erhöhung der Blutglukosekonzentration bei ansonsten bestehender Normoglykämie innerhalb von Minuten eine transiente Albuminurie induzieren, wie 2009 von Axelsson et al. im Rattenmodell gezeigt (98). Auch hier ist eine Depletion von Nephrin ursächlich. Den raschen Onset dieses Phänomens erklärt, dass Hyperglykämie über PKC α -vermittelte Nephrinphosphorylierung an T1120 und T1125 signifikant die Interaktion mit β -Arrestin steigert und somit die Nephrin-Endozytose dynamisch stimuliert (99).

1.4.4.2 Hyperglykämie und Protein 4.1O – bisherige Erkenntnisse

Die Assoziation von diabetischer Nephropathie mit FRMD3 und seinem Genprodukt 4.1O führt zu der Frage nach dem Einfluss von Hyperglykämie auf Funktion und Regulation des Proteins.

Im Rahmen von Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, dass Protein 4.1O unter dem Einfluss einer hohen

Glukosekonzentration vermehrt exprimiert wird, während die Interaktion mit Nephrin durch die Hyperglykämie-induzierte Hyperosmolarität signifikant reduziert wird. Zudem schwächt 4.1O *in vitro* unter hyperosmolaren Bedingungen die Interaktion von β -Arrestin mit Nephrin, ohne einen objektivierbaren Einfluss auf die Nephrin-Endozytose zu haben (52).

Die *in vivo* Daten zur FRMD3-Expression bei diabetischer Nephropathie sind uneinheitlich. Während Buffon et al. im Mausmodell eine reduzierte FRMD3-Expression beschreiben (14), demonstrieren präliminäre Daten der eigenen Arbeitsgruppe immunhistochemisch anhand von humanen Nierenbiopsaten eine vermehrtes 4.1O-Vorkommen in diabetischer Nephropathie mit einer chronischen Niereninsuffizienz, G3b-5A3 n. KDIGO (GFR < 45 ml/min, ACR (Albumin-Kreatinin-Ratio) > 300 mg/g) (53).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bis dato ist das erst kürzlich im Podozyten nachgewiesene Protein 4.1O molekular noch nicht vollständig charakterisiert, obwohl es, als Expressionsprodukt eines der relevantesten Kandidatengene für diabetische Nephropathie in Typ 1 Diabetikern (14), ein mögliches Schlüsselprotein auf dem Weg zu einem umfassenderen Krankheitsverständnis, einer SNP-basierten Risikostratifizierung sowie einer individuell am Haplotyp orientierten, nephroprotektiven Therapie (100) darstellen könnte.

Rezente Arbeiten fokussierten die funktionelle Relevanz von 4.1O als Adapterprotein an der glomerulären Schlitzmembran und illustrierten, dass es hier multiple Protein-Protein-Interaktionen eingeht (52). Dabei fanden sich aus methodischen Gründen z. T. unspezifische Banden im Western Blot, die die Aussagekraft der Daten schwächten.

Im Rahmen der Interaktionsstudien konnte 4.1O als Linker zwischen Nephrin und dem Aktin-Cytoskelett des Podozyten identifiziert werden (52). Als solcher steht 4.1O im Verdacht, funktionelle Redundanz zur Nck-Familie aufzuweisen (87). Konkordant hierzu belegen präliminäre Daten eine Schwächung der NCK2/Nephrin-Interaktion in Anwesenheit von 4.1O (52), ohne dass bisher der genannte Zusammenhang *vice versa* nachgewiesen wurde. Zudem fehlen Dosis-Titrationsen, um potenziell kompetitive Effekte ermitteln zu können.

Die Regulation der NCK2/Nephrin-Interaktion und damit auch der sich hieran anschließenden Signalkaskaden mit Bezug zum Aktin-Zytoskelett erfolgt über den Phosphorylierungsstatus der drei cytoplasmatisch lokalisierten YDxV-Motive von Nephrin (82, 87). Zudem reflektiert Phospho-Y1193 die Intaktheit der glomerulären Schlitzmembran und ist mit den Downstream-Effektoren der Nephrin-Endozytose verknüpft (90). Die

Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin liegt z. T. im Bereich der genannten Tyrosinresiduen (52), was zu der Hypothese führt, dass die 4.1O-Bindung einen möglichen Effekt auf ihren Phosphorylierungsstatus haben könnte.

In Hyperglykämie-Modellen wurde eine aberrante Nephrin-Phosphorylierung nachgewiesen, die als Trigger einer vermehrten Endozytose die Entwicklung einer Proteinurie initiieren kann (99). Einige SNPs von 4.1O sind mit einer Suszeptibilität für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie assoziiert (10), zudem kommen zwei posttranslational modifizierbare Threonin- und Tyrosinresiduen in der Nephrin-Interaktionsdomäne von 4.1O vor. Daten zum Einfluss von Hyperglykämie auf die 4.1O-Phosphorylierung fehlen jedoch bisher.

Zusammengefasst ergeben sich für die vorliegende Arbeit die folgenden Fragestellungen:

- (I) Wie lässt sich die Probenqualität bei Co-Immunpräzipitations-Versuchen methodisch verbessern? Können die bekannten Interaktionen von 4.1O mit anderen podozytären Proteinen und die jeweiligen Interaktionsdomänen in optimierter Western Blot Qualität bestätigt werden?
- (II) Wie wirkt sich die Anwesenheit von NCK2 auf die Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin aus? Gibt eine dosisabhängige Konkurrenz der beiden Adapterproteine um Nephrin als Bindungspartner?
- (III) Beeinflusst die 4.1O/Nephrin-Interaktion den Nephrin-Phosphorylierungsstatus an seinen cytoplasmatisch lokalisierten, regulatorisch relevanten YDxV-Motiven?
- (IV) Besteht ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Glukosekonzentration und dem Phosphorylierungsstatus von Protein 4.1O?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Axiovert 40 CFL Microscope	Carl Zeiss, Oberkochen, DE
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, DE
Bizerba SL 310	Bizerba, Balingen, DE
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Centrifuge 5910 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Electrophoresis Power Supply EPS 300	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
FIREBOY Bunsenbrenner	Integra Biosciences, Biebertal, DE
Halbmikrowaage R 160 P	Sartorius, Göttingen, DE
HERAcell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
Heraeus Brutschrank Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
HERAsafe 240	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
HERAsafe HS 12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
HERAsafe KS 18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
HS 260 Control	IKA-Werke, Staufen, DE
Imager FluorChem FC2	Alpha Innotech, San Leandro, US-CA
Labquake Shaker Rotisserie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US-MA
Magnetrührer RET basic	IKA-Werke, Staufen, DE
Mikrowelle NN-E202CB	Panasonic, Kadoma, Japan
Mini See-Saw Rocker SSM4	Stuart Equipment, Staffordshire, UK
Multitron	Infors HT, Bottmingen, CH

Optima MAX-XP Ultracentrifuge	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld, DE
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, DE
PowerPac Universal Power Supply	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Präzisionswaage 572	Kern & Sohn, Balingen, DE
Precisdig 6001197	J. P. Selecta, Barcelona, ES
Reax Control Vortex-Mischer	Heidolph, Schwabach, DE
Rocking Platform Shaker	VWR International, Darmstadt, DE
Rotixa/RP 4200	Hettich, Tuttlingen, DE
T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen, DE
ThermoMixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, DE
Wärmeschrank UM 200	Memmert, Schwabach, DE
ZX3 Vortex-Mischer	Velp Scientifica, Usmate, Italien

2.1.2 Verbrauchsmaterialien & Gebrauchsgegenstände

<i>Verbrauchsmaterial/Gebrauchsgegenstand</i>	<i>Hersteller</i>
10-Well Comb, Fixed Height, 0.75 mm	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Amersham Hybond P 0.2 µm PVDF	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Amersham Protran 0.45 µm NC	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Bio-Ice Cooling Unit	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Corning 100 mm TC-treated Culture Dish	Corning Incorporated, Corning, US-NY
Foam Pads for Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Microcentrifuge Polypropylene Tube, 1.5 ml	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld, DE
Mini Gel Holder Cassette	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini Trans-Blot Central Core	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Casting Frame	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Casting Stand	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Casting Stand Gaskets	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Comb, 10-Well, 0.75 mm	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Comb, 10-Well, 1.0 mm	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Gel Releasers	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Short Plate	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Spacer Plates, 0.75 mm	Bio-Rad, Feldkirchen, DE

Mini-PROTEAN Spacer Plates, 1.0 mm	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Mini-PROTEAN Tetra Companion Running Module	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Sub-Cell GT Cell	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Sub-Cell GT Gel Caster	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Sub-Cell GT UV-Transparent Gel Tray	Bio-Rad, Feldkirchen, DE
Submikroliterzelle	Implen, München, DE
UVette	Eppendorf, Hamburg, DE
Whatman Gel Blot Paper, Grade GB003	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Zellspatel	TPP, Trasadingen, CH

2.1.3 Chemikalien/Reagenzien

<u>Chemikalie/Reagenz</u>	<u>Hersteller</u>
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
2-Propanol, 70 %	Otto Fischar, Saarbrücken, DE
2-Propanol, AnalaR NORMAPUR	VWR International, Darmstadt, DE
2-Propanol, GPR RECTAPUR	VWR International, Darmstadt, DE
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose, Low Gelling Temperature	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Biomol, Hamburg, DE
Ampicillin-Natrium	Serva, Heidelberg, DE
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Bromphenol Blau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
BSA Protease Free - lyophilized	H2B, Limoges, FR
BSA, Molecular Biology Grade, 100x	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Certistain Orange G	Merck, Darmstadt, DE
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11–245 kDa)	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
cComplete Mini Proteasehemmer-Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
CutSmart Buffer, 10x	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
D-Mannitol	ICN Biomedicals, Aurora, US-OH
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt, DE
Dimethylsulfoxid Hybri-Max	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, DE
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
dNTP Mix, PCR Grade	Qiagen, Hilden, DE
DPBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol, AnalaR NORMAPUR	VWR International, Darmstadt, DE
Ethidiumbromidlösung, 0.025 %	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin, DE
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Uppsala, SE
GammaBind Plus Sepharose	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Glycerin ROTIPURAN	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glykogen aus Mytilus edulis	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
HEPES	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	J. T. Baker, Deventer, NL
Laemmli Sample Buffer, 2x	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Lambda DNA-BstE II Digest	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
LB Broth mit Agar	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Lennox L Broth Base	Invitrogen, Darmstadt, DE
Lumi-Light ^{PLUS} Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Methanol, AnalaR NORMAPUR	VWR International, Darmstadt, DE
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, DE
Natriumchlorid EMSURE	Merck, Darmstadt, DE
Natriumhydroxid	Avantor, Deventer, NL
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
NEBuffer 2.1, 10x	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
NEBuffer 3.1, 10x	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
Nuclease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, DE
p-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, DE
PCR Buffer, 10x	Qiagen, Hilden, DE
Phenol, Saturated Solution, pH 4.5	ICN Biomedicals, Aurora, US-OH

Phenylmethanesulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
RNase AWAY	Carl Roth, Karlsruhe, DE
RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, DE
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Biomol, Hamburg, DE
T4 DNA Ligase Reaction Buffer, 10x	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tetracyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Titriplex III	Merck, Darmstadt, DE
Tris PUFFERAN	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trizma Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Trypsin/EDTA, 0.05 %/0.02 %, in PBS w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, DE
Tween 20 EMPROVE ESSENTIAL	Merck, Darmstadt, DE
Wasser, HiPerSolv CHROMANORM	VWR International, Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid, ≥ 30 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE

2.1.4 Gele, Puffer und Lösungen

<u>Gel/Puffer/Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
BSA-Blocklösung, 5 %	12,9 mM Tris Base, pH 7,5 129,2 mM NaCl 1,2 mM Tween 20 3 mM BSA
DNA-Ladepuffer + Orange G, 5x	200 mM Tris Base 5 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O 100 mM Essigsäure 55,2 mM Orange G 345 µM Ficoll 400 1,63 M Glycerin
HEBS, 2x	pH 7,05 280,6 mM NaCl 59,8 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄

Laemmli + DTT, 2x	100 mM Tris-HCl, pH 6,8 138,7 mM SDS 1,37 M Glycerin 2,9 mM Bromphenolblau 100 mM DTT
Lambda-Marker	40 mM Tris Base 1 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O 20 mM Essigsäure 11 mM Orange G 69 µM Ficoll 400 326 mM Glycerin 25 µg/ml Lambda DNA-BstE II Digest
Laufpuffer	23,9 mM Tris Base 191,8 mM Glycin 3,5 mM SDS
Lösung für ein Agarosegel, 1 %	40 mM Tris Base 1 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O 20 mM Essigsäure 15,9 µM Agarose 0,2 µg/ml Ethidiumbromid
Lösung für ein SDS-Sammelgel	pH 6,8 648,4 µM Rotiphorese Gel 30 238,4 mM Tris-HCl 7,9 mM Tris Base 6,8 mM SDS 10,27 µM APS 9,88 µM TEMED
Lösung für ein SDS-Trenngel, 10 %	pH 8,8 1,4 mM Rotiphorese Gel 30 180 mM Tris-HCl 570 mM Tris Base 7 mM SDS 8,7 µM APS 11,1 µM TEMED
Luminol-Detektionsreagenz Lösung A	100 mM Tris Base, pH 8,5 396 µM Cumarsäure 2,5 mM Luminol

Luminol-Detektionsreagenz Lösung B	100 mM Tris Base, pH 8,5 5,3 mM H ₂ O ₂
Lysepuffer	20 mM Tris Base, pH 8,0 150 mM KCl 1 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O 40 mM Triton X-100 1 mM Natriumorthovanadat 1 Tbl./50 ml cOplete Mini
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	pH 7,4 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ • 7 H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Proteinwaschpuffer	12,9 mM Tris Base, pH 7,5 130 mM NaCl 1,2 mM Tween 20
Transferpuffer	31 mM Tris Base 240 mM Glycin 4,93 M Methanol
Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer	pH 8,0 40 mM Tris Base 1 mM EDTA-Na ₂ • 2 H ₂ O 20 mM Essigsäure

2.1.5 Fertigsysteme (kommerzielle Kits)

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
AccuPrime Taq DNA Polymerase System	Invitrogen, Darmstadt, DE
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNase-free DNase Set	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

2.1.6 Zellen und Bakterien

<u>Zellen/Bakterien</u>	<u>Bezugsquelle</u>
E. coli, MC1061	Brian Seed, Massachusetts General Hospital, Boston, US-MA
E. coli, MC1061/P3	Brian Seed, Massachusetts General Hospital, Boston, US-MA
Human Embryonic Kidney 293T	Brian Seed, Massachusetts General Hospital, Boston, US-MA
One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli	Invitrogen, Darmstadt, DE
One Shot TOP10/P3 Chemically Competent E. coli	Invitrogen, Darmstadt, DE

2.1.7 Nährmedien

<u>Nährmedium</u>	<u>Hersteller/Zusammensetzung</u>
DMEM Very Low Endotoxin with stable Glutamine, 3.7 g/l NaHCO ₃ , 4.5 g/l D-Glucose, Na-Pyruvate	Biochrom, Berlin, DE
DMEM Very Low Endotoxin with stable Glutamine, 3.7 g/l NaHCO ₃ , 4.5 g/l D-Glucose, Na-Pyruvate	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
DMEM with stable Glutamine, 3.7 g/l NaHCO ₃ , 1.0 g/l D-Glucose, low endotoxin	Biochrom, Berlin, DE
DMEM with stable Glutamine, 3.7 g/l NaHCO ₃ , 1.0 g/l D-Glucose, Na-Pyruvate	PAN-Biotech, Aidenbach, DE
LB-Medium mit Ampicillin	pH 7,0 20 g/l LB Broth Base 286,2 µM Ampicillin
LB-Medium mit Ampicillin/Tetracyclin	pH 7,0 20 g/l LB-Agar nach Lennox 71,6 µM Ampicillin 16,9 µM Tetracyclin

Lösung für LB-Agarplatten mit Ampicillin	32 g/l LB-Agar nach Lennox 3 mM NaOH 286,2 µM Ampicillin
Lösung für LB-Agarplatten mit Ampicillin/Tetracyclin	32 g/l LB-Agar nach Lennox 3 mM NaOH 71,6 µM Ampicillin 16,9 µM Tetracyclin

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primär-Antikörper

<u>Primär-Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-FLAG M2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Anti-Myc/c-Myc Antibody, 9E10	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US-TX
Anti-Nephrin Antibody	Progen, Heidelberg, DE
Anti-Nephrin Phospho Y1176 + Y1193 Antibody	Abcam, Berlin, DE
Anti-Nephrin Phospho Y1217 Antibody	Abcam, Berlin, DE
Anti-Phospho-Threonin-Prolin Antibody, P-Thr-Pro-101	Cell Signaling Technology, Danvers, US-MA
Anti-Phosphotyrosin Antibody, 4G10	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
Anti-V5 Antibody	Invitrogen, Darmstadt, DE

2.1.8.2 Sekundär-Antikörper

<u>Sekundär-Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Donkey Anti-Guinea Pig IgG-HRP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DE
ECL Sheep Anti-Human IgG-HRP	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Goat Anti-Mouse Immunoglobulins-HRP	Dako, Hamburg, DE
Goat Anti-Rabbit IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US-TX

2.1.9 Primer

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Hersteller</u>
4.10 FP	5' – CGC GGG ACG CGT ATG CAG CTT TCA AAG AGG GAA ACC AAA GGG CAG – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
4.10 RP 1452	5' – GCG GGG GCG GCC GCC CTA AAA ACT CTT GAC CAG TGG – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
4.10 RP 1518	5' – GCG GGG GCG GCC GCC CTA CAA AAG GAG GAG GAG – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
GAPDH FP	5' – GGT CAT CCA TGA CAA CTT TGG TAT CG – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE
GAPDH RP	5' – GTC GCT GTT GAA GTC AGA GGA GAC – 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

2.1.10 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Bezugsquelle</u>
pCDM8	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.F.4.1O 1-1662 bp (AA 1-553)	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE
pCDM8.F.4.1O 1350-1662 bp (AA 450-553)	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE
pCDM8.F.4.1O 1452-1662 bp (AA 484-553)	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE
pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp (AA 506-553)	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE
pCDM8.F.GFP	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.F.NCK2	Nina Jones, University of Guelph, Guelph, CA
pCDM8.Nephrin	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.slg	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE

pCDM8.slg.GLEPP1 2532-3648 bp (AA 844-1216)	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3570 bp (AA 1087-1190)	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3624 bp (AA 1087-1208)	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3732 bp (AA 1087-1241)	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.slg.Nephrin 3474-3624 bp (AA 1158-1208)	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pCDM8.slg.Nephrin 3474-3732 bp (AA 1158-1241)	Gerd Walz, Universitätsklinikum Freiburg, Freiburg, DE
pcDNA3.myc.IQGAP1	David Sacks, NIH Clinical Center, Bethesda, US-MD
pcDNA3.V5.4.10	Lorenz Sellin, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, DE

2.1.11 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, 10.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
HindIII, 20.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
HotStarTaq DNA Polymerase, 5.000 U/ml	Qiagen, Hilden, DE
MluI, 10.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. M. DE
NotI, 10.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE
T4 DNA Ligase, 400.000 U/ml	New England Biolabs, Frankfurt a. M., DE

2.1.12 Software

<u>Software</u>	<u>Hersteller</u>
AlphaView, Version 3.3.1.0	Cell Biosciences, Santa Clara, US-CA
EndNote, Version 20.2	Alfasoftware, Frankfurt a. M., DE
FluorChem FC2, Version 6.0.2	Alpha Innotech, San Leandro, US-CA

GraphPad Prism, Version 9.4.1	GraphPad Software, San Diego, US-CA
Microsoft Excel, Version 16.65	Microsoft Corporation, Redmond, US-WA
Microsoft PowerPoint, Version 16.65	Microsoft Corporation, Redmond, US-WA
Microsoft Word, Version 16.65	Microsoft Corporation, Redmond, US-WA
DNASTAR Lasergene, Version 12.1	DNASTAR, Madison, US-WI

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie HEK 293T

Bei HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen, die durch Transfektion mit DNA-Abschnitten des Adenovirus Typ 5 immortalisiert wurden (101). Der hier verwendete Subklon HEK 293T exprimiert zusätzlich das große T-Antigen SV40, was die episomale Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung mit großer Reduplikationsrate ermöglicht (102). Auf diese Weise gelingt eine quantitativ deutlich höhere Expression der Zielproteine, was die Zelllinie in besonderem Maße für Transfektionsversuche qualifiziert.

Die Kultivierung der HEK 293T Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in Petrischalen (d = 100 mm) mit 10 ml VLE-DMEM (mit stabilem Glutamin, 3.7 g/l NaHCO₃, 4.5 g/l D-Glucose und Natriumpyruvat) unter Hinzugabe von 10 % fetalem Kälberserum (FCS).

Alle 48 h wurde die Zelllinie unter sterilen Bedingungen passagiert. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die adhären Zellen vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend durch 1 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 % in PBS) von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst. Die Reaktion erfolgte, entsprechend dem spezifischen Temperaturoptimum des Enzyms, bei 37 °C im Brutschrank. EDTA fungiert dabei als Chelator für divalente Kationen, wie Calcium und Magnesium, die Zell-Zell-Kontakte vermitteln und unterstützt so die Wirkung des Trypsins. Nach 5 min wurde, je nach gewünschtem Splittingverhältnis, ein entsprechendes Volumen an frischem Nährmedium hinzugegeben und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren darin mechanisch vereinzelt. Anschließend wurde je 1 ml der Zellsuspension in eine neue Petrischale mit 9 ml vorgelegtem Nährmedium überführt und darin gleichmäßig verteilt.

2.2.1.2 Aussaat der HEK 293T Zellen

12 h vor geplanter Transfektion wurden die Zellen analog zum Splitting-Verfahren (vgl. 2.2.1.1.) in 10 ml DMEM (mit stabilem Glutamin, 3.7 g/l NaHCO₃ und 1.0 g/l D-Glucose) + 10 % FCS subkultiviert. Dabei sollten die Zellen für eine hohe Transfektionseffizienz einzeln, aber möglichst dicht in der Kulturschale vorliegen.

2.2.1.3 Transiente Transfektion nach der Calciumphosphat-Methode

Als „Transfektion“ bezeichnet man das Einbringen von fremden Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen mit dem Ziel einer Expression der eingeschleusten Gene unter Nutzung des Proteinsynthese-Apparates der Wirtszelle. Bei der hier verwendeten Calciumphosphat-Methode handelt es sich um eine Technik zur transienten Transfektion, d. h. die Fremd-DNA wird nicht in das Genom integriert (103).

Zu einem Ansatz aus 500 µl einer 250 mM Calciumchlorid-Lösung und 1-12 µg der zu transfizierenden DNA-Konstrukte wurden, unter konstantem Vortexen, tropfenweise 500 µl einer 2x HEPES Buffered Saline Solution zugegeben. Dann folgte eine 10-minütige Inkubation, während der sich Calciumphosphat-DNA-Kristalle bilden. Der Transfektionsansatz wurde möglichst gleichmäßig tropfenweise in den Kulturschalen mit ausgesäten HEK 293T Zellen verteilt. Innerhalb einer 6-8-stündigen Inkubationsphase bei 37 °C und 5 % CO₂ nahmen die HEK 293T die an der Oberfläche haftenden Kristalle durch Endozytose auf, sodass die zu transfizierende DNA in die Zelle gelangte (104). Dann wurde das Nährmedium, entsprechend den gewünschten Versuchsbedingungen (z. B. unterschiedliche Glukosekonzentrationen für Hyperglykämie-Modelle, Verzicht auf FCS bei Phosphorylierungsuntersuchungen usw.), gewechselt und die Zellen für 12-16 h weiterkultiviert (Proteinsynthesephase).

2.2.1.4 Zellernte und -lyse

Vor geplanter Immunpräzipitation wurden für jeden Datenpunkt je zwei Kulturschalen mit gleich transfizierten HEK 293T im Rahmen der Zellernte gepoolt.

Das Nährmedium wurde abgesaugt, die adhären Zellen in gekühltem PBS mechanisch vom Schalenboden gelöst und anschließend bei 483 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dem ebenfalls vorgekühlten Lysepuffer wurden pro ml je 4,4 µl 10 mM PMSF (Proteaseinhibitor) in 100 % Isopropanol zugegeben und das Pellet, je

nach Größe, in 150-350 µl dieses Ansatzes resuspendiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf Eis, während der es, durch Einwirkung von Triton® X-100, zur Destabilisierung der Zellmembran mit Freisetzung der exprimierten Zielproteine kommt (105). Hiernach schloss sich eine erneute Zentrifugation (20.817 g, 15 min, 4 °C) an, nach der die Überstände, unter Angleichung der Volumina für alle Proben eines Versuches, in neue Reaktionsgefäße überführt wurden. Je 10 % der Lysate wurden zu gleichen Teilen mit 2x Laemmli + DTT versetzt und bei 95 °C für 5 min im Heizblock denaturiert.

2.2.2 Proteinisolierung und -analyse

2.2.2.1 (Co-)Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Aufreinigung von Zielproteinen und zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen, indem mithilfe eines Antikörpers ein spezifisches Protein mitsamt seines Interaktionspartner (Co-Immunpräzipitation) aus einem Proteingemisch herauspräzipitiert wird (106). Wird hierfür ein immobilisiertes *bait*-Molekül, anstelle des Antikörpers, eingesetzt, spricht man von einem Pulldown (107).

Die Majorität der Zielproteine war mit einem Affinitäts-Tag, der Aminosäuresequenz DYKDDDDK (FLAG®-Tag) oder dem Fc-Teil von humanem IgG, markiert, sodass zur direkten Präzipitation Anti-FLAG® oder Protein G, gekoppelt an eine stationäre Phase aus Agarose bzw. quervernetzten Agarosekügelchen, eingesetzt werden konnten.

Es wurden je 30 µl Anti-FLAG® M2 Affinity Gel oder GammaBind® Plus Sepharose zu den Lysaten aus 2.2.1.4. hinzugegeben und diese für mind. 1 h bei 4 °C im Überkopf-Rotator inkubiert. Nach Zentrifugation bei 956 g für 3 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen und die Beads wurden in 800 µl des auch zur Zellyse verwendeten Puffers für weitere 5 min bei 4 °C auf dem Überkopf-Rotator geschüttelt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4-mal durchgeführt, wobei die letzte Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 17.949 g erfolgte. Auch hiernach wurde der Überstand abgenommen und verworfen und die Beads im Anschluss in 30 µl 2x Laemmli + DTT für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Dabei kommt es zu einer Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen durch thermische Einwirkung und einem Verlust der Disulfidbrücken durch DTT-induzierte Reduktion von SH-Gruppen (108) mit konsekutivem Verlust der Tertiärstruktur der Proteine. Natriumdodecylsulfat, als Bestandteil von Laemmli, bildet mit den Polypeptiden SDS-Protein-Mizellen aus und vermittelt damit, unabhängig vom ursprünglich sauren oder

basischen pI-Wert der Proteine, eine negative Gesamtladung, die annähernd proportional zur Proteingröße ist (109, 110).

2.2.2.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine elektroforetische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, die hier als Disk-Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt wurde. Dabei besteht das verwendete Polyacrylamid-Gel aus einem Sammelgel und einem Trenngel, wobei das Sammelgel grobporiger, schlechter leitfähig und azidotischer ist als das Trenngel.

Die mit SDS komplexierten und durch Einwirkung von Hitze und DTT monomerisierten Polypeptidketten wandern im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode zunächst durch das Sammelgel, in dem die Proben zu einer schmalen Lauffront fokussiert werden, und dann durch das Trenngel, in dem die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgt. Dabei ist die Laufstrecke der Polypeptide umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Molekülmasse (111).

Die Polyacrylamidgele für die SDS-PAGE wurden unter Verwendung des Mini-PROTEAN® Tetra Cell Casting Module entsprechend den o. g. Angaben (vgl. 2.1.4.) hergestellt. Dabei wurde der Trenngel-Ansatz nach dem Einfüllen zwischen die Glasplatten mit 100 % Isopropanol überschichtet und so für 20-30 min erschütterungsfrei inkubiert. Danach wurde das 2-Propanol rückstandsfrei entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Kamm zur Präformierung der Probenfächer eingesetzt. Es erfolgte eine weitere mind. 20-30-minütige Polymerisationsphase, nach der die Gele in das Mini-PROTEAN® Tetra Companion Running Module eingespannt und in die, entsprechend den Herstellerangaben mit Laufpuffer gefüllte, Elektrophoresekammer eingesetzt wurden. Die Proben aus 2.2.2.1. wurden für 1 min bei 17.949 g und 4 °C zentrifugiert und danach gemeinsam mit den Proben aus 2.2.1.4. auf das Gel geladen (je 9,5-15 µl). Als Größenstandard diente ein Gemisch aus Proteinen bekannter molekularer Massen, von dem ebenfalls 10 µl aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in der Sammelphase bei $U = 70 \text{ V}$ für 30 min, anschließend in der Trennphase bei $I = 20 \text{ mA/Gel}$ für 90 min (bzw. 75 min bei kleinen Zielproteinen).

2.2.2.3 Western Blot

Western Blotting dient der Detektion und Identifikation von Proteinen durch Übertragung von elektroforetisch aufgetrennten Proteingemischen auf eine Trägermembran. Dafür

wird nach erfolgter SDS-PAGE ein elektrisches Feld, senkrecht zum Polyacrylamid-Gel, angelegt, wodurch die negativ geladenen Polypeptide in Richtung Anode wandern und dabei aufgrund hydrophober und polarer Wechselwirkungen (PVDF-Membranen) oder ionischer und polarer Wechselwirkungen (Nitrocellulose-Membranen) an der Oberfläche der Membran haften bleiben (112).

Nach Abschluss der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde das Sammelgel vorsichtig abgetrennt und verworfen und das Trenngel, ebenso wie alle übrigen Komponenten des in Tabelle 1 dargestellten Blotting Sandwiches, in gekühlten Transferpuffer überführt. PVDF-Membranen wurden zuvor zur Reduktion der Hydrophobie kurz in 100 % Methanol aktiviert.

Unter kontinuierlicher Befeuchtung wurde das Blotsystem, entsprechend Tabelle 1, zusammengebaut und vertikal in eine mit gekühltem Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt (Tank Blot).

<u>Kathode (-)</u>
Blotschwamm
Filterpapier
Polyacrylamid-Gel
Nitrocellulose-/PVDF- Membran
Filterpapier
Blotschwamm
<u>Anode (+)</u>

Tabelle 1: Komponenten des Western Blot Sandwiches. PVDF *Polyvinylidenfluorid*

Bei einer Stromstärke von $I = 200 \text{ mA}$ war der Proteintransfer, je nach Größe des Zielproteins, nach 90 bis 120 min abgeschlossen.

2.2.2.4 Dot Blot

Ein alternatives, semiquantitatives Verfahren zum Proteinnachweis stellt der Dot Blot dar, der in Abgrenzung zur Western Blot Technik keine elektrophoretische Auftrennung der Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht beinhaltet (113).

Stattdessen wurden je 1-10 µl der mit Laemmli + DTT versetzten Lysate aus 2.2.1.4. direkt punktförmig auf aktivierte PVDF- oder trockene Nitrocellulose-Membranen aufgetragen.

2.2.2.5 Immundetektion

Nach dem Proteintransfer wurden die Trägermembranen zunächst bei 4 °C für mind. 12 h in einer Blockierlösung (5 % BSA in 1x Proteinwaschpuffer) inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu sättigen (114).

Hieran schloss sich die eigentliche Immundetektion an, bei der die geblotteten Proteine mittels Antikörpermarkierung sichtbar gemacht wurden. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass in einem ersten Schritt ein spezifischer Antikörper an ein Epitop des immobilisierten Zielproteins bindet, während im zweiten Schritt ein sekundärer Antikörper, der ein Immunkonjugat mit einem Reporterenzym darstellt, die Fc-Region des gebundenen Primär-Antikörpers erkennt (114, 115).

Alle hier verwendeten Sekundär-Antikörper waren HRP-gekoppelt. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert eine Reduktion von Wasserstoffperoxid und induziert dadurch die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat, wobei ein Lumineszenz-Signal emittiert wird, das die spezifischen Proteinbanden visualisiert, an die Antikörper gebunden sind (116).

Die Blot-Membranen wurden nach Blockierung zunächst in 10 ml eines Primär-Antikörper-Ansatzes mit der in Tabelle 2 genannten Antikörper-Konzentration für 1 h bei Raumtemperatur (alternativ für 12 h bei 4 °C) auf dem Horizontalschüttler ($f = 50 \text{ min}^{-1}$) inkubiert.

	<u>Verdünnung</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Wirt</u>
anti-c-myc	1:200	monoklonal	Maus
anti-FLAG®	1:400	monoklonal	Maus
anti-Nephrin	1:250	polyklonal	Meerschweinchen
anti-Phospho-Threonin-Prolin	1:5000	monoklonal	Maus
anti-Phospho-Tyrosin	1:1.500	monoklonal	Maus
anti-pY1176/pY1193-Nephrin	1:10.000	monoklonal	Kaninchen
anti-pY1217-Nephrin	1:4.500	monoklonal	Kaninchen
anti-V5	1:5.000	monoklonal	Maus

Tabelle 2: Primär-Antikörper zur Immunmarkierung membrangebundener Proteine nach Western Blotting. F FLAG®, Y Tyrosin.

Danach erfolgten vier Waschschrte, bei denen die Membranen zur Lsung unspezifischer Antikrperbindungen je 5 min bei $f = 60 \text{ min}^{-1}$ in Proteinwaschpuffer geschttelt wurden. Im Anschluss wurden die Membranen in den Sekundr-Antikrper-Ansatz (Verdnnung s. Tabelle 3) berfhrt und erneut unter den o. g. Bedingungen inkubiert, dann viermalig gewaschen.

	<u>Verdnnung</u>	<u>Klonalit</u>	<u>Wirt</u>	<u>Konjugat</u>
anti-Guinea-Pig	1:40.000	polyklonal	Esel	HRP
anti-Human	1:500	monoklonal	Schaf	HRP
anti-Mouse	1:10.000	polyklonal	Ziege	HRP
anti-Rabbit	1:20.000	polyklonal	Ziege	HRP

Tabelle 3: Sekundr-Antikrper zur Immunmarkierung membrangebundener Proteine nach Western Blotting. HRP *horseradish peroxidase*.

Die Lsungen A und B des Luminol-Detektionsreagenzes wurden zu gleichen Teilen gemischt (je 1 ml/Membran) und auf die Membranoberflche gegeben. Im Falle schwacher Signale wurden die Blots alternativ mit dem Lumi-Light^{PLUS} Western Blotting Substrate, entsprechend den Herstellerangaben, entwickelt. Anschließend konnte das Chemilumineszenz-Signal zur Visualisierung der Proteinbanden mit dem Imager FluorChem FC2 detektiert werden (Belichtungszeiten 1 min, 3 min, 7 min).

2.2.2.6 Densitometrie und statistische Auswertung

Die Signalintensitten der markierten Proteinbanden wurden unter automatischer Hintergrundsubtraktion mithilfe der Software *AlphaView*[®], Version 3.3.1.0, densitometrisch quantifiziert. Fr Interaktionsstudien wurde der Anteil der interagierenden Zielproteine durch den Quotienten $\text{Dichte}_{\text{Co-IP(Zielproteine)}} / \text{Dichte}_{\text{Lysat(Zielproteine)}}$ charakterisiert und dieser Zahlenwert zur vereinfachten grafischen Darstellung anschließend auf $\text{Dichte}_{\text{Co-IP(Kontrolle)}} / \text{Dichte}_{\text{Lysat(Kontrolle)}} = 1$ normiert. Fr Phosphorylierungsuntersuchungen wurde entsprechend der jeweiligen Fragestellung entweder der Quotient aus $\text{Dichte}_{\text{IP(Zielprotein)}} / \text{Dichte}_{\text{IP(Kontrolle)}}$ oder aus $\text{Dichte}_{\text{Lysat(Zielproteine)}} / \text{Dichte}_{\text{Lysat(Kontrolle)}}$ gebildet.

Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mithilfe von *GraphPad Prism*, Version 9.4.1, unter Beachtung eines Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$.

Dabei wurde für alle Versuche mit zwei Gruppen und begrenzter n-Zahl der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Bei drei oder mehr Gruppen wurde für die Versuche, bei denen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, der ebenfalls nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Zeigten sich der Anderson-Darling-Test, der Shapiro-Wilk-Test und der Kolmogorov-Smirnov-Test jedoch bei Versuchen mit ≥ 3 Gruppen nicht signifikant ($\alpha \geq 0,05$, Normalverteilungsannahme) und die Standardabweichungen nach dem Brown-Forsythe-Test gleich (Varianzhomogenitätsbedingung), so wurde eine einfaktorische ANOVA verwendet. Im Falle einer Heterogenität der Varianzen innerhalb der zu untersuchenden Gruppen wurde stattdessen eine Welch-ANOVA mit anschließender Post-hoc-Analyse mittels Tukey-HSD-Test durchgeführt.

2.2.3 DNA-Klonierung und -Amplifikation

2.2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Erster Schritt einer Klonierung ist die enzymatische Vervielfältigung des in den Klonierungsvektor (bakterielles Plasmid) einzufügenden DNA-Fragmentes mittels Polymerase-Kettenreaktion. Dabei werden die *Templates* in einem dreistufigen, zyklischen Prozess exponentiell amplifiziert.

Ein Ansatz, bestehend aus 100 ng DNA, je 1 μ l Vorwärts- (FP) und Rückwärtsprimer (RP) ($c = 100$ pmol/ μ l), 1 μ l AccuPrime™ Taq DNA Polymerase ($c = 5$ U/ μ l) sowie 5 μ l 10x AccuPrime™ PCR Puffer I (inkl. dNTPs) ad 50 μ l ddH₂O, wurde in einen Thermocycler eingebracht. An eine Denaturierungsphase (Initialisierung 5 min bei 95 °C, ab 2. Zyklus 30 s), bei der die Doppelstrang-DNA, durch Verlust der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen, in Einzelstränge aufgetrennt wird, schloss sich das Annealing an (30 s bei 58 °C). Hierbei hybridisieren die zwei spezifischen Primer mit dem Sense- bzw. Antisense-DNA-Strang des zu amplifizierenden Abschnitts und bilden so die Startermoleküle für die Elongation (1 min/kbp bei 68 °C, letzter Zyklus 3 min). Die 3'-OH-Enden der beiden Oligonukleotide dienen als Substrate für die hitzestabile Taq-Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*), die die Primer in 5'→3'-Richtung mit Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert (117, 118). Nach 15 Zyklen lagen rechnerisch $2^{15} = 32.768$ Kopien der DNA vor.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt wurde zur Größenkontrolle im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei definiert die Agarosekonzentration die Stabilität sowie Porengröße des fertigen Gels und damit das Auftrennungsprofil der DNA. Für kleine DNA-Fragmente erreicht man eine bessere räumliche Diskrimination mit einem höherkonzentrierten Agarosegel, für größere mit einem niederprozentigen Gel. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Gele hatten eine Agarosekonzentration zwischen 1 und 2,5 %.

Das Agarosepulver wurde durch mehrfaches kurzes Aufkochen in TAE-Puffer gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 55 °C erfolgte die Zugabe von 0,2 µg/ml Ethidiumbromid, dann wurde die Lösung rasch in einen Gelschlitten gegossen.

Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine mit Laufpuffer (TAE-Puffer) gefüllte Elektrophoresekammer überführt und mit 5 µl der PCR-Produkte beladen.

Als Größenstandard dienten dabei zwei parallel dazu aufgetragene DNA-Marker, die definierte Fragmente unterschiedlicher Länge enthalten (7 µl 100 bp DNA ladder mit 100-1.517 bp, 15 µl λ DNA-BstEII Digest mit 117-8.454 bp). Danach wurde eine Spannung von $U = 80 \text{ V}$ angelegt und das Gel für 45-75 min laufen gelassen. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode der Elektrophoresekammer, wobei die Laufstrecke annähernd proportional zum dekadischen Logarithmus der Fragmentlängen ist (119, 120).

Die Betrachtung der Agarosegele und Fotodokumentation der DNA-Banden erfolgte mithilfe eines UV-Transilluminators (Imager FluorChem FC2). Dabei wird das interkalierte Ethidiumbromid angeregt und emittiert Licht im orange-roten Bereich, sodass die DNA-Banden sichtbar werden (121).

2.2.3.3 DNA-Extraktion

Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung der DNA aus dem PCR-Produkt durch Phenolextraktion sowie Ethanolfällung. Hierbei werden Proteine und Nukleinsäuren zunächst, aufgrund ihrer unterschiedlichen Löslichkeit, in einer zweiphasigen Emulsion voneinander getrennt und die DNA anschließend in gereinigter, deproteinierter und entsalzter Form aus der wässrigen Lösung präzipitiert.

Das PCR-Produkt wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit Phenol gemischt und für 5 min zentrifugiert (20.817 g, 4 °C). Es entstand ein Zwei-Phasen-System, in dem sich die denaturierten Proteine in der phenolischen Phase, die RNA in der oberen wässrigen Phase und die DNA nahe der Interphase sammelt (122). Die untere Phase wurde verworfen.

Der Überstand wurde mit 5 µl 3 M Natriumacetat, 150 µl 100 % Ethanol (-20 °C) und 1 µl Glykogen für 2 h bei -20 °C inkubiert. Indem Ethanol der DNA ihre Hydrathülle entzieht, werden deren negativ geladene Phosphatgruppen frei, die in dem sauren, salzreichen Milieu teilweise protoniert, teilweise mit Natriumionen gesättigt werden. Die negative Nettoladung der DNA wird daher zunehmend neutralisiert, was ihre Löslichkeit so weit reduziert, dass sie ausfällt (123).

Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde der Ansatz bei 20.817 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert, das Pellet drei Mal mit 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in 150 µl ddH₂O resuspendiert.

2.2.3.4 Präparativer Restriktionsenzymverdau

Zur Vorbereitung der Ligation wurden das aufbereitete PCR-Produkt (*Insert*) sowie der Vektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierbei handelt sich um bakterielle Enzyme, die DNA sequenzspezifisch spalten können, wobei die Erkennungssequenz je nach Enzym meist 4-8 bp lang ist und ein Palindrom darstellt. Sie haben physiologische Relevanz in der Abwehr von Bakteriophagen (124, 125) und finden molekularbiologisch neben der Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen, auch bei der DNA-Analyse (diagnostischer Restriktionsverdau) Verwendung.

26 µl des PCR-Produktes wurden mit je 3 U zweier Restriktionsenzyme, 3 µl 10x Reaktionspuffer und 0,3 µl 100x BSA ad 30 µl ddH₂O bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Der Ansatz für den Vektor-Verdau bestand aus 1-1,5 µg Plasmid-DNA und je 10 U der beiden Restriktionsenzyme in 20 µl Reaktionspuffer. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 h bei 37 °C wurden hier 5 U CIP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*) dazugegeben, die durch 5'-Dephosphorylierung eine Religation des linearisierten Vektors in den letzten 30 min des Verdau verhindert (126).

2.2.3.5 Ligation

Die Integration des Inserts in den Vektor erfolgt enzymatisch katalysiert unter Veresterung benachbarter Nukleotide, sobald sich die jeweils passenden kohäsiven Enden (*sticky ends*) beider Nukleinsäuresegmente aneinandergelagert haben.

Im Anschluss an den Restriktionsverdau wurde, analog zu 2.2.3.2., ein 1,5 % *Low Melting* Agarose (LMA) Gel gegossen und mit je 15 µl beider Ansätze sowie einem Größenstandard beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 85 V für 30 min. Danach wurden

die Zielbanden im UV-Transilluminator sichtbar gemacht, aus dem Gel herausgeschnitten und für 5 min bei 70 °C geschmolzen.

Der Ligationsmix, bestehend aus 160 U T4-DNA-Ligase, 5 µl 10x T4-Ligase-Puffer, 2 µl der geschmolzenen Vektor-Gelbande und 34,6 µl ddH₂O, wurde auf zwei Tubes aufgeteilt. Einem wurden 4 µl des Insert-LMA-Ansatzes hinzugefügt, das andere diente als Kontrolle. Es erfolgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur, während der der Vektor und das Insert durch Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Gruppen ligiert wurden (127).

2.2.3.6 Transformation chemisch-kompetenter E. coli Stämme

Transformation beschreibt im eigentlichen Sinne die Fähigkeit einiger Bakterienspezies, freie DNA aus der Umgebung aufzunehmen und stellt damit neben Konjugation und Transduktion eine Form des lateralen Gentransfers dar. In der Molekularbiologie versteht man hierunter die nicht-virale Übertragung isolierter DNA, i. d. R. in Form von rekombinanten Plasmiden, auf kompetente Prokaryoten als ersten Schritt in der Nukleinsäure-Amplifikation. Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien erfolgt dabei über Markergene, die für verschiedene Antibiotikaresistenzen codieren.

Die chemisch-kompetenten Stämme E. coli MC1061 und MC1061/P3 zeigen eine hohe Transformationseffizienz nach Hitzeschock-Methode, bei der durch kurze thermische Einwirkung die Membranpermeabilität erhöht wird (128). Hier verwendete Plasmide enthalten die Expressionsvektoren pcDNA3 mit p-Laktamase-Ampicillin-Resistenz-Gen (Amplifikation in MC1061 ohne P3-Episom, Selektion mit Ampicillin) oder pCMD8 mit *supF*-Gen, das für eine Suppressor-tRNA codiert, die *amber*-Stop-Codons in den Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenzgenen des P3-Episomes supprimiert (Amplifikation in MC1061/P3, Selektion mit Ampicillin/Tetracyclin) (129).

Für die Transformation wurden 50 µl E. coli Suspension mit 0,25 µg DNA bzw. 5 µl des Ligationsansatzes oder der dazugehörigen Kontrolle zunächst für 15-30 min auf Eis, dann für 5 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Nach kurzem Abkühlen der Bakterien auf Eis wurde der Ansatz auf LB-Platten mit Antibiotikazusatz, entsprechend dem Selektionsmarker des zu amplifizierenden Plasmids, ausgestrichen. Im Anschluss erfolgte eine mind. 12-stündige Wachstumsphase bei 37 °C im Wärmeschrank. Dabei sollte die zum Kontrollansatz gehörige Platte koloniefrei bleiben.

2.2.3.7 Kultivierung transformierter Bakterien

Mithilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde eine einzelne Bakterienkolonie aufgenommen und in ein Einmal-Probengefäß mit 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz (s. o.) überführt. Im Anschluss erfolgte die Bebrütung dieser Minikulturen für mind. 8 h im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm.

Hiernach wurden, je nach optischer Trübung der Lösung als Maß für das quantitative Bakterienwachstum, 200-1500 µl des Ansatzes in ein sterilisiertes Proben-Gefäß mit 200 ml LB-Medium mit Antibiotikazusatz transferiert. Im Anschluss wurden diese Maxikulturen für mind. 12 h im Inkubationsschüttler bei 37 °C und 220 rpm bebrütet.

2.2.3.8 Plasmid-Präparation

Zur Plasmidisolierung wurde das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit entsprechend dem Versuchsprotokoll des Herstellers verwendet.

Hierfür wurden die Maxikulturen zuerst bei 4156 g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 (mit 100 µg/ml RNase A) vollständig resuspendiert. Im Anschluss wurden 10 ml des Lysepuffers P2 (NaOH-SDS) hinzugegeben und der Ansatz mehrfach invertiert, dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert (alkalische Lyse). Die Kaliumacetat-Fällung erfolgte nach Zugabe von 10 ml des auf Eis vorgekühlten Neutralisierungspuffers P3. Nach erneutem mehrfachem Invertieren der Probe schloss sich hierfür eine 20-minütige Inkubation auf Eis an, während der die chromosomale ssDNA, gemeinsam mit denaturierten Proteinen und Zelldebris, mit Kalium-SDS-Salz ausfällt. Die Plasmid-DNA hingegen, die ein kleineres Molekulargewicht und eine schnellere Reassoziationskinetik als chromosomale DNA besitzt, renaturiert durch Neutralisation und bleibt in Lösung.

Dann wurde der Ansatz zunächst bei 4156 g für 1 h, im Anschluss erneut für 15 min, bei 4 °C zentrifugiert und der klare Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA nach jedem Zentrifugationsschritt vorsichtig dekantiert bzw. abpipettiert. Das Pellet wurde verworfen.

Eine Anionenaustauscher-Säule wurde mit 10 ml QBT-Puffer äquilibriert und anschließend nach dem Schwerkraftprinzip mit dem Überstand der Zentrifugation beladen. Hiernach wurde die Säule zunächst zwei Mal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen, dann die an das Säulenmaterial adsorbierte Plasmid-DNA in 15 ml QF-Puffer eluiert und im Anschluss durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (100 %), kräftiges Schütteln und 1-stündige Zentrifugation bei 4156 g und 4 °C präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Ethanol

(70 %) durch erneute Zentrifugation bei 4156 g für 15 min bei 4 °C gewaschen. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde die Plasmid-DNA in 200 µl ddH₂O gelöst.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch unter Anwendung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren).

2.2.3.9 Diagnostischer Restriktionsenzymverdau

Nach jeder Plasmid-Amplifikation wird die gewonnene DNA mittels Restriktionsanalyse auf korrekte Identität überprüft.

Hierzu wurden je 1-1,5 µg DNA mit je 10 U zweier Restriktionsendonukleasen in 20 µl eines Reaktionspuffer für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Im Falle inkompatibler Anforderungen an die Reaktionsbedingungen wurde nacheinander mit den beiden Enzymen im selben Restriktionsansatz verdaut (hier: Gesamtvolumen 30 µl, Gesamtinkubationszeit 2 h), wobei mit dem Enzym begonnen wurde, dessen Puffer die niedrigere Salzkonzentration enthält.

Tabelle 4 enthält eine Aufstellung der Plasmid-spezifisch verwendeten Restriktionsenzyme und ihrer jeweiligen Reaktionspuffer.

<i>Plasmid</i>	<i>Restriktionsenzyme</i>	<i>Puffer</i>
pCDM8	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1-1449 bp (AA 1-483)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1-1515 bp (AA 1-505)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1-1662 bp (AA 1-553)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1350-1662 bp (AA 450-553)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1452-1662 bp (AA 484-553)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp (AA 506-553)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.F.GFP	HindIII/NotI	2.1/3.1
pCDM8.F.NCK2	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.Nephrin	HindIII/NotI	2.1/3.1
pCDM8.slg	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.slg.GLEPP1 2532-3648 bp (AA 844-1216)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3570 bp (AA 1087-1190)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3624 bp (AA 1087-1208)	Mlul/NotI	3.1
pCDM8.slg.Nephrin 3261-3732 bp (AA 1087-1241)	Mlul/NotI	3.1

pCDM8.slg.Nephrin 3474-3624 bp (AA 1158-1208)	MluI/NotI	3.1
pCDM8.slg.Nephrin 3474-3732 bp (AA 1158-1241)	MluI/NotI	3.1
pcDNA3.V5.4.1O	MluI/NotI	3.1

Tabelle 4: Restriktionsenzyme und Puffer für den diagnostischen Verdau von Plasmid-DNA.

F FLAG®, bp base pairs, AA amino acid, GFP grün fluoreszendierendes Protein, NCK2 non-catalytic region of tyrosine kinase 2, slg surface immunoglobuline, GLEPP1 glomerular epithelial protein 1.

Durch den enzymatischen Verdau entstehen aus der ringförmigen, doppelsträngigen Plasmid-DNA lineare Einzelstränge definierter Länge. Die Proben wurden mit einem Ladebuffer versetzt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und ihre Fragmentgröße unter UV-Licht anhand der Molekulargewichts-Marker geprüft (vgl. 2.2.3.4.).

Aus Klonierungen stammende Konstrukte wurden im Anschluss zusätzlich nach der Sangermethode sequenziert (Eurofins Genomics, Ebersberg, DE).

2.2.4 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

2.2.4.1 RNA-Präparation

Die RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des QIAGEN® RNeasy Plus Mini Kit nach Herstellerangaben.

Transient transfizierte HEK 293T Zellen wurden unter RNase-freien Bedingungen zunächst in gekühltem PBS gewaschen, danach mithilfe eines Spatels in 600 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mechanisch homogenisiert. Im Anschluss erfolgte eine 2-minütige Zentrifugation mit 17.949 g bei Raumtemperatur, nach der der Überstand auf eine gDNA-Eliminationssäule gegeben und mit ihr erneut zentrifugiert wurde (8000 g, RT, 15 s).

Die Säule mit der gebundenen genomischen DNA wurde verworfen, das Eluat im Volumenverhältnis 1:1 mit 70 % Ethanol versetzt, gut gemischt und auf eine RNA-Säule aufgebracht. Durch Zentrifugation (8000 g, RT, 15 s) wurde die RNA an die Membran gebunden.

Residuelle DNA wurde mit dem QIAGEN® RNase-free DNase Set enzymatisch degradiert. Hierzu wurden 10 µl DNase I und 70 µl des Reaktionspuffers RDD gemischt, auf die Säule gegeben und 15 min inkubiert.

Weitere Kontaminanten wurden im Anschluss durch drei Waschschrte, zunächst mit 700 µl des stringenten RW1-Waschpuffers, danach zwei Mal mit 500 µl des mildereren RPE-Waschpuffers, eliminiert. Auf jeden Pufferwechsel folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur mit 8000 g für 15 s. Dann wurde die Säule in ein frisches Auffanggefäß eingesetzt und für 1 min bei 17.949 g zentrifugiert, um verbliebene Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Nach dem Wechsel auf ein steriles Auffanggefäß wurden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran gegeben und die gebundene RNA durch Zentrifugation (8000 g, RT, 1 min) eluiert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die Sequenzabfolge einer RNA enzymatisch katalysiert in eine komplementäre ssDNA übersetzt, die dann als PCR-Template genutzt werden kann. Ziel ist der sensitive und zugleich spezifische Nachweis von Genexpression auf mRNA-Ebene.

Zur cDNA-Synthese wurde das QIAGEN® QuantiTect Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben verwendet.

Initial wurde ein Reaktionsansatz aus 750 ng RNA und 2 µl 7x gDNA Wipeout Buffer ad 14 µl RNase-freies H₂O auf Eis vorbereitet und dann für 3,5 min bei 42 °C inkubiert, um kontaminierende genomische DNA zu eliminieren. 0,5 µl wurden als Negativkontrolle verwahrt, die übrigen 13,5 µl wurden auf Eis mit 4 µl 5x Quantiscript RT-Reaktionspuffer (inkl. dNTPs), 1 µl RT-Primer-Mix und 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase (inkl. RNase-Inhibitor) sowie 0,5 µl RNase-freiem H₂O versetzt und für 25 min bei 42 °C inkubiert.

In dieser Zeit synthetisiert die reverse Transkriptase, ein im retroviralen Genom codiertes Enzym, die cDNA unter Verwendung der RNA-Templates (RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität) (130, 131) und degradiert im Anschluss spezifisch die RNA, die in einem solchen RNA/DNA-Hybrid vorliegt (RNase-H-Aktivität) (132).

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Quantiscript Reverse Transkriptase dann für 3,5 min bei 95 °C thermisch inaktiviert.

Danach wurde, zum Ausschluss einer Kontamination der komplementären DNA durch verbliebene genomische DNA, eine Kontroll-PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt. Bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase handelt es sich um ein Schlüsselenzym

der Glykolyse, das als solches konstitutiv exprimiert wird (*Housekeeping-Gen*) und daher als endogener Standard für Genexpression Verwendung finden kann (133).

Als Proben dienten je 0,5 µl Gesamt-RNA aus der RNA-Präparation, RNA nach gDNA-Verdau und cDNA nach Abschluss der reversen Transkription sowie 0,5 µl RNase-freies H₂O (Negativkontrolle). Ihnen wurde der PCR-Mix zugegeben, bestehend aus 0,12 µl (entsprechend 0,6 Unit) HotStarTaq[®] DNA-Polymerase, 2 µl 10x QIAGEN[®]-PCR-Puffer, je 0,1 µl (c = 100 pmol/µl) der GAPDH-Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 0,4 µl Nukleotid-Mix (c = 10 mM dNTP) ad 19,5 µl RNase-freies H₂O. Dann erfolgte, analog zu 2.2.3.1., eine Polymerase-Kettenreaktion mit 40 Zyklen (Initialisierung bei 95 °C für 15 min zur Aktivierung der DNA-Polymerase, Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 58 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 30 s, finale Synthesephase bei 72 °C für 5 min).

Im Anschluss wurden die Produkte der GAPDH-Kontroll-PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.3.2.). Die cDNA sollte eine Fragmentgröße von 382 bp aufweisen, während genomische Kontaminanten eine Länge von 576 bp haben.

3 Ergebnisse

3.1 Methodische Optimierung

3.1.1 Clearing von Zelllysaten mittels Ultrazentrifugation verbessert die Co-IP-Probenqualität und reduziert unspezifische Banden im Western Blot

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe wurde Protein 4.1O erstmalig als mutmaßlicher Interaktionspartner für verschiedene podozytäre Proteine identifiziert, unter ihnen GLEPP1, IQGAP1 und Nephrin. Bisherige Western Blots zeigten hierbei stets detektierbare schwache Proteinsignale für die gewählten Negativkontrollen, sodass eine Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Bandenmustern aus technischen Gründen nicht eindeutig möglich war. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die verwendeten proteinbiochemischen Methoden so zu modifizieren, dass Hintergrundsignale reduziert werden, um dann im Anschluss in verbesserter Abbildungsqualität die o. g. Interaktionen zu überprüfen.

3.1.1.1 Protein 4.1O interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil von GLEPP1

Am Beispiel des Pulldowns von Protein 4.1O und dem cytoplasmatischen Teil von GLEPP1, entsprechend AA 844-1216, wurde geprüft, ob sich durch ein Clearing der Zelllysate mittels Ultrazentrifugation vor der eigentlichen Präzipitation, oder durch Modifikation der Salz- und Tensidkonzentration des IP-Waschpuffers, unspezifische Banden im Western Blot reduzieren lassen.

Hierfür wurden HEK 293T Zellen mit pcDNA3.V5.4.1O und pCDM8.slg.GLEPP1 2532-3648 bp co-transfiziert, geerntet und lysiert. Als Negativkontrolle dienten Datenpunkte mit pcDNA3.V5.4.1O und pCDM8.slg.

Ansatz I wurde nach dem Immunpräzipitations-Standardprotokoll (vgl. 2.2.2.1) generiert. Die übrigen Proben wurden vor Beginn des Pulldowns via Protein G zunächst ultrazentrifugiert (RCF = 100.000 g, t = 30 min) und anschließend dann nach Protokoll gewonnen, jedoch mit verschiedenen Puffern gewaschen. Für Ansatz II wurde der Lysepuffer (Triton® X-100 [40 mM], KCl [150 mM]) als Waschpuffer verwendet, für Ansatz

III-V jeweils eine Modifikation dessen (III: Triton® X-100 [40 mM], KCl [250 mM]; IV: Triton® X-100 [40 mM], KCl [500 mM]; V: Triton® X-100 [60 mM], KCl [150 mM]).

Abb. 4A veranschaulicht schematisch die beschriebenen Versuchsbedingungen und zeigt die resultierenden Western Blots nach Immunmarkierung mit anti-V5. Durch Ultrazentrifugation gelang eine relevante Reduktion des Hintergrundsignals, während eine zunehmende Stringenz des Waschpuffers die Signalintensität unspezifisch reduziert.

Für alle weiteren Versuche erfolgte daher eine Erweiterung des Protokolls um ein Clearing unter Beibehaltung des ursprünglichen Waschpuffers (Triton® X-100 [40 mM], KCl [150 mM]).

Die Interaktion von 4.1O mit dem zytoplasmatischen Teil von GLEPP1, deren statistische Signifikanz bereits in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, ließ sich reproduzieren. Die Auswertung erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test* ($n = 3$, $p = n. s.$, Abb. 4B).

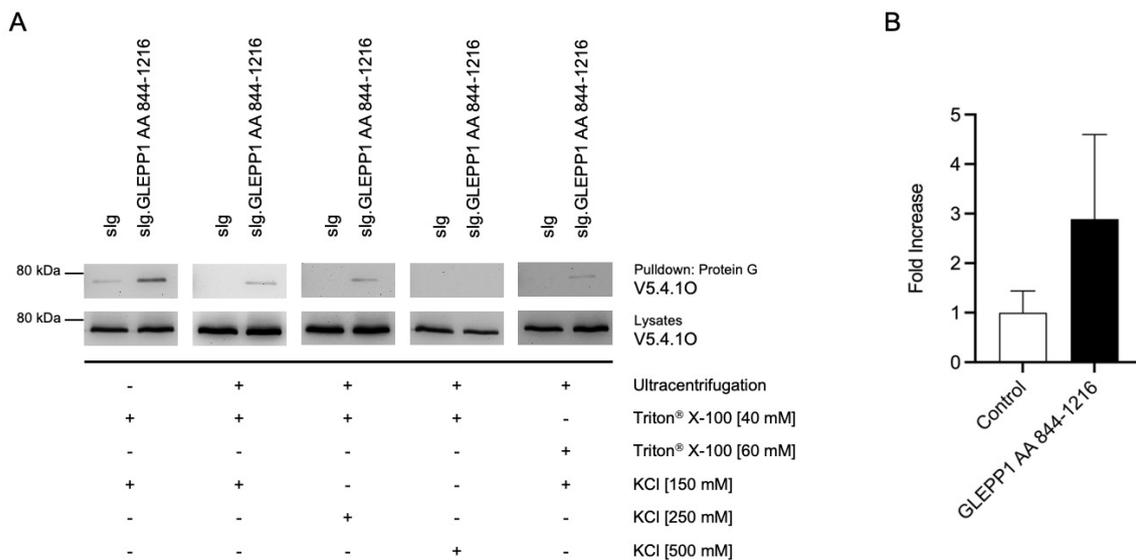


Abb. 4: Auswirkung unterschiedlicher Pulldown-/Immunpräzitationsprotokolle auf die Qualität des resultierenden Western Blots am Beispiel der Interaktion von Protein 4.1O mit dem cytoplasmatischen Teil von GLEPP1. A sgl.GLEPP1 AA 844-1216, V5.4.1O und sgl als Negativkontrolle wurden in HEK 293T Zellen überexprimiert und mittels immobilisiertem Protein G präzipitiert. Gegenüber dem Standardprotokoll wurde ein Ultrazentrifugationsschritt ergänzt und die Stringenz des Waschpuffers gesteigert. Anti-V5-markierte Western Blots zeigen, dass ein Preclearing der Proben durch Ultrazentrifugation unspezifische Signale reduzieren kann, während höhere Salz- und Tensidkonzentrationen auch spezifische Signale schwächen. sgl *surface immunoglobuline*, GLEPP1 *glomerular epithelial protein 1*, AA *amino acids*, KCl *Kaliumchlorid*, kDa *Kilodalton*. B Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test* ($n = 3$, $p = n. s.$).

3.1.1.2 Protein 4.1O interagiert mit IQGAP1

Zur Prüfung der vorbeschriebenen Interaktion von Protein 4.1O mit IQGAP1 wurden HEK 293T Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (pCDM8.F.4.1O und pcDNA3.myc.IQGAP1) co-transfiziert und am Folgetag geerntet und lysiert. Als Kontrolle diente dabei ein Ansatz mit F.GFP und myc.IQGAP1.

Nach Clearing der Lysate erfolgte eine Co-Immunpräzipitation unter Verwendung von Anti-FLAG® M2 Agarosebeads mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung des Proteingemischs. Abweichend vom Standardprotokoll wurde hierbei, aufgrund des hohen Molekulargewichts von myc.IQGAP1, ein SDS-Trenngel mit 8 % Acrylamid verwendet.

Abb. 5 zeigt exemplarisch einen resultierenden Western Blot nach Immunmarkierung mit anti-c-myc. Der Ultrazentrifugationsschritt konnte die Hintergrundsignale in der Negativkontrolle wirksam reduzieren.

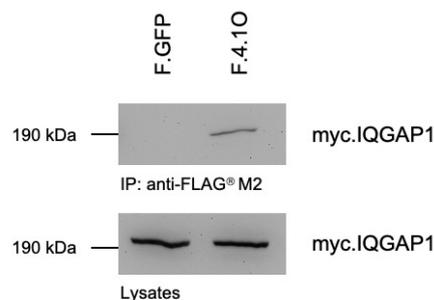


Abb. 5: Interaktion von Protein 4.1O mit IQGAP1. FLAG®-getaggttes 4.1O, myc.IQGAP1 und F.GFP als Negativkontrolle wurden in HEK 293T Zellen überexprimiert und mittels Anti-FLAG® M2 Agarosebeads präzipitiert. Der resultierende Western Blot wurde mit anti-c-myc markiert. Nach Erweiterung des Protokolls um einen Ultrazentrifugationsschritt zeigt sich kein unspezifisches Signal. GFP *grün fluoreszendiereres Protein*, IQGAP1 *IQ motif containing GTPase activating protein 1*, F FLAG®, M2 *clone M2*, kDa *Kilodalton*.

3.1.1.3 Protein 4.1O interagiert mit dem zytoplasmatischen Teil von Nephtrin

HEK 293T Zellen wurden mit pcDNA3.V5.4.1O, pCDM8.slg.Nephtrin 3261-3723 bp und pCDM8.slg (Negativkontrolle) transfiziert. Nach Lyse und Clearing mittels Ultrazentrifugation erfolgte ein Pulldown via Protein G.

Abb. 6A zeigt exemplarisch einen der resultierenden anti-V5 markierten Western Blots, ohne Nachweis unspezifischer Signale.

Die densitometrischen Daten bestätigten eine signifikante Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin nach Auswertung mittels *Mann-Whitney-U-Test* ($n = 7$, $p < 0,001$, Abb. 6B).

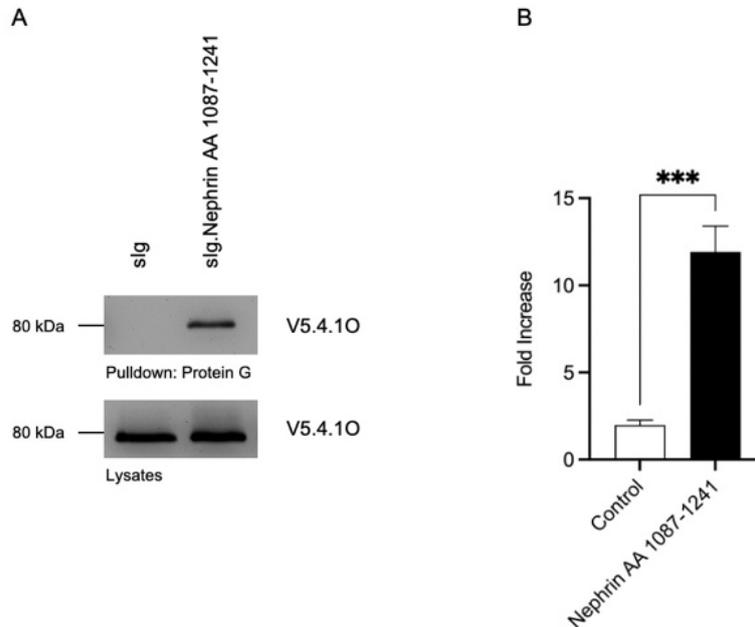


Abb. 6: Interaktion von Protein 4.1O mit dem zytoplasmatischen Teil von Nephrin. A HEK 293T Zellen wurden so transfiziert, dass sie slg, slg.Nephrin AA 1087-1214 und V5-getagged 4.1O überexprimieren. Es erfolgte ein Pulldown via Protein G mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung der Proben, Western Blot und Immunmarkierung mit anti-V5. Das zusätzliche Preclearing konnte unspezifische Hintergrundsignale wirksam reduzieren. slg *surface immunoglobuline*, AA *amino acids*, kDa *Kilodalton*. B Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Mann-Whitney-U-Test*. Sie bestätigt eine hohe Signifikanz der Interaktion von 4.1O mit Nephrin ($n = 7$, $p < 0,001$).

3.1.1.4 Nephrin AA 1158-1190 enthält die 4.1O-Interaktionsdomäne

Im Rahmen von Vorarbeiten wurde die für die Interaktion mit 4.1O relevante Domäne von Nephrin durch Truncation-Mapping auf den Aminosäurebereich AA 1158-1190 eingegrenzt. Zur Reproduktion dessen in optimierter Abbildungsqualität wurden HEK 293T Zellen mit pCDM8.F.4.1O sowie verschiedenen Plasmiden, deren Inserts für C-terminale Bereiche von Nephrin codieren (vgl. Abb. 7B) co-transfiziert. Als Kontrolldatenpunkt diente ein Ansatz mit slg und F.4.1O. Nach Clearing erfolgte der Pulldown via Protein G und die Markierung der geblotteten Proteinbanden mit anti-FLAG[®] M2.

Abb. 7A zeigt einen für das Nephrin-Truncation-Mapping repräsentativen Western Blot ohne unspezifisches Hintergrundsignal und bestätigt, dass die Nephrin/4.1O-Interaktionsdomäne innerhalb der AA 1158-1190 von Nephrin liegt.

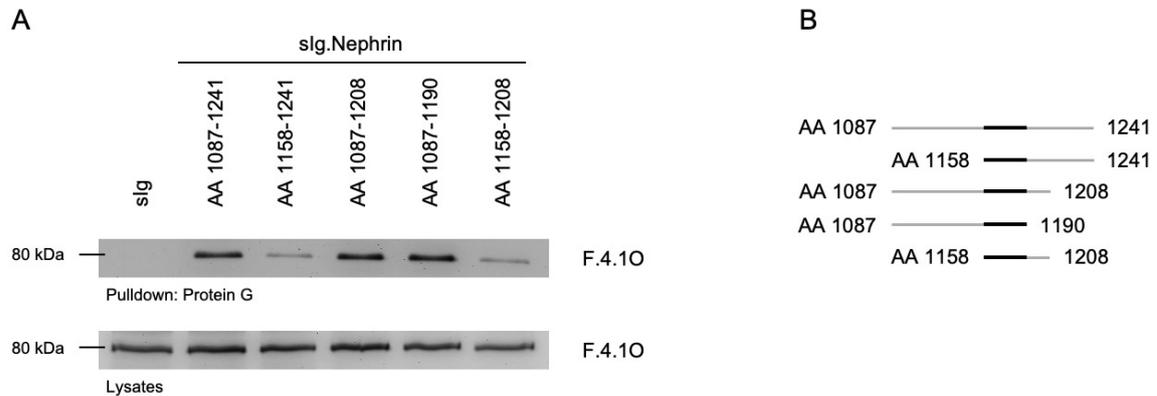


Abb. 7: Eingrenzung der Interaktionsdomäne von Nephrin mit Protein 4.1O durch Truncation Mapping. A slg als Negativkontrolle, FLAG[®]-getaggttes 4.1O sowie unterschiedliche Truncations des cytoplasmatischen Teils von Nephrin wurden durch HEK 293T Zellen überexprimiert und mittels Protein G präzipitiert. Nach Preclearing der Proben zeigt sich im anti-FLAG[®]-markierten Western Blot kein unspezifisches Signal. slg *surface immunoglobuline*, F FLAG[®], AA *amino acids*, kDa *Kilodalton*. B Die *minimally needed interaction domain* (schwarz) von Nephrin für die Bindung an 4.1O konnte anhand der Western Blot Resultate auf AA 1158-1190 eingegrenzt werden.

3.2 Interaktionsstudien

3.2.1 Protein 4.1O AA 484-553 enthält die Nephrin-Interaktionsdomäne

In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe gelang es durch Truncation Mapping, den für die Interaktion mit Nephrin erforderlichen Bereich von Protein 4.1O auf die C-terminale Domäne (CTD), entsprechend AA 450-553, einzugrenzen. 4.1O AA 506-553 wurde in weiterführenden Versuchen als *minimally needed interaction domain* charakterisiert. Ziel war es nun, einerseits die Resultate nach methodischer Optimierung zu prüfen und andererseits die hieraus abgeleitete Hypothese, dass 4.1O AA 1-505 keine Interaktion mit Nephrin zeigt, zu testen.

Dafür wurde das Konstrukt pCDM8.F.4.1O 1-1515 bp mittels PCR-Klonierung generiert. Es erfolgte die Transfektion von HEK 293T Zellen mit pCDM8.Nephrin, pCDM8.F.4.1O 1-1662

bp (AA 1-553), pCDM8.F.4.1O 1-1515 bp (AA 1-505), pCDM8.F.4.1O 1350-1662 bp (AA 450-553), pCDM8.F.4.1O 1452-1662 bp (AA 484-553), pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp (AA 506-553) sowie pCDM8.F.GFP als Negativkontrolle. Nach Co-Immunpräzipitation mit Anti-FLAG® M2 Agarosebeads wurden die Proteingemische gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen geblottet, die dann mit anti-Nephrin markiert wurden.

Es zeigte sich, entgegen der eingangs formulierten Hypothese, eine Interaktion von Protein 4.1O AA 1-505 mit Nephrin, während sich für 4.1O AA 506-553 keine Protein-Protein-Interaktion reproduzieren ließ. Stattdessen stellte 4.1O AA 484-553 die kleinste Proteindomäne dar, die als Bindungspartner für Nephrin identifiziert werden konnte.

In einem nächsten Schritt wurde daher das Konstrukt pCDM8.F.4.1O 1-1449 bp kloniert und der o. g. Versuchsaufbau um einen Datenpunkt mit 4.1O AA 1-483 und Nephrin ergänzt.

Abb. 8A zeigt exemplarisch einen resultierenden Western Blot mit anti-Nephrin-Markierung. Das Truncation Mapping charakterisiert die C-terminal gelegenen AA 484-553 von Protein 4.1O als Nephrin-Interaktionsdomäne (Abb. 8B). Konkordant dazu ist das Signal für 4.1O AA 1-483 densitometrisch vergleichbar mit der Negativkontrolle (Abb. 8C) und daher a. e. unspezifisch.

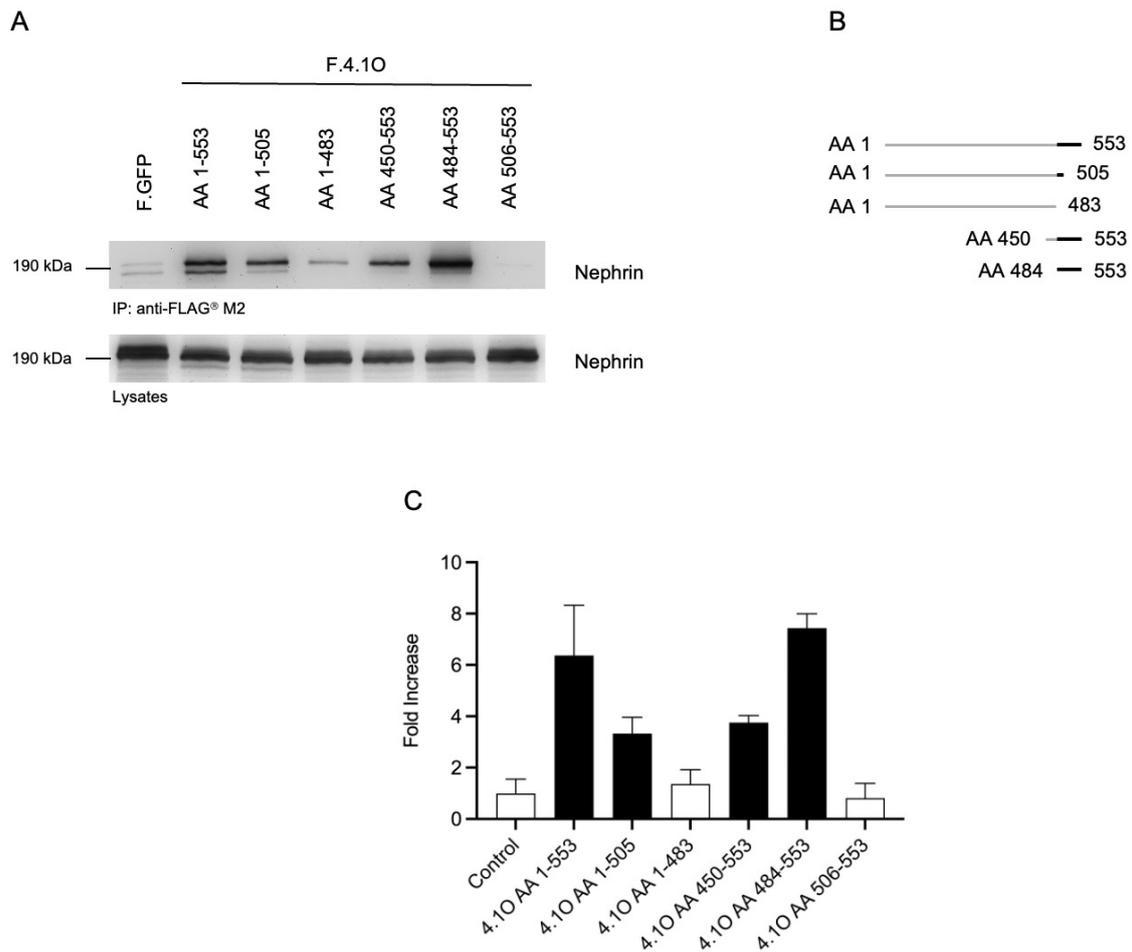


Abb. 8: Eingrenzung der Interaktionsdomäne von Protein 4.10 mit Nephrin durch Truncation Mapping. A HEK 293T Zellen wurden so transfiziert, dass sie verschiedene 4.10-Truncations, Nephrin und FLAG[®]-getaggttes GFP (Kontrolle) überexprimieren. Es erfolgte eine Co-IP mittels Anti-FLAG[®] M2 Agarosebeads sowie anschließend ein Western Blot mit anti-Nephrin-Markierung. Für 4.10 AA 506-553 ist keine Interaktion mit Nephrin nachweisbar. GFP grün fluoreszendierendes Protein, F FLAG[®], M2 clone M2, AA amino acid, kDa Kilodalton. B Die minimally needed interaction domain (schwarz) von Protein 4.10 für die Bindung an Nephrin liegt innerhalb der AA 484-553. C Die graphische Darstellung der Blot-Densitometrien (n = 2) veranschaulicht, dass 4.10 AA 506-553 nicht und 4.10 AA 1-483 a. e. unspezifisch mit Nephrin interagieren.

3.2.1.1 Protein 4.10 AA 506-553 ist nach Transfektion in HEK 293T Zellen auf mRNA-Ebene, nicht aber auf Protein-Ebene nachweisbar

Abb. 8 zeigt, dass sich die in Vorarbeiten beschriebene Interaktion von Protein 4.10 AA 506-553 mit Nephrin nicht reproduzieren ließ. Input-Blots (anti-FLAG[®] M2 Markierung), erbrachten den Expressionsnachweis für alle transfizierten Konstrukte, mit Ausnahme von 4.10 AA 506-553 (Abb. 9).

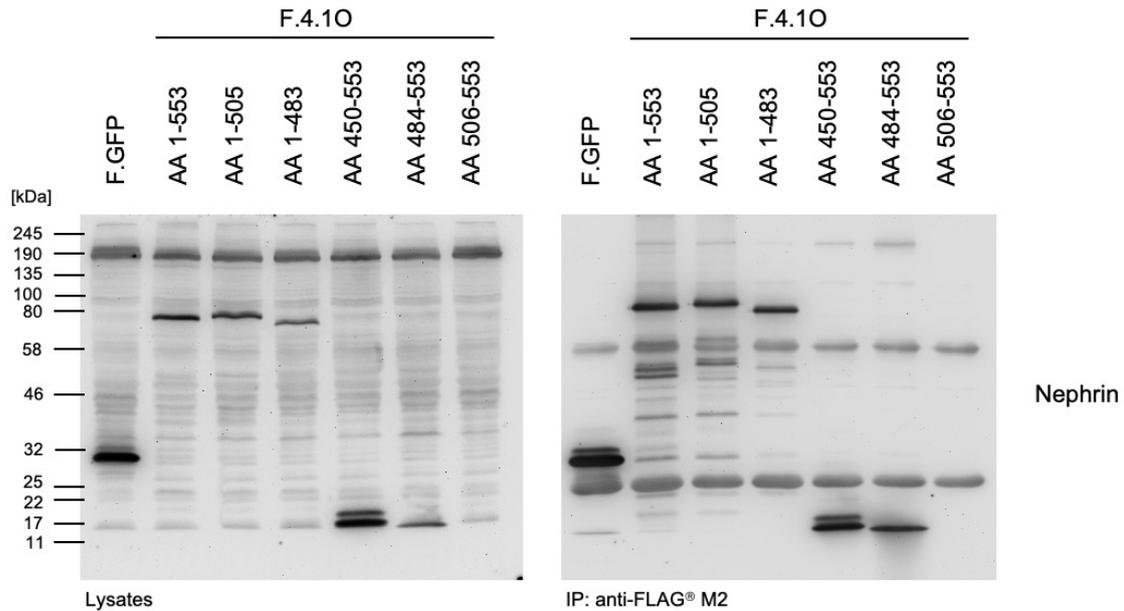


Abb. 9: Input-Blots zum Expressionsnachweis der 4.1O-Truncations. Die in Abb. 8 gezeigten Nitrocellulose-Membranen wurden im Anschluss an die Inkubation mit anti-Nephtrin zusätzlich mit anti-FLAG® M2 markiert. F.4.1O AA 506-553 ist nicht nachweisbar. GFP grün fluoreszendierendes Protein, F FLAG®, M2 clone M2, AA amino acid, kDa Kilodalton.

Es erfolgte eine Verkürzung der Trennphase im Rahmen der SDS-Gelelektrophorese, ein Wechsel von Nitrocellulose- auf PVDF-Membranen mit zudem kleinerer Porengröße sowie eine Reduktion der Blotdauer. Auch unter diesen modifizierten Bedingungen gelang es nicht, 4.1O AA 506-553 im Western Blot zu detektieren.

Ein alternatives Verfahren zur Immobilisierung und zum semi-quantitativen Nachweis von Proteinen stellt der Dot Blot dar. Ziel war es hiermit, unabhängig von methodischen Konditionen, die beim Western Blot das Proteinsignal beeinflussen können, einen Expressionsnachweis für 4.1O AA 506-553 zu führen.

HEK 293T Zellen wurden mit pCDM8 (Negativkontrolle), pCDM8.F.GFP (Positivkontrolle), pCDM8.F.4.1O 1452-1662bp (Positivkontrolle mit ähnlichem Molekulargewicht des codierten Proteins) sowie verschiedenen Amplifikaten von pCDM8.F.4.1O 1518-1662bp transfiziert. Nach Ernte und Lyse wurden unterschiedliche Volumina der generierten Proben manuell nach Dot-Blot-Technik auf Nitrocellulose- und PVDF-Membranen aufgetragen.

Abb. 10 zeigt die resultierenden Dot Blots nach Immunmarkierung mit anti-FLAG® M2. Auch hier ließ sich keine Expression von 4.1O AA 506-553 objektivieren.

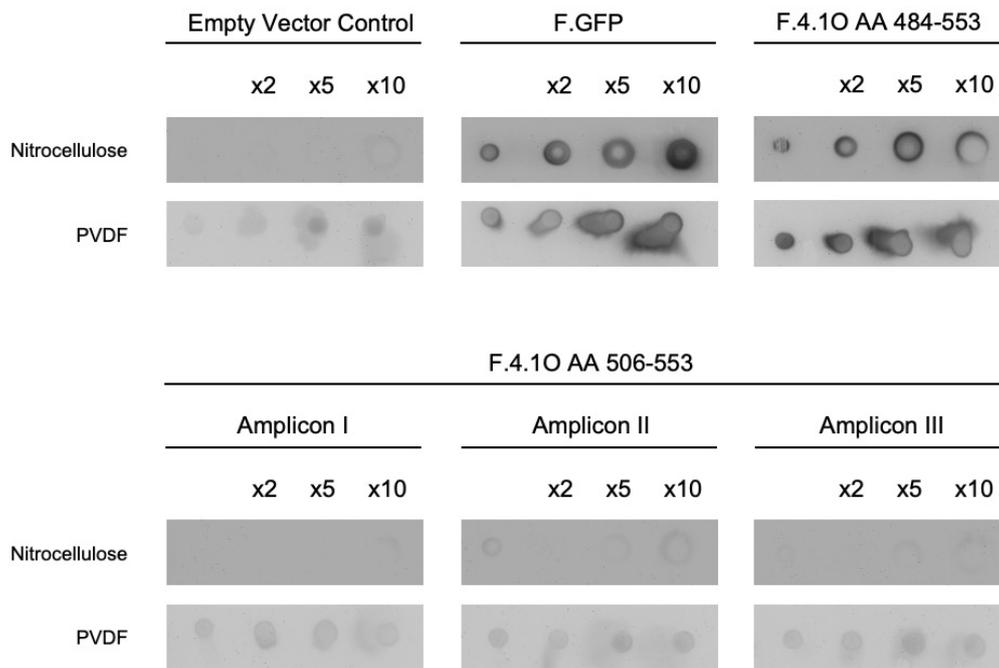


Abb. 10: Dot-Blots zum semi-quantitativen Nachweis von Protein 4.1O AA 506-553. HEK 293T Zellen wurden mit unterschiedlichen Amplifikaten von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp (Expressionsprodukt F.4.1O AA 506-553) transfiziert. pCDM8 diente als Negativkontrolle, pCDM8.F.GFP und pCDM8.F.4.1O 1452-1662bp (Expressionsprodukt F.4.1O AA 484-553) als Positivkontrollen. Nach Ernte und Lyse wurden unterschiedliche Volumina (x2, x5, x10) der Proben in Dot Blot Technik auf Nitrocellulose- und PVDF-Membranen aufgetragen. Die anschließende Immunmarkierung mit anti-FLAG® M2 ergab keinen Nachweis von F.4.1O AA 506-553 auf Proteinebene. F FLAG®, AA amino acid, PVDF Polyvinylidenfluorid.

Die Ergebnisse führten zu der Frage, ob 4.1O AA 506-553 entweder in HEK 293T Zellen nicht transkribiert, nicht translatiert oder aber posttranslational degradiert wird. Ziel war es daher, zu untersuchen, ob das Konstrukt auf mRNA-Ebene nachweisbar ist.

Hierfür wurden HEK 293T Zellen mit pCDM8 (Leervektor als Negativkontrolle), pCDM8.F.4.1O und zwei verschiedenen Amplifikaten von pCDM8.F.4.1O 1518-1662bp transfiziert und geerntet. Es folgte die RNA-Extraktion, reverse Transkription in cDNA und Vervielfältigung via PCR mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der Produkte.

Abb. 11 zeigt die resultierenden DNA-Banden im 1,5%-Agarosegel. Für beide Amplifikate von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp gelang ein Transkriptionsnachweis.

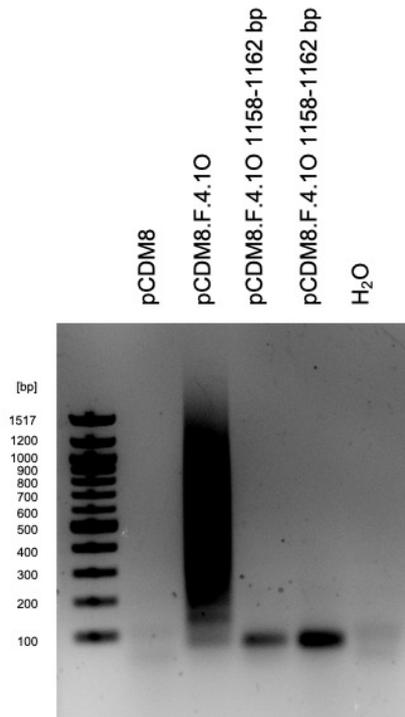


Abb. 11: Nachweis der Expression von pCDM8.F.4.1O 1158-1162 bp auf mRNA-Ebene durch RT-PCR. HEK 293T Zellen wurden mit pCDM8 (Negativkontrolle), pCDM8.F.4.1O (Positivkontrolle) und zwei verschiedenen Amplifikaten von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp transfiziert. In der anschließenden RT-PCR ist das Insert von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp nachweisbar. pCDM8 *eukaryotischer Expressionsvektor*, F *FLAG*[®], AA *amino acid*, bp *base pairs*.

3.2.2 NCK2 beeinflusst konzentrationsabhängig die 4.1O/Nephrin-Interaktion

Präliminäre Daten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Interaktion des cytoplasmatischen Teils von Nephrin (AA 1087-1241) mit NCK2 durch das gleichzeitige Vorkommen von Protein 4.1O reduziert wird. Dies führte zu der Hypothese, dass die beiden Nephrin-Bindungspartner um ihre jeweilige Interaktionsdomäne kompetitieren.

Ziel war es, durch Transfektion unterschiedlicher Mengen von pCDM8.F.NCK2, das Vorhandensein eines möglichen Dosis-Wirkungs-Zusammenhangs zwischen dem quantitativen Vorkommen von NCK2 und der Interaktion von 4.1O mit Nephrin zu prüfen.

Hierfür wurden HEK 293T Zellen mit pCDM8.slg.Nephrin 3261-3723 bp, pcDNA3.V5.4.1O und je 2,5 µg, 5 µg oder 8 µg pCDM8.F.NCK2 bzw. der gleichen Menge eines pCDM8-Leervektors transfiziert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit pCDM8.slg, pcDNA3.V5.4.1O und 8 µg pCDM8 pro Zellschale. Nach Ernte und Lyse erfolgte ein Pulldown via Protein G mit anschließender SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting.

Die resultierenden Nitrocellulose-Membranen wurden auf Höhe der 58 kDa Bande durchtrennt und beide Teile mit verschiedenen Antikörpern immunmarkiert.

Der Membranteil oberhalb der 58 kDa Bande diente der Quantifizierung der 4.1O/Nephrin-Interaktion und wurde daher, entsprechend des Tags von Protein 4.1O, mit anti-V5 markiert. Die Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA. Im Anschluss wurden die densitometrischen Resultate der Datenpunkte mit NCK2 und ihre Kontrollen im Rahmen einer Post-hoc-Analyse (*Šidák-Test*) miteinander verglichen.

Abb. 12A stellt exemplarisch einen repräsentativen Western Blot dar. Es zeigt sich eine, für den Ansatz mit 8 µg signifikante, Reduktion der 4.1O/Nephrin-Interaktion durch die Anwesenheit von NCK2 (n = 8, p < 0,05, Abb. 12B). Dieser Zusammenhang ist im untersuchten µg-Bereich linear (Abb. 12C).

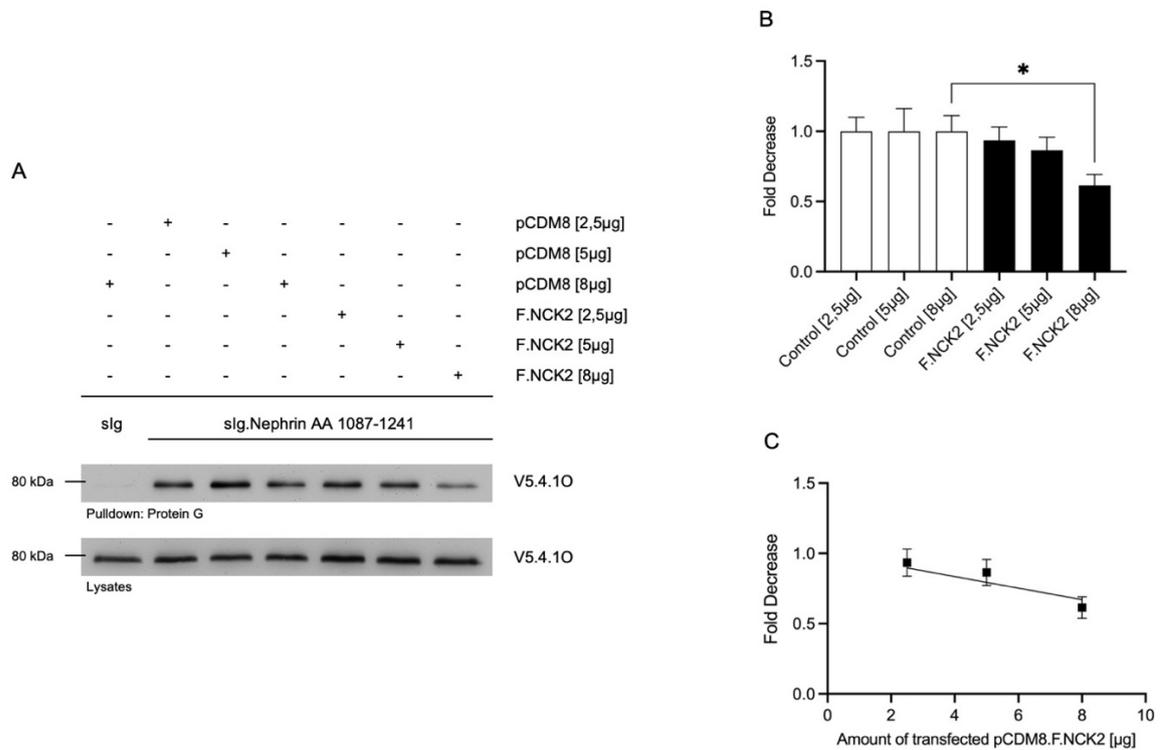


Abb. 12: Konzentrationsabhängiger Einfluss von NCK2 auf die Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin. A Der cytoplasmatische Teil von Nephrin, V5-getaggttes 4.1O und F.NCK2 in unterschiedlichen Konzentrationen wurden in HEK 293T Zellen überexprimiert. Als Kontrollen dienten Datenpunkte mit slg sowie Datenpunkte, die, anstelle von pCDM8.F.NCK2, mit aufsteigenden DNA-Mengen des Leervektors transfiziert wurden (µg-Angabe in Klammern). Es erfolgte ein Pulldown mittels immobilisiertem Protein G sowie ein anschließender Western Blot mit anti-V5-Markierung. pCDM8 *eukaryotischer Expressionsvektor*, slg *surface immunoglobuline*, F *FLAG®*, AA *amino acid*, kDa *Kilodalton*. B + C Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und *Šidák-Test*. In Anwesenheit hoher Konzentrationen von NCK2 wird die 4.1O/Nephrin-Interaktion signifikant geschwächt (n = 8, p < 0,05).

Unterhalb der 58 kDa Bande des Proteinmarkers diente der Western Blot dazu, die Interaktion von Nephrin mit F.NCK2 zu visualisieren. Daher wurde dieser Membranteil anti-FLAG® M2 markiert.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA.

Abb. 13 zeigt exemplarisch einen repräsentativen Western Blot aus der Versuchsreihe (A) sowie eine grafische Darstellung der densitometrischen Resultate (B). Nach Transfektion von 5 µg pCDM8.F.NCK2 pro Zellschale ist die Interaktion mit Nephrin maximal (n = 8, p = n. s.).

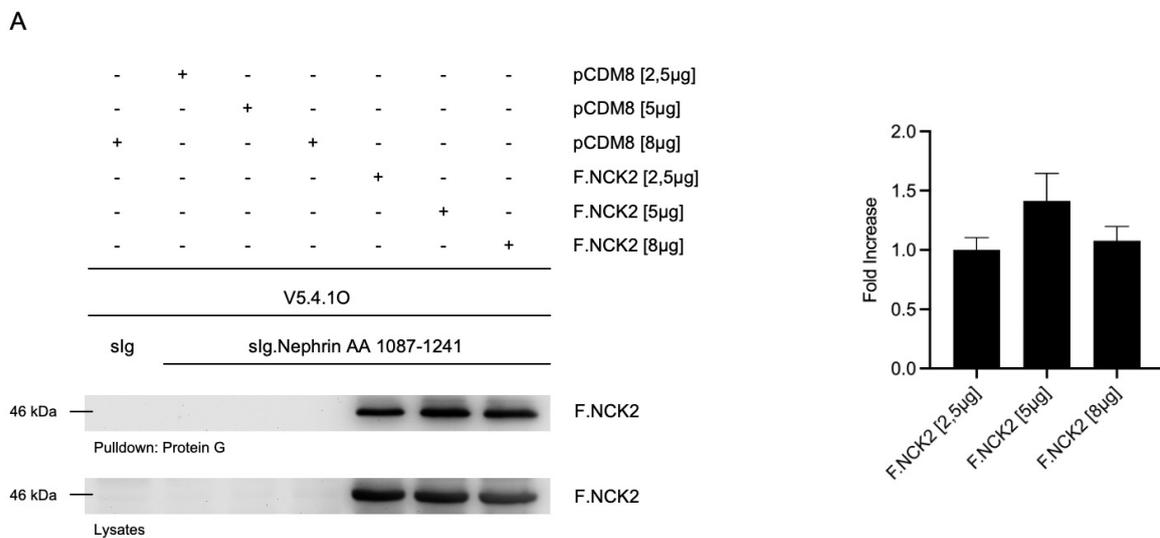


Abb. 13: Einfluss der NCK2-Konzentration auf die Interaktion mit Nephrin in Anwesenheit von Protein 4.10. A HEK 293T Zellen wurden so transfiziert, dass sie slg (Negativkontrolle), slg.Nephrin AA 1087-1241, V5.4.10 und unterschiedliche Mengen an F.NCK2 exprimieren (transfizierte DNA-Menge in Klammern). Als zusätzliche Kontrolle dienten Datenpunkte mit aufsteigenden Mengen an pCDM8 (Leervektor). An einen Pulldown mit Protein G schloss sich ein Western Blot an, der anti-FLAG® M2 markiert wurde. slg *surface immunoglobuline*, F FLAG®, AA *amino acid*, kDa *Kilodalton*. B Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA (n = 8, p = n. s.). Es zeigte sich, dass die Interaktion von NCK2 mit Nephrin bei mittleren NCK2-Dosen maximal ist.

3.3 Phosphorylierungsuntersuchungen

3.3.1 Protein 4.1O beeinflusst die Nephrin-Phosphorylierung an den NCK2-Bindungsstellen Y1176/1193 und Y1217 nur in Anwesenheit der Interaktionsdomäne AA 484-553

Die Nephrin-Tyrosinreste 1176/1193 und 1217 sind relevante Bindungsstellen für die SH2-Domäne von NCK2. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Phosphorylierung an den genannten Positionen in Anwesenheit von Protein 4.1O geringer ist. Im nächsten Schritt sollte nun geprüft werden, ob es sich bei diesem Effekt um eine direkte Folge der 4.1O/Nephrin-Interaktion handelt. Hierfür galt es, den Einfluss von Protein 4.1O AA 1-483, dem die Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin fehlt, auf die Phosphorylierung von Nephrin an Y1176/1193 und Y1217 zu erfassen und mit dem Einfluss von F.4.1O AA 1-553 (*full length*) hierauf zu vergleichen.

HEK 293T Zellen wurden mit pCDM8.F.GFP (Negativkontrolle), pCDM8.F.4.1O, pCDM8.F.4.1O 1-1449 bp (entsprechend AA 1-483) und pCDM8.Nephrin transfiziert und anschließend geerntet und lysiert. Es folgte eine Co-Immunpräzipitation unter Verwendung von Anti-FLAG® M2 Agarosebeads mit gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben und Western Blotting.

Abb. 14A zeigt exemplarisch für die Versuchsreihe einen repräsentativen Blot nach Immunmarkierung mit anti-Nephrin (Interaktionsblot). Dabei bestätigt sich zunächst, dass F.4.1O AA 1-553 mit Nephrin interagiert ($n = 11$, $p < 0,001$) und F.4.1O AA 1-483 keine Bindung mit Nephrin eingeht ($n = 11$, $p = n. s.$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Welch-ANOVA* und Post-hoc-Mehrfachvergleich mit *Dunnett-T3* (Abb. 14B).

Zwei weitere Aliquots der Proben wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Nitrocellulose-Membranen geblottet und anschließend mit anti-Phospho-Y1176/1193-Nephrin und anti-Phospho-Y1217-Nephrin markiert. Die statische Auswertung erfolgte für die Blots mit anti-Phospho-Y1176/1193-Nephrin-Markierung, aufgrund einer Verletzung der Normalverteilungsannahme, mittels nicht-parametrischem *Kruskal-Wallis-Test* und für die Blots mit anti-Phospho-Y1217-Nephrin-Markierung mittels einfaktorieller *ANOVA*.

Abb. 14C-F zeigt für beide Tyrosinphosphorylierungen sowohl repräsentative Western Blots, als auch grafische Darstellungen der Auswertung. Die Daten demonstrieren, dass 4.1O AA 1-483 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Nephrin an den genannten Tyrosinresiduen hat ($n = 11$, $p = n. s.$; $n = 8$, $p = n. s.$), sodass geschlussfolgert werden kann, dass der Effekt von Protein 4.1O auf Y1176/1193 und Y1217 an die Anwesenheit der Interaktionsdomäne gekoppelt ist.

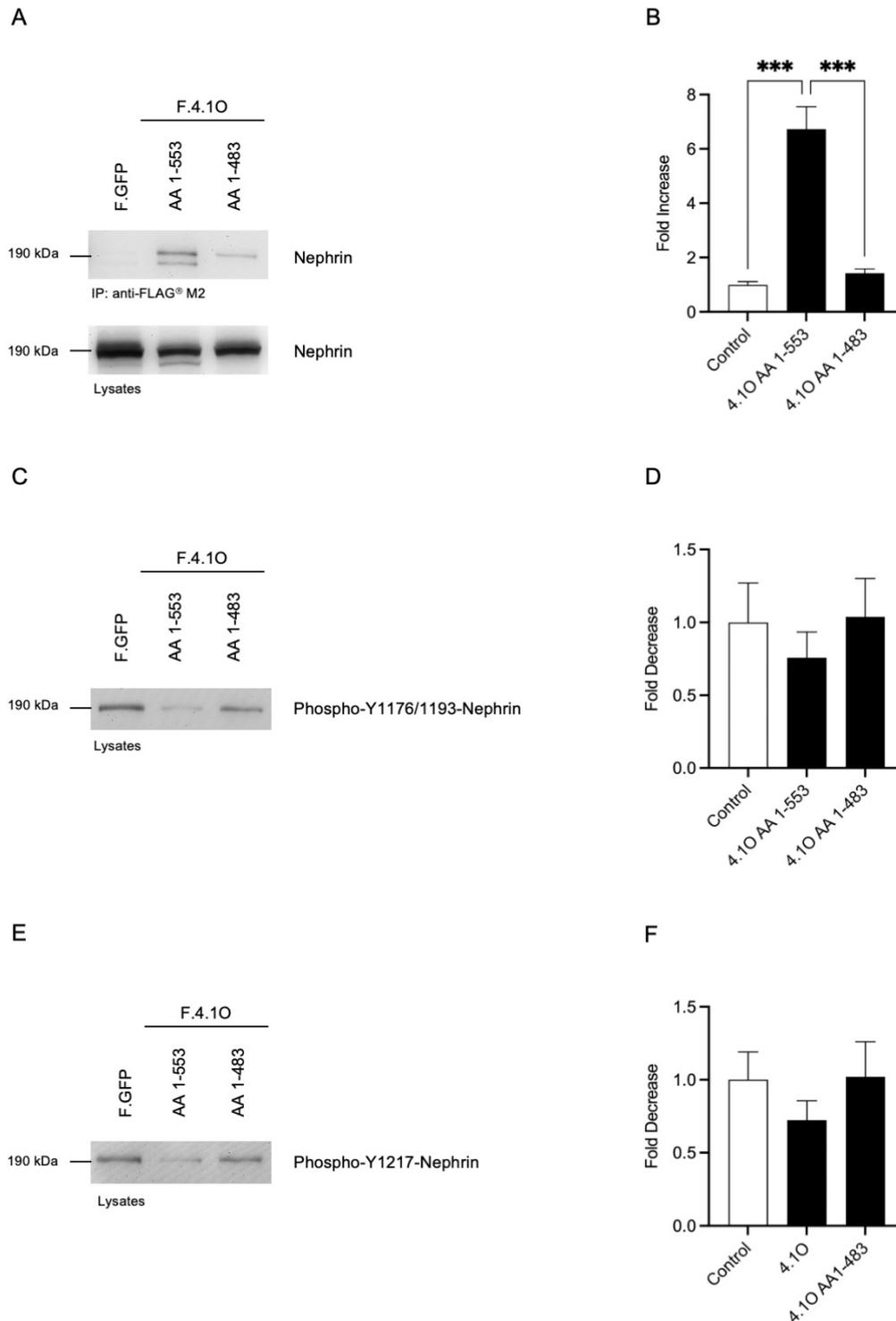


Abb. 14: Einfluss der 4.10-Interaktionsdomäne auf die Nephrin-Phosphorylierung an den NCK2-Bindestellen Y1176/1193 und Y1217. A Nephrin, F.4.10 AA 1-553 (*full length*), F.4.10 AA 1-483, dem die Interaktionsdomäne von 4.10 mit Nephrin fehlt, und F.GFP als Kontrolle wurden in HEK 293T Zellen exprimiert und mit anti-FLAG® M2 Agarosebeads präzipitiert. Der Interaktionsblot wurde mit anti-Nephrin markiert. GFP *grün fluoreszendierendes Protein*, F FLAG®, M2 *clone M2*, AA *amino acid*, Y *Tyrosin*, kDa *Kilodalton*. B Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Welch-ANOVA* und *Dunnett-T3*. F.4.10 AA 1-553 interagiert mit Nephrin ($n = 11$, $p < 0,001$), F.4.10 AA 1-483 nicht ($n = 11$, $p = n. s.$). C Aus den Proben wurde ein weiterer Blot generiert, der mit anti-Phospho-

Y1176/1193-Nephrin markiert wurde. D Die statistische Auswertung erfolgte mittels *Kruskal-Wallis-Test*. In Anwesenheit der Interaktionsdomäne von Protein 4.1O nimmt die Phosphorylierung von Nephrin an den Positionen Y1176 und Y1193 ab, während 4.1O AA 1-483 hierauf keinerlei Einfluss hat ($n = 11$, $p = n. s.$). E Ein dritter Western Blot wurde mit anti-Phospho-Y1217-Nephrin markiert. F In der statistischen Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der Nephrin-Phosphorylierung am Tyrosinrest 1217 in Anwesenheit der 4.1O-Interaktionsdomäne, für 4.1O AA 1-483 konnte kein Effekt beobachtet werden ($n = 8$, $p = n. s.$).

3.3.2 Hohe Glukosekonzentrationen beeinflussen durch die resultierende Hyperosmolarität die Tyrosin- und die Threonin-Phosphorylierung von Protein 4.1O nicht signifikant

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin durch eine erhöhte Glukosekonzentration und die hieraus resultierende Hyperosmolarität signifikant reduziert wird, ohne dass bis dato der zugrundeliegende Mechanismus identifiziert werden konnte. Ein möglicher Ansatzpunkt ergab sich daraus, dass vorangegangene Inhibitorversuche die Relevanz einer Phosphorylierung der Aminosäurereste T521 und Y529 für die Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin demaskierten. Ziel war es, durch Modifikationen des Zellkulturmediums Hyperglykämie und Hyperosmolarität zu simulieren, um so den Einfluss dieser beiden Bedingungen auf die Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung von Protein 4.1O zu untersuchen.

HEK 293T Zellen wurden mit pCDM8.F.4.1O und pCDM8.F.GFP als Negativkontrolle transfiziert. Nach Abschluss der Transfektion erfolgte der Mediumwechsel für jeden Datenpunkt entsprechend der gewünschten Versuchsbedingungen (Glukose [5,5 mM], Glukose [25 mM] und Glukose [5,5 mM] + Mannitol [19,5 mM] als osmotische Kontrolle). An Ernte und Lyse schloss sich eine Immunpräzipitation unter Verwendung von Anti-FLAG[®] M2 Agarosebeads an. Die Proben wurden drei Mal geblottet und die Membranen jeweils unterschiedlich markiert (anti-FLAG[®] M2, anti-Phospho-Y und anti-Phospho-T-P).

Abb. 15A zeigt exemplarische Western Blots. Die statistische Auswertung erfolgte für beide Phosphorylierungsuntersuchungen mittels *Kruskal-Wallis-Test*. Dabei konnte eine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von Protein 4.1O unter Einfluss einer erhöhten Glukosekonzentration und Osmolarität beobachtet werden (Abb. 15B), diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($n = 6$, $p = n. s.$). Für die Threoninphosphorylierung ergab sich keinerlei Effekt durch die Wahl des Zellkulturmediums ($n = 6$, $p = n. s.$, Abb. 15C).

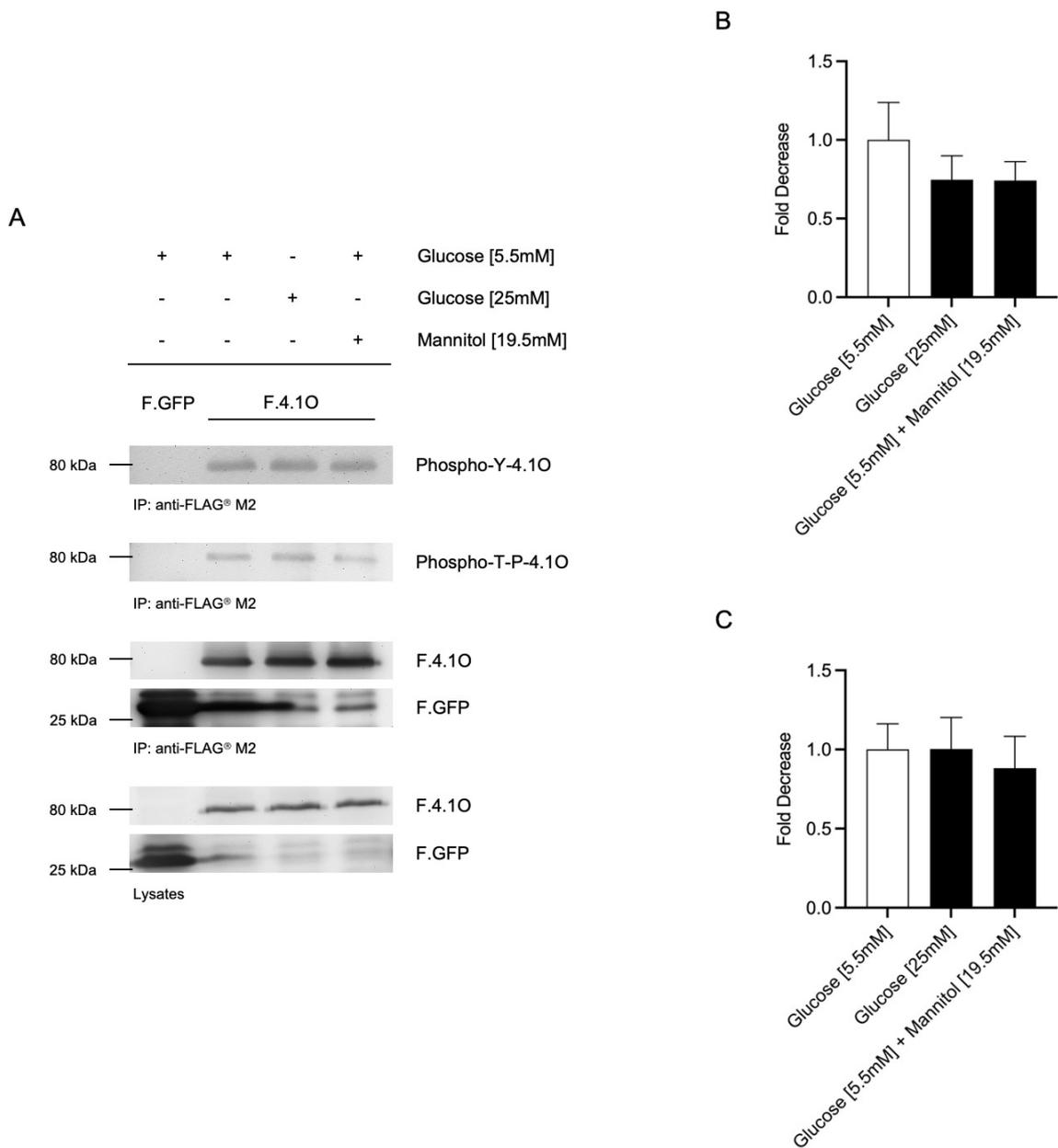


Abb. 15: Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung von Protein 4.10 in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration und Osmolarität des Zellkulturmediums. A HEK 293T Zellen wurden mit pCDM8.F.GFP (Negativkontrolle) und pCDM8.F.4.10 transfiziert. Es erfolgte eine Immunpräzipitation unter Verwendung von Anti-FLAG® M2 Agarosebeads. Die Proben wurden drei Mal geblottet und mit anti-FLAG® M2 (Inputblot) sowie anti-Phospho-Tyrosin und anti-Phospho-Threonin-Prolin markiert. GFP *grün fluoreszendierendes Protein*, F *FLAG®*, M2 *clone M2*, AA *amino acid*, Y *Tyrosin*, T *Threonin*, P *Prolin*, kDa *Kilodalton*. B Die Tyrosin-Phosphorylierung von Protein 4.10 wird durch Hyperosmolarität reduziert, wobei der Zusammenhang nicht signifikant ist (*Kruskal-Wallis-Test*, n = 6, p = n. s.). C Die Threonin-Phosphorylierung von Protein 4.10 wird nicht durch die Glukosekonzentration oder Osmolarität des Zellkulturmediums beeinflusst (*Kruskal-Wallis-Test*, n = 6, p = n. s.)

4 Diskussion

Im Jahre 2009 identifizierten Pezzolesi et al. im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie FRMD3 als Kandidatengen für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie in kaukasischen Typ 1 Diabetikern (10). Sein Genprodukt Protein 4.1O wurde in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe als Crosslinker zwischen Schlitzmembrankomponenten und dem podozytären Zytoskelett charakterisiert (52) und zeigt als solcher im Tiermodell eine besondere Relevanz für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere (56).

Die vorliegende Arbeit ergab neue Erkenntnisse zum *in vitro* Einfluss von erhöhten Glukosekonzentrationen und Hyperosmolarität auf den Phosphorylierungsstatus von Protein 4.1O, zum Effekt der 4.1O/Nephrin-Interaktion auf die Nephrinphosphorylierung an bekannten und regulatorisch hoch relevanten YDxV-Motiven sowie zur Konkurrenz der beiden Adapterproteine 4.1O und NCK2 um die Bindung an Nephrin. Darüber hinaus konnten, nach Optimierung der etablierten Co-Immunpräzipitationsmethodik, einige bisherige 4.1O-Interaktionsblots in verbesserter Abbildungsqualität reproduziert und die vorbeschriebene Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin revidiert werden.

4.1 Diskussion der Methodik und ihrer Optimierung

4.1.1 Zelllinie HEK 293T als Expressionstool

HEK 293T Zellen sind aufgrund ihrer einfachen Kultivierungsbedingungen, stabilen Teilungsrates sowie hohen Transfektionseffizienz und Proteinproduktionskapazität beliebte Expressionstools (134).

Da sie humanen Ursprungs sind, besitzen sie die Fähigkeit, sowohl die korrekte Faltung der synthetisierten Polypeptidketten, als auch deren posttranslationale Modifikationen so zu realisieren, dass reife und funktionelle Proteine erzeugt werden, deren Stabilität und biologische Aktivität eine hohe Vergleichbarkeit mit der *in vivo* Situation aufweist (135).

Entsprechend den Empfehlungen der ATCC (*American Type Culture Collection*) und weiterer Zellkultur-Distributoren wurden die HEK 293T Zellen in DMEM mit 25 mM D-Glukose, stabilem Glutamin und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Einer Stoffmengenkonzentration von 25 mM entspricht eine Massenkonzentration von 450 mg/dl

D-Glukose. Durch die Wahl des Zellkulturmediums wurden so Bedingungen geschaffen, die mit einer hyperglykämischen Stoffwechsellage vergleichbar sind.

Für die Ziele der Arbeit, zum einen die Protein-Protein-Interaktionen eines mit diabetischer Nephropathie assoziierten Polypeptids zu spezifizieren und zum anderen Phosphorylierung als eine der posttranslationalen Modifikationen zu untersuchen, stellen HEK 293T Zellen in Zusammenschau ihrer Fähigkeiten und Kulturbedingungen eine ideale Zelllinie dar.

In vitro Modelle mit Podozyten kämen grundsätzlich in Betracht, um die Wertigkeit der Daten hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation zu steigern, sind aber für Fragestellung wie diese bis dato nicht etabliert, weil sie in Kultur keine reife Schlitzmembran ausbilden (65, 136) und auch nicht alle für den Zelltyp charakteristischen Proteine konstitutiv exprimiert werden (137).

In jedem Fall muss ein Transfer der *in vitro* generierten Erkenntnisse auf die Vorgänge im Organismus stets kritisch hinterfragt werden.

4.1.2 Co-Immunpräzipitation/Western-Blot Assay

Obgleich in den vergangenen Jahren einige effiziente methodische Konzepte zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen etabliert wurden (138, 139), gilt die Co-Immunpräzipitation in Kombination mit nachfolgendem Western Blotting weiterhin als Standardverfahren in der Interaktionsproteomik (140, 141).

Grund hierfür ist, neben der einfachen und zugleich kostengünstigen Durchführbarkeit, v. a. die Möglichkeit, Protein-Komplexe unter *in vivo* ähnlichen Verhältnissen zu detektieren. Die Polypeptide weisen ihre natürlichen posttranslationalen Modifikationen auf, liegen in nativer Konformation vor und reagieren unter nicht-denaturierenden Bedingungen miteinander (142).

Diesen methodischen Stärken steht gegenüber, dass Co-Immunpräzipitationen keine transienten Interaktionen oder Bindungen mit niedriger Affinität abbilden können und dass die Protein-Protein-Interaktion als solche, durch sterische Hinderung und Maskierung von Epitopen, die Anlagerung der präzipitierenden Antikörper an das Antigen so erschweren kann, dass falsch-negative Resultate entstehen.

Die Verwendung von Protein-Tags erlaubt es, die Spezifität des Assays zu steigern (143), obgleich es hierbei zu beachten gilt, dass dieser Einfluss auf die intrazelluläre Proteinlokalisierung, Membranbindung, Molekülstabilität und -ladung sowie Homodimerisierungsaktivität der Polypeptide nehmen können.

Die größte methodische Limitation von Co-Immunpräzipitationen besteht jedoch darin, dass ein Interaktionsnachweis nicht in jedem Fall eine direkte Bindung zweier Proteine impliziert,

sondern mögliche Crosslinker eine indirekte Interaktion vermitteln können. Dieser interpretatorisch wichtige Aspekt wird in der Literatur oft vernachlässigt (140).

4.1.2.1 High Background Troubleshooting – Clearing durch Ultrazentrifugation

Für jeden Pulldown und jede Co-Immunpräzipitation wird zur Identifizierung falsch-positiver Ergebnisse eine adäquate Negativkontrolle vorausgesetzt (138).

Unspezifische Signale in der Kontrollbande des Western Blots sind häufige methodische Probleme des Assays und schwächen die Aussagekraft der Ergebnisse. Sie resultieren aus einer unspezifischen Bindung von Proteinen des Zelllysats an das Reaktionsgefäß, die Beads oder den präzipitierenden Antikörper.

Potenzielle Ansatzpunkte im Rahmen des Troubleshootings sind ein (Pre-)Clearing der Lysate, eine Modifikation der Zusammensetzung von Lyse- und Waschpuffer, intensivierete Waschschrirte oder die Verwendung alternativer Reagenzien, z. B. mit Wechsel auf spezifischere Antikörper oder Umstellung von Agarosebeads auf magnetische Beads mit niedrigerer Proteinbindekapazität, dafür aber höheren Kosten.

Die ideale Zusammensetzung des Lysepuffers hängt von der zellulären Lokalisation der Zielproteine (Membran, Zytosol, Nukleus) ab, weil hierüber determiniert wird, unter welchen Bedingungen sie sich freisetzen lassen. Denaturierende Lysepuffer enthalten ionische Detergenzien und haben dadurch eine höhere Stringenz als nicht-denaturierende Lysepuffer (144). Ihr Nachteil ist, dass die Proteine ihre native Konformation verlieren (145) und so die Aussagekraft über *in vivo* Prozesse begrenzt wird. Durch Steigerung der Ionenstärke lassen sich auch nicht-denaturierende Lysepuffer stringenter gestalten. Auf diese Weise werden zwar unspezifische Bindungen reduziert, gleichzeitig können aber spezifische Interaktionen noch vor Beginn der Präzipitation so geschwächt werden, dass ein falsch-negatives Resultat entsteht (146). Aus den genannten Gründen wurde daher hier im Rahmen der methodischen Optimierungen auf eine Umstellung des Lysepuffers verzichtet.

Ebenfalls häufig empfohlen wird ein Preclearing, bei dem die Lysate vor Zugabe des Antikörpers mit einem im Anschluss verworfenen Aliquot der Beads inkubiert werden. Dadurch sollen Moleküle, die sich unspezifisch an die Bead-Oberfläche anlagern, aus dem Lysat entfernt werden, bevor der Präzipitationsprozess beginnt (147). Im Rahmen der Versuche erfolgte entweder ein Pulldown via Protein G (*s/g*-Tag) unter Ausschluss eines Antikörpers oder eine Immunpräzipitation mit den monoklonalen Antikörpern anti-FLAG[®] M2 (FLAG[®]-Tag), die in kommerziell erhältlicher Form über Hydrazide kovalent an

Agarosebeads gebunden und damit immobilisiert sind. Unter Beibehaltung der etablierten Versuchsaufbauten kam ein solches Preclearing der Lysate daher nicht in Betracht (148). Alternativ nutzen einige Autoren ein Preblocking der Beads mit bovinem Serumalbumin (BSA Fraktion V), um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Aufgrund der chemischen Eigenschaften von BSA handelt es sich hierbei jedoch nur für Beads mit hydrophober Oberfläche um ein geeignetes Verfahren (148). Dies trifft auf die hier verwendeten Beads auf Agarose-Basis nicht zu (149).

Bonifacino et al. empfehlen bei Auftreten eines unspezifischen Hintergrundsignals, das Clearing der Lysate um einen Ultrazentrifugations-Schritt zu erweitern (147). Dadurch werden unlösliche Proteinaggregate, die im Rahmen der Co-Immunpräzipitation unspezifisch an Beads und Antikörper bzw. Protein G binden können, effizienter pelletiert. Gleichzeitig findet durch das Umpipettieren in Ultrazentrifugations-Tubes ein zusätzlicher Wechsel des Reaktionsgefäßes statt, was darüber hinaus Komponenten eliminiert, die unspezifisch an deren Wandungen binden. Wie in 3.1.1. demonstriert, gelang es auf diese Weise für die beschriebenen Versuchsaufbauten das Hintergrundsignal deutlich zu reduzieren.

Aufgrund der technischen Einfachheit wird in *Troubleshooting*-Protokollen häufig als erstes die Anzahl der IP-Waschschritte gesteigert. Da die Beads jedoch auch nach Zentrifugation kein festes Pellet bilden, gehen bei jedem Waschpufferwechsel immer einige Proteinträger verloren, was die Ausbeute reduziert und aussagekräftige quantitative Vergleiche zwischen Präzipitationen unmöglich macht. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf additive Waschschritte verzichtet. Abhilfe kann hier, wie von Brymora et al. vorgestellt, die Verwendung von Mikrosäulen schaffen, die die festen Bestandteile des Immunpräzipitationsansatzes binden und so ein wirksameres Waschen ermöglichen als mit der in 2.2.2.1. vorgestellten Technik (150), bei der ein Teil der Waschwirkung dadurch verloren geht, dass sich der Überstand aufgrund des weichen Pellets nie vollständig abnehmen lässt.

Steigert man die Stringenz des Waschpuffers durch eine höhere Konzentration des nicht-ionischen Detergenz Triton® X-100 bzw. eine zunehmende Ionenstärke, kommt es zu einem Verlust an Signalintensität im nachfolgenden Western Blot (vgl. 3.1.1.).

Triton® X-100 ist eine polydisperse Zubereitung von 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl hydroxypoly(oxyethylen) mit einer ungeladenen, hydrophilen Hauptgruppe aus durchschnittlich 10 Ethylenoxid-Einheiten (151). Es destabilisiert Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Interaktionen und solubilisiert Membranproteine, indem die hydrophoben Proteinbereiche in Detergenz-Mizellen eingebaut und so maskiert werden. Spezifische Protein-Protein-Interaktionen bleiben dabei erhalten, während es zur Reduktion von Hintergrundsignalen kommt, die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhen. Yang et al.

zeigten 2008 in Immunpräzipitationsversuchen, dass bereits geringe Konzentrationen nicht-ionischer Tenside effektiv unspezifische Bindungen reduzieren, aber gleichzeitig mit zunehmender Konzentration des Detergenz, oberhalb eines bestimmten proteinspezifischen Schwellenwertes, der prozentuale Anteil des aus der Lösung präzipitierten Zielpolypeptids fällt. Sie postulierten, dass durch Einwirkung hoher Konzentrationen des Tensides nicht nur, wie in (152) gezeigt, die hochspezifische Antigen-Antikörper-Interaktion geschwächt wird, sondern dass dieser Effekt in noch stärkerem Maße für die deutlich empfindlicheren Protein-Protein-Interaktion gilt. Dies ist konkordant zu den Daten aus 3.1.1., die ebenfalls einen Signalverlust infolge einer Steigerung der Tensidkonzentration zeigen.

Der verwendete native Waschpuffer weist eine KCl-Endkonzentration von 150 mM auf und simuliert damit in Bezug auf seine Ionenstärke annähernd physiologische Bedingungen. Höhere Salzkonzentrationen können elektrostatische Wechselwirkungen stören und so unspezifische Bindungen reduzieren (153), aber auch Einfluss auf spezifische Protein-Protein-Interaktionen nehmen. Glaser *et al.* demonstrierten anhand eines Lumineszenz-Resonanz-Energietransfer-*Binding-Assays* mit verschiedenen NaCl-Konzentrationen, dass in Anwesenheit einer höheren Ionenstärke die Gleichgewichtsdissoziationskonstante einer Protein-Protein-Komplexbildungsreaktion steigt, also die Affinität der beiden Interaktionspartner zueinander abnimmt. Die Intensität dieses Effektes ist für jede Interaktion verschieden (154) und abhängig von den vorherrschenden chemischen Bindungsarten, auf denen sie beruht. Die verwendete Isoform 5 von Protein 4.1O hat ihren isoelektrischen Punkt bei 5.734 (*Tool Prot p_i*) und weist damit im alkalischeren IP-Waschpuffer eine negative Nettoladung auf. Über elektrostatische Wechselwirkungen lagern sich die Ionen des dissoziierten Salzes an die geladenen Aminosäurereste an und können so, wenn in hoher Konzentration vorhanden, Protein-Interaktionspartner aus ihren Bindungen verdrängen. Dies ist vereinbar mit dem in 3.1.1. gezeigten Signalverlust nach Steigerung der Ionenstärke des IP-Waschpuffers.

4.2 Diskussion der Interaktions- und Phosphorylierungsergebnisse

4.2.1 Eingrenzung der Interaktionsdomäne von 4.1O mit Nephrin

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe identifizierten durch Truncation Mapping die C-terminale Domäne von Protein 4.1O (AA 450-553) als den für die Interaktion mit Nephrin relevanten Proteinbereich und beschrieben 4.1O AA 506-553 als *minimally needed interaction domain* (52). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Interaktionsblots revidiert.

Ein neuerliches Truncation Mapping charakterisierte im Rahmen der vorliegenden Arbeit AA 484-553 von Protein 4.1O als Nephrin-Interaktions-Domäne und zeigte, konkordant hierzu, für 4.1O AA 1-483 kein Signal im Interaktionsblot.

Tools zur Proteinstrukturvorhersage, wie z. B. *PredictProtein* (155), ordnen dem für die 4.1O/Nephrin-Interaktion relevanten Bereich von Protein 4.1O eine helikale Konformation zu. AA 484-553 stellt einen Teil der Carboxy-terminalen Domäne (CTD) von Protein 4.1O dar, die als einzige Domäne zwischen den Mitgliedern der 4.1-Familie nicht konserviert ist (32). Während 4.1O mit seiner CTD, wie hier gezeigt, an den intrazellulären C-Terminus des Transmembranproteins Nephrin bindet, ist insbesondere für Protein 4.1R primär die FERM-Domäne als der für die Interaktion mit membranständigen Proteinen relevante Bereich beschrieben (156). Die CTD von Protein 4.1R ist ebenso primär helikal konfiguriert (157), dient aber v. a. der Interaktion mit cytoplasmatisch lokalisierten Proteinen (158, 159). Eine weitere Eingrenzung der innerhalb von 4.1O AA 484-553 liegenden *minimal binding domain* erwies sich mit den hier angewandten Methoden als technisch nicht realisierbar. Es war zwar möglich, durch RT-PCR die Transkription von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp zu zeigen, ein Expressionsnachweis von Protein 4.1O AA 506-553 gelang jedoch nicht.

Rechnerisch ergibt sich für das Proteinfragment anhand der Aminosäuresequenz, ohne Berücksichtigung etwaiger posttranslationaler Modifikationen, ein Molekulargewicht von 5,7 kDA (Tool *Prot pi*). Damit ist es deutlich kleiner als 20 kDA, was für die standardmäßig verwendeten Nitrocellulose-Membranen mit einem Poren-Durchmesser von 0,45 µm die empfohlene Mindestgröße der zu übertragenden Proteine darstellt. Zudem resultiert aus der Primärstruktur von 4.1O AA 506-553 nach der Kyte-Doolittle-Skala (160) ein GRAVY-Index von 0.09 (161), entsprechend einer leichten Hydrophobizität des Peptids. Damit sind PVDF-Membranen, mit ihrer ebenfalls hydrophoben Oberfläche, zur Immobilisierung von 4.1O AA506-553 gegenüber Nitrocellulose-Membranen zu bevorzugen. Nichtsdestotrotz war es auch unter Verwendung einer PVDF-Membran mit einer kleineren Porengröße

(0.2 µm) unter modifizierten Blot-Konditionen nicht möglich, 4.1O AA 506-553 mittels Western Blotting zu detektieren. Gleiches galt für Versuche in Dot Blot Technik, die es erlaubt, ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches und unabhängig von den Parametern des Elektrotransfers, Proben semi-quantitativ auf das Vorkommen des Zielproteins zu untersuchen.

In Zusammenschau der Resultate ergab sich somit die Schlussfolgerung, dass entweder keine Translation des mRNA-Transkripts erfolgt oder aber das Genprodukt 4.1O AA 506-553 unmittelbar posttranslational der Proteolyse zugeführt wird.

Sanger-Sequenzierungsergebnisse (Eurofins Genomics, Ebersberg, DE) belegen, dass der *Open Reading Frame* (ORF) von pCDM8.F.4.1O 1518-1662 bp frei von Mutationen ist und korrekt von einem Start- und Stop-Codon eingefasst wird. Dies lässt eine insuffiziente Translation als Ursache für den fehlenden Proteinnachweis in den Hintergrund treten und macht eine Degradation des trunkierten Proteins im Rahmen der zellulären Qualitätskontrolle wahrscheinlich. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht Teil dieser Arbeit. Weiterführende Versuche, z. B. unter Verwendung von Proteasom-Inhibitoren (162), könnten hilfreich sein.

4.2.2 Konkurrenz von 4.1O und NCK2 um Nephrin als Bindungspartner

Molekulare Schlüsselkomponente der glomerulären Schlitzmembran ist das transmembranäre Protein Nephrin, dessen C-Terminus über Scaffold-Proteine, wie NCK2 (87) und Protein 4.1O, mit dem podozytären Aktin-Zytoskelett verbunden ist (163).

Benachbarte Nephrin-Moleküle formieren sich durch trans-Interaktionen zwischen ihren extrazellulären Immunglobulin-Domänen (164) zu Clustern, in denen die Tyrosinreste ihres cytoplasmatischen Teils *Src family* Kinasen als Substrate dienen (83, 85). Über den Phosphorylierungsstatus der acht intrazellulär lokalisierten Y-Residuen werden zahlreiche Signalkaskaden mit Einfluss auf die podozytäre Integrität reguliert (88, 165).

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei den Positionen Y1176, Y1193 und Y1217 zu. Diese drei sind in YDxV-Motive integriert, die im phosphorylierten Zustand Adapterproteinen mit SH2-Domäne als Bindungsstelle dienen (82).

Gemäß dem Proteintool *Scansite 4.0* formiert sich innerhalb der Nephrin-Interaktionsdomäne von 4.1O (4.1O AA 484-553) eine SH2-Domäne, sobald 4.1O an seinem Tyrosinrest Y529 durch *Src family* Kinasen phosphoryliert wurde (166). Konkordant hierzu zeigen Daten der eigenen Arbeitsgruppe, dass Y529A- und Y529F-Punktmutationen zu einer signifikanten Reduktion der 4.1O-Nephrin-Bindung führen.

Weitere, gut charakterisierte Nephrin-Interaktionspartner mit *Src homology 2* Domänen entstammen der Nck-Proteinfamilie. NCK1 und NCK2 binden über ihre SH2-Domäne an die phosphorylierten Tyrosinresiduen Y1176, Y1193 und Y1217 von Nephrin (87). Sie verfügen N-terminal zudem über drei Tandem-SH3-Domänen, die sich an Prolin-reiche Motive, u. a. von N-WASP anlagern, was zur Aktivierung des Arp2/3-Komplexes und damit zur Aktinpolymerisation führt (167). Zudem rekrutiert Nephrin-gebundenes NCK, insbesondere NCK2, über seine SH3-Domänen die *Src family* Kinase Fyn, die im Sinne eines positiven Feedback-Loops, weitere Phosphorylgruppen auf Nephrin überträgt (168). Protein 4.1O und NCK2 zeigen somit nicht nur funktionelle Ähnlichkeit, indem sie beide als Adapter für Nephrin an das podozytäre Aktinzytoskelett dienen, sondern verfügen auch über das gleiche Strukturelement zur Anlagerung an die Nephrinmoleküle.

Es konnte gezeigt werden, dass die Nephrin/4.1O-Interaktionsdomäne innerhalb der AA 1158-1190 von Nephrin liegt, sodass der Tyrosinrest Y1176 für beide Scaffold-Proteine eine relevante Bindungsstelle darstellt, um die sie potenziell konkurrieren. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass die Interaktion von NCK2 mit Nephrin in Anwesenheit von Protein 4.1O abnimmt (52). Dosis-Wirkungs-Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit belegen, dass umgekehrt bereits kleine Mengen NCK2 ausreichend sind, um 4.1O aus seiner Bindung mit Nephrin zu verdrängen und dass dieser Effekt im untersuchten μg -Bereich proportional zur NCK2-Dosis weiter zunimmt.

New et al. identifizierten 2013 eine positive Korrelation zwischen dem Grad der Nephrin-Phosphorylierung und der zugeführten NCK2-Dosis (168), welche am ehesten über den beschriebenen Feedbackmechanismus zu erklären ist. Demnach hätte eine hohe NCK2-Konzentration auch eine verstärkte Phosphorylierung an Y1176 zur Folge, was die Affinität der SH2-Domäne von Protein 4.1O zu Nephrin steigern müsste. Trotzdem wird 4.1O bereits von kleinen NCK2-Dosen aus der Bindung verdrängt, was zum einen auf unterschiedliche Dissoziationskonstanten (ggf. K_d [Nephrin/NCK2] < K_d [Nephrin/4.1O]) hinweisen könnte und/oder über sterische Hemmung der Nephrin/4.1O-Interaktion durch vermehrte Anlagerung von NCK2 an die benachbarten Positionen Y1193 und Y1217 zu erklären wäre. Weiterführende Co-Expressionsversuche, z. B. mit Nephrin, Protein 4.1O und einer NCK2-Mutante ohne funktionale Fyn-rekrutierende SH3-Domänen, könnten Aufschluss über den Einfluss der NCK2-vermittelten Nephrinphosphorylierung auf die Competition zwischen Protein 4.1O und NCK2 geben.

Dass die Interaktion von NCK2 mit Nephrin in Anwesenheit von 4.1O bei hoher NCK2-Dosis abnimmt, scheint kontraintuitiv. Analog zur Hill-Gleichung (169), müsste ein Dosis-Wirkungs-Zusammenhang mit sigmoidalem Kurvenverlauf vorliegen, der sich daraus ergibt, dass rekrutiertes NCK2 eine vermehrte Nephrinphosphorylierung induziert und so die Anlagerung weiterer NCK2-Moleküle erleichtert wird.

Denkbar wäre daher, dass der beobachtete Effekt methodisch bedingt ist, z. B. durch eine abnehmende Transfektionseffizienz bei Einsatz hoher DNA-Mengen (hier bis zu 20 µg DNA pro 10cm-Schale mit ca. 10⁶ HEK 293T Zellen). Ergänzende Versuche ohne Co-Transfektion von pcDNA3.V5.4.1O, aber unter Beibehaltung der Gesamt-DNA-Menge und der Ratio von pCDM8.F.NCK2 zu pCDM8.slg.Nephrin 3261-3723 bp wären ebenso sinnvoll, wie Versuche, bei denen weiterhin alle drei Plasmide in unverändertem Verhältnis, aber reduzierter Menge, transfiziert werden.

Präliminäre Daten der eigenen Arbeitsgruppe demonstrieren, dass nicht nur, wie hier gezeigt, ein negativ-regulatorischer Einfluss von NCK2 auf die 4.1O/Nephrin-Interaktion besteht, sondern dass dieser Zusammenhang auch *vice versa* nachzuweisen ist. Protein 4.1O reduziert die Nephrinphosphorylierung an den NCK-Bindestellen Y1176, Y1193 und Y1217, was als zugrundeliegender Mechanismus für die Abschwächung der NCK2-Bindung an Nephrin in Anwesenheit von 4.1O diskutiert wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 4.1O-Truncations, denen die Nephrin-Interaktionsdomäne fehlt, keinen Einfluss auf die Nephrinphosphorylierung an den genannten Tyrosinresiduen haben, sodass der Effekt eine unmittelbare Folge der 4.1O/Nephrin-Interaktion sein muss.

Verma et al. wiesen 2006 im Mausmodell nach, dass Nephrin während der Glomerulogenese im phosphorylierten Zustand vorliegt, um so über NCK-Interaktionen zur Polymerisation und Organisation des sich entwickelnden podozytären Aktin-Cytoskeletts beitragen zu können (170). Inzwischen wurde gezeigt, dass positionsspezifisch phosphoryliertes Nephrin auch in gesunden adulten Nieren vorkommt (83, 171) und dass es dort zahlreiche wechselnde, auch NCK-unabhängige Interaktionen mit Proteinen eingeht, die es mit dem Zytoskelett verbinden (81). Auf diese Art und Weise entsteht ein stabiler Steady State, in dem der Podozyt zellulären Stress kompensieren kann (88).

Für verschiedene tierexperimentelle Krankheitsmodelle konnte gezeigt werden, dass die Nephrinphosphorylierung nach einem Podozytenschaden zunächst abnimmt (83, 171, 172). Auch im Menschen ist eine Dephosphorylierung an Position Y1217 koinzident mit dem Verlust podozytärer Fußfortsätze bei Minimal-Change- (171) und membranöser Glomerulonephritis (173). Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass die Nephrinmoleküle infolge einer Beeinträchtigung der glomerulären Schlitzmembran, ihr Clustering verlieren und so nicht mehr als Substrat der *Src family* Kinasen dienen (85). Konsekutiv kommt es zu ihrer β-Arrestin-vermittelten, Clathrin-abhängigen Endozytose (90).

Nach initialer Dephosphorylierung zeigt sich, in der sich anschließenden Restitutionsphase, eine transiente Zunahme der Nephrinphosphorylierung an den NCK-Interaktionsstellen mit dem Ziel der raschen Aktin-Reorganisation (88, 170). Konkordant hierzu erholen sich Nephrin^{Y3F/Y3F}-Mäuse, verglichen mit Wildtypen, deutlich langsamer von einem

Podozytenschaden (88) und zeigen hierbei phänotypische Ähnlichkeit zu Mäusen, denen Aktinregulatoren, wie Synaptopodin (174) und Cofilin (175), fehlen.

In Zusammenschau illustrieren die dargestellten Daten einen protektiven Effekt der Nephrin/NCK-Interaktion auf die Integrität der glomerulären Schlitzmembran.

Folglich erscheint plausibel, dass eine Bindung von Protein 4.1O an Nephrin mit hieraus resultierender partieller Dephosphorylierung von Y1176/1193 und Y1217 die podozytäre Vulnerabilität steigern und zur vermehrten β -Arrestin-medierten Nephrin-Endozytose führen müsste. Dies ist jedoch *in vitro* nicht der Fall (52) und lässt daher vermuten, dass 4.1O die physiologische Adapterfunktion von NCK2 ersetzen kann. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass ein Verlust beider Proteine in Tiermodellen zu ähnlichen Phänotypen führt (56, 83). Denkbar wäre, dass 4.1O eher eine Bedeutung im Steady State eines gesunden Podozyten zukommt, während die NCK2/Nephrin-Interaktion v. a. an Relevanz gewinnt, wenn das Aktin-Zytoskelett reorganisiert werden muss (81). Weiterführende Versuche hierzu sowie zu den zugrundeliegenden Mechanismen der 4.1O-getriggerten Dephosphorylierung von Nephrin, sind erforderlich.

4.2.3 Einfluss von Hyperglykämie und Hyperosmolarität auf den Phosphorylierungsstatus von Protein 4.1O

Chronische Hyperglykämie induziert über proinflammatorische (176) und profibrotische Signalkaskaden (177) eine ubiquitäre Schädigung des Glomerulums mit zahlreichen morphologischen Veränderungen. Hierzu zählen eine Verbreiterung der Basalmembran, eine Expansion des Mesangiums, eine Arterio-Arteriolosklerose mit arteriolärer Hyalinose sowie die pathognomonische noduläre Glomerulosklerose vom Typ Kimmelstiehl-Wilson (178). Klinisches Korrelat der diabetischen Nephropathie ist eine progrediente Albuminurie, die den Folgezustand podozytärer Schädigungen darstellt und eine funktionelle Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsbarriere abbildet (179).

Solche Prozesse gehen mit irreversiblen Zellumbau einher und setzen daher eine längerfristige Exposition gegenüber den diabetischen Konditionen als auslösende Noxe voraus. Sie sind molekular nur eingeschränkt vergleichbar mit den Folgen einer kurzzeitigen Hyperglykämie und der resultierenden Hyperosmolarität, die keine (ultra)strukturellen Veränderungen am glomerulären Filter induzieren, aber trotzdem eine Albuminurie bedingen können (98, 99). Grundlage für den raschen Onset dieses Phänomen ist die hochdynamische Struktur der glomerulären Schlitzmembran, deren Regulation v. a. über posttranslationale Phosphorylierung erfolgt (180).

Protein 4.1O ist durch seine Interaktion mit Nephrin nicht nur Teil dieses Proteinkomplexes, sondern auch das Expressionsprodukt eines der bedeutendsten Kandidatengene für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie in Typ 1 Diabetikern.

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass hyperosmolare Bedingungen die 4.1O/Nephrin-Bindung signifikant schwächen, ohne dass der zugrundeliegende Mechanismus bis dato identifiziert werden konnte.

Multiple *in vitro* und *in vivo* Studien fokussieren v. a. auf Glukose-abhängige posttranslationale Modifikationen an Nephrin und beschreiben hier insbesondere vermehrte Threonin-Phosphorylierungen, die durch eine Induktion von PKC α zustande kommen (91, 95, 99, 181). Entsprechende Datenpunkte mit osmotischen Kontrollen konnten diesen Effekt nicht reproduzieren, weil er primär durch 1,2-Diacylglycerin (DAG) verursacht wird, welches als Zwischenprodukt der Lipogenese intrazellulär v. a. dann vermehrt vorkommt, wenn es, wie bei Hyperglykämie, einen Überschuss an Nahrungsenergie gibt (182).

Innerhalb der Nephrin-Bindungsdomäne von Protein 4.1O finden sich die beiden posttranslational modifizierbaren Residuen T521 und Y529 (183), die Substrate der *Src family*- sowie der MAP-Kinasen darstellen (166). Präliminäre Daten mit Kinaseinhibitoren und entsprechenden 4.1O-Punktmutanten konnten zeigen, dass eine Phosphorylierung an den genannten Tyrosin- und Threoninresiduen von essenzieller Bedeutung für die Interaktion mit Nephrin ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde aus methodischen Gründen die gesamte und nicht-positionsspezifische Tyrosin- und Threoninphosphorylierung von Protein 4.1O unter hyperglykämien und hyperosmolaren Bedingungen untersucht. Dabei fand sich kein Effekt der Versuchskonditionen auf die Threoninphosphorylierung, es demaskierte sich jedoch eine (nicht signifikante) osmotisch bedingte Abnahme der Tyrosinphosphorylierung.

Wie bereits dargestellt, ist die Phosphorylierung von Y529 der entscheidende Schritt für die Ausbildung einer SH2-Domäne und damit für die Anlagerung an die YDxV-Motive von Nephrin. Wird sie durch osmotischen Stress reduziert, ist eine verminderte 4.1O/Nephrin-Interaktion die mögliche Folge.

Da Glukose osmotische Aktivität besitzt, geht jede Hyperglykämie auch mit einer Hyperosmolarität einher, sodass neben den biochemisch-metabolischen, auch biophysikalische Prozesse wirksam werden (184). Sobald eine Zelle von einem hypertonen Medium umgeben ist, kommt es zur osmotisch-bedingten Zellschrumpfung, die wiederum zahlreiche Signalkaskaden zur Folge hat, u. a. mit dem Ziel einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts (185).

In der Literatur ist beschrieben, dass osmotischer Stress die Phosphorylierung des zellulären Proteoms steigern kann (186) und dass dies die Folge der Hochregulation einiger Kinasen ist, darunter Mitglieder der SFK- (187), PKC- (188) und MAPK-Familie (189).

Rasmussen et al. bestätigten ebenfalls, speziell für Proteine mit einer FERM-Domäne, zu denen auch 4.1O gehört, dass eine hypertone Zellschrumpfung zur gesteigerten Phosphorylierung führt und zeigten darüber hinaus auch eine vermehrte Co-Lokalisation der phosphorylierten ERM-Proteine mit Aktin (190). Hieraus lässt sich ableiten, dass die Mitglieder der Proteinfamilie an einem Remodelling des Cytoskeletts nach Exposition der Zelle gegenüber osmotischem Stress beteiligt sein könnten.

Diese Daten sind nicht konkordant zur hier gezeigten osmotisch-bedingten Abnahme der Tyrosinphosphorylierung von Protein 4.1O. Denkbar wäre, dass das Adapterprotein NCK *in vivo* nach einem hypertonen Podozytenschaden vermehrt mit Nephrin interagiert, um eine rasche Restitutio des Aktin-Cytoskeletts zu ermöglichen (81), und dass hierfür 4.1O durch Dephosphorylierung aus seiner Interaktion mit Nephrin verdrängt wird. Für diese Hypothese spricht, dass die Ste20/MAP4K4-Serin/Threonin-Kinase *NCK-interacting Kinase* (NIK) durch Zellschrumpfung aktiviert wird (190, 191). Hierbei handelt es sich um einen Downstream-Effektor von NCK (192, 193) mit Bezug zum WASP-Arp2/3-Signalweg und damit zur Aktinpolymerisation (194).

Zusätzliche Zellkultur-Versuche, u. a. zum Einfluss von Hyperosmolarität auf die Konkurrenz von NCK2 und Protein 4.1O, könnten zur weiteren Klärung beitragen. Daten aus *in vitro* Versuchen mit Podozyten zeigten bisher v. a. Hyperglykämie-induzierte Effekte auf die Expression des Kinoms (99) sowie die Reassemblierung von Aktin (195). Hier sind weitere Modelle, die auf biophysikalische Faktoren fokussieren, notwendig, auch um die Übertragbarkeit der bisherigen Erkenntnisse aus anderen Zelllinien kritisch zu prüfen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Sagoo MK, Gnudi L. Diabetic Nephropathy: An Overview. *Methods Mol Biol.* 2020;2067:3-7.
2. Groop PH, Thomas MC, Moran JL, Wadèn J, Thorn LM, Mäkinen VP, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2009;58(7):1651-8.
3. Afkarian M, Sachs MC, Kestenbaum B, Hirsch IB, Tuttle KR, Himmelfarb J, et al. Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(2):302-8.
4. Bloomgarden ZT. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2008;31(4):823-7.
5. Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33(2).
6. Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med.* 1989;320(18):1161-5.
7. Chandie Shaw PK, Baboe F, van Es LA, van der Vijver JC, van de Ree MA, de Jonge N, et al. South-Asian type 2 diabetic patients have higher incidence and faster progression of renal disease compared with Dutch-European diabetic patients. *Diabetes Care.* 2006;29(6):1383-5.
8. Krolewski AS. Genetics of diabetic nephropathy: evidence for major and minor gene effects. *Kidney Int.* 1999;55(4):1582-96.
9. Mooyaart AL, Valk EJ, van Es LA, Bruijn JA, de Heer E, Freedman BI, et al. Genetic associations in diabetic nephropathy: a meta-analysis. *Diabetologia.* 2011;54(3):544-53.

10. Pezzolesi MG, Poznik GD, Mychaleckyj JC, Paterson AD, Barati MT, Klein JB, et al. Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2009;58(6):1403-10.
11. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, et al. The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*. 1998;23(8):281-2.
12. Hall JE, Fu W, Schaller MD. Chapter Five - Focal Adhesion Kinase: Exploring FAK Structure to Gain Insight into Function. In: Jeon KW, editor. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 288: Academic Press; 2011. p. 185-225.
13. Ni X, Ji C, Cao G, Cheng H, Guo L, Gu S, et al. 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*. 2003;48(2):101-6.
14. Buffon MP, Sortica DA, Gerchman F, Crispim D, Canani LH. FRMD3 gene: its role in diabetic kidney disease. A narrative review. *Diabetol Metab Syndr*. 2015;7:118.
15. Yu J, Fischman DA, Steck TL. Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J Supramol Struct*. 1973;1(3):233-48.
16. Peters LL, Weier HU, Walensky LD, Snyder SH, Parra M, Mohandas N, et al. Four paralogous protein 4.1 genes map to distinct chromosomes in mouse and human. *Genomics*. 1998;54(2):348-50.
17. Tang CJ, Tang TK. Rapid localization of membrane skeletal protein 4.1 (EL1) to human chromosome 1p33-p34.2 by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1991;57(2-3):119.
18. Kim AC, Van Huffel C, Lutchman M, Chishti AH. Radiation hybrid mapping of EPB41L1, a novel protein 4.1 homologue, to human chromosome 20q11.2-q12. *Genomics*. 1998;49(1):165-6.
19. Parra M, Gascard P, Walensky LD, Snyder SH, Mohandas N, Conboy JG. Cloning and characterization of 4.1G (EPB41L2), a new member of the skeletal protein 4.1 (EPB41) gene family. *Genomics*. 1998;49(2):298-306.

20. Taylor-Harris PM, Felkin LE, Birks EJ, Franklin RC, Yacoub MH, Baines AJ, et al. Expression of human membrane skeleton protein genes for protein 4.1 and betaIIISigma2-spectrin assayed by real-time RT-PCR. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(1):135-49.
21. Parra M, Gee S, Chan N, Ryaboy D, Dubchak I, Mohandas N, et al. Differential domain evolution and complex RNA processing in a family of paralogous EPB41 (protein 4.1) genes facilitate expression of diverse tissue-specific isoforms. *Genomics*. 2004;84(4):637-46.
22. Baines AJ, Lu HC, Bennett PM. The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1838(2):605-19.
23. Han BG, Nunomura W, Takakuwa Y, Mohandas N, Jap BK. Protein 4.1R core domain structure and insights into regulation of cytoskeletal organization. *Nat Struct Biol*. 2000;7(10):871-5.
24. Edwards SD, Keep NH. The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry*. 2001;40(24):7061-8.
25. Sun CX, Robb VA, Gutmann DH. Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 21):3991-4000.
26. Seo PS, Jeong JJ, Zeng L, Takoudis CG, Quinn BJ, Khan AA, et al. Alternatively spliced exon 5 of the FERM domain of protein 4.1R encodes a novel binding site for erythrocyte p55 and is critical for membrane targeting in epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(2):281-9.
27. Nunomura W, Parra M, Hebiguchi M, Sawada K, Mohandas N, Takakuwa Y. Marked difference in membrane-protein-binding properties of the two isoforms of protein 4.1R expressed at early and late stages of erythroid differentiation. *Biochem J*. 2009;417(1):141-8.
28. Gauthier E, Guo X, Mohandas N, An X. Phosphorylation-dependent perturbations of the 4.1R-associated multiprotein complex of the erythrocyte membrane. *Biochemistry*. 2011;50(21):4561-7.

29. Baines AJ. A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. *BMC Genomics*. 2006;7:85.
30. Gimm JA, An X, Nunomura W, Mohandas N. Functional characterization of spectrin-actin-binding domains in 4.1 family of proteins. *Biochemistry*. 2002;41(23):7275-82.
31. Winardi R, Discher D, Kelley C, Zon L, Mays K, Mohandas N, et al. Evolutionarily conserved alternative pre-mRNA splicing regulates structure and function of the spectrin-actin binding domain of erythroid protein 4.1. *Blood*. 1995;86(11):4315-22.
32. Diakowski W, Grzybek M, Sikorski AF. 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*. 2006;44(4):231-48.
33. Scott C, Phillips GW, Baines AJ. Properties of the C-terminal domain of 4.1 proteins. *Eur J Biochem*. 2001;268(13):3709-17.
34. Hoover KB, Bryant PJ. The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2000;12(2):229-34.
35. Feo CJ, Fischer S, Piau JP, Grange MJ, Tchernia G. [1st instance of the absence of an erythrocyte membrane protein (band 4.1) in a case of familial elliptocytic anemia]. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1980;22(4):315-25.
36. Pinder JC, Gratzer WB. Structural and dynamic states of actin in the erythrocyte. *J Cell Biol*. 1983;96(3):768-75.
37. Reid ME, Takakuwa Y, Conboy J, Tchernia G, Mohandas N. Glycophorin C content of human erythrocyte membrane is regulated by protein 4.1. *Blood*. 1990;75(11):2229-34.
38. Jeremy KP, Plummer ZE, Head DJ, Madgett TE, Sanders KL, Wallington A, et al. 4.1R-deficient human red blood cells have altered phosphatidylserine exposure pathways and are deficient in CD44 and CD47 glycoproteins. *Haematologica*. 2009;94(10):1354-61.

39. Salomao M, Zhang X, Yang Y, Lee S, Hartwig JH, Chasis JA, et al. Protein 4.1R-dependent multiprotein complex: new insights into the structural organization of the red blood cell membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8026-31.
40. Nunomura W, Takakuwa Y. Regulation of protein 4.1R interactions with membrane proteins by Ca²⁺ and calmodulin. *Front Biosci*. 2006;11:1522-39.
41. Eder PS, Soong CJ, Tao M. Phosphorylation reduces the affinity of protein 4.1 for spectrin. *Biochemistry*. 1986;25(7):1764-70.
42. Horne WC, Prinz WC, Tang EK. Identification of two cAMP-dependent phosphorylation sites on erythrocyte protein 4.1. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1055(1):87-92.
43. Pinder JC, Gardner B, Gratzner WB. Interaction of protein 4.1 with the red cell membrane: effects of phosphorylation by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;210(2):478-82.
44. An X, Zhang X, Debnath G, Baines AJ, Mohandas N. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) differentially regulates the interaction of human erythrocyte protein 4.1 (4.1R) with membrane proteins. *Biochemistry*. 2006;45(18):5725-32.
45. Pinder JC, Taylor-Harris PM, Bennett PM, Carter E, Hayes NV, King MD, et al. Isoforms of protein 4.1 are differentially distributed in heart muscle cells: relation of 4.1R and 4.1G to components of the Ca²⁺ homeostasis system. *Exp Cell Res*. 2012;318(13):1467-79.
46. Chen L, Hughes RA, Baines AJ, Conboy J, Mohandas N, An X. Protein 4.1R regulates cell adhesion, spreading, migration and motility of mouse keratinocytes by modulating surface expression of beta1 integrin. *J Cell Sci*. 2011;124(14):2478-87.
47. Brown GR, Hem V, Katz KS, Ovetsky M, Wallin C, Ermolaeva O, et al. Gene: a gene-centered information resource at NCBI. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:D36-42.
48. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):40-5.

49. Gerhard DS, Wagner L, Feingold EA, Shenmen CM, Grouse LH, Schuler G, et al. The status, quality, and expansion of the NIH full-length cDNA project: the Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Res.* 2004;14(10b):2121-7.
50. Consortium U. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(D1):D523-d31.
51. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13(2):397-406.
52. Ohlsson S. Die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (DE). 2018.
53. Königshausen E, Rieckmann S, Ohlsson S, Bajraktarevic A, Stahl K, Schönberger M, et al. Protein 4.1O is upregulated in diabetic nephropathy, interacts with nephrin and is essential for slit diaphragm integrity. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie; Düsseldorf (DE).* 2019.
54. Ebarasi L, Oddsson A, Hultenby K, Betsholtz C, Tryggvason K. Zebrafish: a model system for the study of vertebrate renal development, function, and pathophysiology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(4):416-24.
55. Jensen AM, Westerfield M. Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation. *Curr Biol.* 2004;14(8):711-7.
56. Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol.* 2005;285(2):316-29.
57. Madison JR, Spies C, Schatz IJ, Masaki K, Chen R, Yano K, et al. Proteinuria and risk for stroke and coronary heart disease during 27 years of follow-up: the Honolulu Heart Program. *Arch Intern Med.* 2006;166(8):884-9.
58. Rupprecht HD. [Differential diagnosis of proteinuria]. *MMW Fortschr Med.* 2004;146(43):41-5.

59. Schlöndorff D, Wyatt CM, Campbell KN. Revisiting the determinants of the glomerular filtration barrier: what goes round must come round. *Kidney Int.* 2017;92(3):533-6.
60. Salmon AH, Satchell SC. Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol.* 2012;226(4):562-74.
61. Laurie GW, Leblond CP, Inoue S, Martin GR, Chung A. Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalization of five basement membrane components to the lamina densa (basal lamina) and its extensions in both glomeruli and tubules of the rat kidney. *Am J Anat.* 1984;169(4):463-81.
62. Monnens LA. [The basal membrane of the kidney]. *Tijdschr Kindergeneeskd.* 1982;50(5):121-30.
63. Brinkkoetter PT, Ising C, Benzing T. The role of the podocyte in albumin filtration. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(6):328-36.
64. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol.* 2018;47 Suppl 1:3-13.
65. Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(1):1-8.
66. Menzel S, Moeller MJ. Role of the podocyte in proteinuria. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(10):1775-80.
67. Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1998;1(4):575-82.
68. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Ofverstedt LG, Skoglund U, Obrink B, Wartiovaara J, et al. Nephrin promotes cell-cell adhesion through homophilic interactions. *Am J Pathol.* 2003;163(6):2337-46.
69. Aaltonen P, Holthöfer H. The nephrin-based slit diaphragm: new insight into the signalling platform identifies targets for therapy. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(12):3408-10.

70. Martin CE, Jones N. Nephrin Signaling in the Podocyte: An Updated View of Signal Regulation at the Slit Diaphragm and Beyond. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:302.
71. Holmberg C, Antikainen M, Rönholm K, Ala Houhala M, Jalanko H. Management of congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Pediatr Nephrol*. 1995;9(1):87-93.
72. Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K. 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*. 2001;10(1):1-8.
73. Sellin L, Huber TB, Gerke P, Quack I, Pavenstädt H, Walz G. NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. *FASEB J*. 2003;17(1):115-7.
74. Barletta GM, Kovari IA, Verma RK, Kerjaschki D, Holzman LB. Nephrin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem*. 2003;278(21):19266-71.
75. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, et al. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int*. 2001;59(3):1003-12.
76. Hashimoto T, Karasawa T, Saito A, Miyauchi N, Han GD, Hayasaka K, et al. Ephrin-B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney Int*. 2007;72(8):954-64.
77. Fukusumi Y, Zhang Y, Yamagishi R, Oda K, Watanabe T, Matsui K, et al. Nephrin-Binding Ephrin-B1 at the Slit Diaphragm Controls Podocyte Function through the JNK Pathway. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(5):1462-74.
78. Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, et al. Neurexin-1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2011;300(2):R340-8.

79. Thomas PE, Wharram BL, Goyal M, Wiggins JE, Holzman LB, Wiggins RC. GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit. *J Biol Chem.* 1994;269(31):19953-62.
80. Kawachi H, Fukusumi Y. New insight into podocyte slit diaphragm, a therapeutic target of proteinuria. *Clin Exp Nephrol.* 2020;24(3):193-204.
81. Tryggvason K, Pikkarainen T, Patrakka J. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell.* 2006;125(2):221-4.
82. Blasutig IM, New LA, Thanabalasuriar A, Dayarathna TK, Goudreault M, Quaggin SE, et al. Phosphorylated YDXV motifs and Nck SH2/SH3 adaptors act cooperatively to induce actin reorganization. *Mol Cell Biol.* 2008;28(6):2035-46.
83. Jones N, New LA, Fortino MA, Eremina V, Ruston J, Blasutig IM, et al. Nck proteins maintain the adult glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1533-43.
84. Rigotherier C, Auguste P, Welsh GI, Lepreux S, Deminière C, Mathieson PW, et al. IQGAP1 interacts with components of the slit diaphragm complex in podocytes and is involved in podocyte migration and permeability in vitro. *PLoS One.* 2012;7(5):e37695.
85. Lahdenperä J, Kilpeläinen P, Liu XL, Pikkarainen T, Reponen P, Ruotsalainen V, et al. Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases. *Kidney Int.* 2003;64(2):404-13.
86. Zhu J, Sun N, Aoudjit L, Li H, Kawachi H, Lemay S, et al. Nephrin mediates actin reorganization via phosphoinositide 3-kinase in podocytes. *Kidney Int.* 2008;73(5):556-66.
87. Jones N, Blasutig IM, Eremina V, Ruston JM, Bladt F, Li H, et al. Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature.* 2006;440(7085):818-23.

88. New LA, Martin CE, Scott RP, Platt MJ, Keyvani Chahi A, Stringer CD, et al. Nephrin Tyrosine Phosphorylation Is Required to Stabilize and Restore Podocyte Foot Process Architecture. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(8):2422-35.
89. Swiatecka-Urban A. Membrane trafficking in podocyte health and disease. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(9):1723-37.
90. Quack I, Rump LC, Gerke P, Walther I, Vinke T, Vonend O, et al. beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):14110-5.
91. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev*. 2008;4(1):39-45.
92. Jerums G, Panagiotopoulos S, Premaratne E, MacIsaac RJ. Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(7):397-406.
93. Doublie S, Salvidio G, Lupia E, Ruotsalainen V, Verzola D, Deferrari G, et al. Nephrin expression is reduced in human diabetic nephropathy: evidence for a distinct role for glycated albumin and angiotensin II. *Diabetes*. 2003;52(4):1023-30.
94. Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, Panagiotopoulos S, et al. Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(7):1327-32.
95. Menne J, Meier M, Park JK, Boehne M, Kirsch T, Lindschau C, et al. Nephrin loss in experimental diabetic nephropathy is prevented by deletion of protein kinase C alpha signaling in-vivo. *Kidney Int*. 2006;70(8):1456-62.
96. Wagner N, Wagner KD, Xing Y, Scholz H, Schedl A. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3044-51.

97. Menne J, Park JK, Boehne M, Elger M, Lindschau C, Kirsch T, et al. Diminished loss of proteoglycans and lack of albuminuria in protein kinase C- α -deficient diabetic mice. *Diabetes*. 2004;53(8):2101-9.
98. Axelsson J, Rippe A, Rippe B. Acute hyperglycemia induces rapid, reversible increases in glomerular permeability in nondiabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(6):F1306-12.
99. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Königshausen E, Sivritas S, et al. PKC α mediates beta-arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem*. 2011;286(15):12959-70.
100. Carpena MP, Rados DV, Sortica DA, Souza BM, Reis AF, Canani LH, et al. Genetics of diabetic nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010;54(3):253-61.
101. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59-74.
102. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*. 1987;7(1):379-87.
103. Kwon M, Firestein BL. DNA transfection: calcium phosphate method. *Methods Mol Biol*. 2013;1018:107-10.
104. Guo L, Wang L, Yang R, Feng R, Li Z, Zhou X, et al. Optimizing conditions for calcium phosphate mediated transient transfection. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(3):622-9.
105. Koley D, Bard AJ. Triton X-100 concentration effects on membrane permeability of a single HeLa cell by scanning electrochemical microscopy (SECM). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(39):16783-7.
106. Miernyk JA, Thelen JJ. Biochemical approaches for discovering protein-protein interactions. *Plant J*. 2008;53(4):597-609.

107. Louche A, Salcedo SP, Bigot S. Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods Mol Biol.* 2017;1615:247-55.
108. Alliegro MC. Effects of dithiothreitol on protein activity unrelated to thiol-disulfide exchange: for consideration in the analysis of protein function with Cleland's reagent. *Anal Biochem.* 2000;282(1):102-6.
109. Jafari M, Mehrnejad F, Rahimi F, Asghari SM. The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Sci Rep.* 2018;8(1):2150.
110. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics.* 2014;6(5):1068-78.
111. Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis for N-terminal protein sequencing. *Methods Mol Biol.* 1997;64:17-24.
112. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1312:17-30.
113. Mishra V. Dot-Blotting: A Quick Method for Expression Analysis of Recombinant Proteins. *Curr Protoc.* 2022;2(9):e546.
114. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012;4(9):429-34.
115. Pillai-Kastoori L, Heaton S, Shiflett SD, Roberts AC, Solache A, Schutz-Geschwender AR. Antibody validation for Western blot: By the user, for the user. *J Biol Chem.* 2020;295(4):926-39.
116. Zhu H, Jia Z, Trush MA, Li YR. A Highly Sensitive Chemiluminometric Assay for Real-Time Detection of Biological Hydrogen Peroxide Formation. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(3):216-27.
117. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971;56(2):341-61.

118. Stolovitzky G, Cecchi G. Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):12947-52.
119. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol.* 1974;14(5):1235-44.
120. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012(62).
121. Wahl P, Paoletti J, Le Pecq JB. Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex. Evidence for an internal motion in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1970;65(2):417-21.
122. Kirby KS. A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. *Biochem J.* 1956;64(3):405-8.
123. Green MR, Sambrook J. Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(12).
124. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(12):2913-7.
125. Marx JL. Restriction enzymes: new tools for studying DNA. *Science.* 1973;180(4085):482-5.
126. Green MR, Sambrook J. Dephosphorylation of DNA Fragments with Alkaline Phosphatase. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020;2020(8):100669.
127. Gaastra W, Hansen K. Ligation of DNA with t(4) DNA ligase. *Methods Mol Biol.* 1985;2:225-30.
128. Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into *E. coli* using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007(6):253.
129. Dejana E, Corada M. Adhesion Protein Protocols. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 96. Totowa (NJ): Humana Press; 2008.

130. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*. 1970;226(5252):1209-11.
131. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 1970;226(5252):1211-3.
132. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
133. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-95.
134. Thomas P, Smart TG. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2005;51(3):187-200.
135. Hu J, Han J, Li H, Zhang X, Liu LL, Chen F, et al. Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology and Electrophysiology. *Cells Tissues Organs*. 2018;205(1):1-8.
136. Shankland SJ, Pippin JW, Reiser J, Mundel P. Podocytes in culture: past, present, and future. *Kidney Int*. 2007;72(1):26-36.
137. Schiwiek D, Endlich N, Holzman L, Holthöfer H, Kriz W, Endlich K. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int*. 2004;66(1):91-101.
138. Free RB, Hazelwood LA, Sibley DR. Identifying novel protein-protein interactions using co-immunoprecipitation and mass spectroscopy. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;5:5.28.
139. Adelmant G, Garg BK, Tavares M, Card JD, Marto JA. Tandem Affinity Purification and Mass Spectrometry (TAP-MS) for the Analysis of Protein Complexes. *Curr Protoc Protein Sci*. 2019;96(1):e84.
140. Mackay JP, Sunde M, Lowry JA, Crossley M, Matthews JM. Protein interactions: is seeing believing? *Trends Biochem Sci*. 2007;32(12):530-1.

141. Zhu X, Zelmer A, Wellmann S. Visualization of Protein-protein Interaction in Nuclear and Cytoplasmic Fractions by Co-immunoprecipitation and In Situ Proximity Ligation Assay. *J Vis Exp.* 2017(119).
142. Johansen K, Svensson L. Immunoprecipitation. *Methods Mol Med.* 1998;13:15-28.
143. Peck SC. Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* 2006;45(4):512-22.
144. Harlow E, Lane D. Lysing tissue-culture cells for immunoprecipitation. *CSH Protoc.* 2006;2006(4).
145. DeCaprio J, Kohl TO. Denaturing Lysis of Cells for Immunoprecipitation. *Cold Spring Harb Protoc.* 2020;2020(2):098616.
146. Gerace E, Moazed D. Coimmunoprecipitation of proteins from yeast. *Methods Enzymol.* 2014;541:13-26.
147. Bonifacino JS, Gershlick DC, Dell'Angelica EC. Immunoprecipitation. *Curr Protoc Cell Biol.* 2016;71.
148. Avila JR, Lee JS, Torii KU. Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors. *Arabidopsis Book.* 2015;13:e0180.
149. Zucca P, Fernandez-Lafuente R, Sanjust E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules.* 2016;21(11).
150. Brymora A, Cousin MA, Roufogalis BD, Robinson PJ. Enhanced protein recovery and reproducibility from pull-down assays and immunoprecipitations using spin columns. *Anal Biochem.* 2001;295(1):119-22.
151. Singh SK, Kishore N. Thermodynamic insights into the binding of Triton X-100 to globular proteins: a calorimetric and spectroscopic investigation. *J Phys Chem B.* 2006;110(19):9728-37.
152. Yang L, Zhang H, Bruce JE. Optimizing the detergent concentration conditions for immunoprecipitation (IP) coupled with LC-MS/MS identification of interacting proteins. *Analyst.* 2009;134(4):755-62.

153. Moser JJ, Chan EK, Fritzler MJ. Optimization of immunoprecipitation-western blot analysis in detecting GW182-associated components of GW/P bodies. *Nat Protoc.* 2009;4(5):674-85.
154. Glaser BT, Bergendahl V, Anthony LC, Olson B, Burgess RR. Studying the salt dependence of the binding of sigma70 and sigma32 to core RNA polymerase using luminescence resonance energy transfer. *PLoS One.* 2009;4(8):e6490.
155. Bernhofer M, Dallago C, Karl T, Satagopam V, Heinzinger M, Littmann M, et al. PredictProtein - Predicting Protein Structure and Function for 29 Years. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W535-W40.
156. Hemming NJ, Anstee DJ, Staricoff MA, Tanner MJ, Mohandas N. Identification of the membrane attachment sites for protein 4.1 in the human erythrocyte. *J Biol Chem.* 1995;270(10):5360-6.
157. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596(7873):583-9.
158. Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ, Jr. Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2000;275(39):30573-85.
159. Hou CL, Tang C, Roffler SR, Tang TK. Protein 4.1R binding to eIF3-p44 suggests an interaction between the cytoskeletal network and the translation apparatus. *Blood.* 2000;96(2):747-53.
160. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* 1982;157(1):105-32.
161. Stothard P. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques.* 2000;28(6):1102-4.
162. Alvarez-Castelao B, Ruiz-Rivas C, Castaño JG. A critical appraisal of quantitative studies of protein degradation in the framework of cellular proteostasis. *Biochem Res Int.* 2012;2012:823597.

163. Welsh GI, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol.* 2010;220(3):328-37.
164. Martin CE, New LA, Phippen NJ, Keyvani Chahi A, Mitro AE, Takano T, et al. Multivalent nephrin-Nck interactions define a threshold for clustering and tyrosine-dependent nephrin endocytosis. *J Cell Sci.* 2020;133(4).
165. Simons M, Schwarz K, Kriz W, Miettinen A, Reiser J, Mundel P, et al. Involvement of lipid rafts in nephrin phosphorylation and organization of the glomerular slit diaphragm. *Am J Pathol.* 2001;159(3):1069-77.
166. Obenauer JC, Cantley LC, Yaffe MB. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3635-41.
167. Rohatgi R, Nollau P, Ho HY, Kirschner MW, Mayer BJ. Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem.* 2001;276(28):26448-52.
168. New LA, Keyvani Chahi A, Jones N. Direct regulation of nephrin tyrosine phosphorylation by Nck adaptor proteins. *J Biol Chem.* 2013;288(3):1500-10.
169. Goutelle S, Maurin M, Rougier F, Barbaut X, Bourguignon L, Ducher M, et al. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008;22(6):633-48.
170. Verma R, Kovari I, Soofi A, Nihalani D, Patrie K, Holzman LB. Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1346-59.
171. Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, Kawachi H, Ohno M, Horita S, et al. Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int.* 2008;73(8):926-32.
172. Yu M, Ren Q, Yu SY. Role of nephrin phosphorylation induced by dexamethasone and angiotensin II in podocytes. *Mol Biol Rep.* 2014;41(6):3591-5.

173. Ohashi T, Uchida K, Asamiya Y, Tsuruta Y, Ohno M, Horita S, et al. Phosphorylation status of nephrin in human membranous nephropathy. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14(1):51-5.
174. Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1188-98.
175. Garg P, Verma R, Cook L, Soofi A, Venkatareddy M, George B, et al. Actin-depolymerizing factor cofilin-1 is necessary in maintaining mature podocyte architecture. *J Biol Chem*. 2010;285(29):22676-88.
176. Sasser JM, Sullivan JC, Hobbs JL, Yamamoto T, Pollock DM, Carmines PK, et al. Endothelin A receptor blockade reduces diabetic renal injury via an anti-inflammatory mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(1):143-54.
177. Murphy M, Docherty NG, Griffin B, Howlin J, McArdle E, McMahon R, et al. IHG-1 amplifies TGF-beta1 signaling and is increased in renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(9):1672-80.
178. Tervaert TW, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(4):556-63.
179. Akhtar M, Al Mana H. Molecular basis of proteinuria. *Adv Anat Pathol*. 2004;11(6):304-9.
180. Garg P, Verma R, Nihalani D, Johnstone DB, Holzman LB. Nephrin cooperates with nephrin to transduce a signal that induces actin polymerization. *Mol Cell Biol*. 2007;27(24):8698-712.
181. Tossidou I, Teng B, Menne J, Shushakova N, Park JK, Becker JU, et al. Podocytic PKC-alpha is regulated in murine and human diabetes and mediates nephrin endocytosis. *PLoS One*. 2010;5(4):e10185.
182. Derubertis FR, Craven PA. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*. 1994;43(1):1-8.

183. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 1999;294(5):1351-62.
184. Madonna R, Geng YJ, Shelat H, Ferdinandy P, De Caterina R. High glucose-induced hyperosmolarity impacts proliferation, cytoskeleton remodeling and migration of human induced pluripotent stem cells via aquaporin-1. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1842(11):2266-75.
185. Di Ciano-Oliveira C, Thirone AC, Szászi K, Kapus A. Osmotic stress and the cytoskeleton: the R(h)ole of Rho GTPases. *Acta Physiol (Oxf).* 2006;187(1-2):257-72.
186. Cohen DM. SRC family kinases in cell volume regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288(3):C483-93.
187. Kapus A, Szászi K, Sun J, Rizoli S, Rotstein OD. Cell shrinkage regulates Src kinases and induces tyrosine phosphorylation of cortactin, independent of the osmotic regulation of Na⁺/H⁺ exchangers. *J Biol Chem.* 1999;274(12):8093-102.
188. Chen JS, Lee HS, Jin JS, Chen A, Lin SH, Ka SM, et al. Attenuation of mouse mesangial cell contractility by high glucose and mannitol: involvement of protein kinase C and focal adhesion kinase. *J Biomed Sci.* 2004;11(2):142-51.
189. Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Nishiyama A, Ozawa Y, Kyaw M, et al. BMK1 is activated in glomeruli of diabetic rats and in mesangial cells by high glucose conditions. *Kidney Int.* 2004;65(5):1749-60.
190. Rasmussen M, Alexander RT, Darborg BV, Møbjerg N, Hoffmann EK, Kapus A, et al. Osmotic cell shrinkage activates ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins: activation mechanisms and physiological implications. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;294(1):C197-212.
191. Hoffmann EK, Pedersen SF. Sensors and signal transduction pathways in vertebrate cell volume regulation. *Contrib Nephrol.* 2006;152:54-104.
192. Su YC, Han J, Xu S, Cobb M, Skolnik EY. NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* 1997;16(6):1279-90.

193. Becker E, Huynh-Do U, Holland S, Pawson T, Daniel TO, Skolnik EY. Nck-interacting Ste20 kinase couples Eph receptors to c-Jun N-terminal kinase and integrin activation. *Mol Cell Biol.* 2000;20(5):1537-45.
194. LeClaire LL, Rana M, Baumgartner M, Barber DL. The Nck-interacting kinase NIK increases Arp2/3 complex activity by phosphorylating the Arp2 subunit. *J Cell Biol.* 2015;208(2):161-70.
195. Lv Z, Hu M, Ren X, Fan M, Zhen J, Chen L, et al. Fyn Mediates High Glucose-Induced Actin Cytoskeleton Reorganization of Podocytes via Promoting ROCK Activation In Vitro. *J Diabetes Res.* 2016;2016:5671803.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion so vielfältig unterstützt haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Lars Christian Rump danke ich für die Chance, in seinem Labor wissenschaftliche Erfahrung zu sammeln und diese Arbeit anfertigen zu dürfen.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Lorenz Sellin danke ich für die spannende Zeit in seiner Arbeitsgruppe, die Möglichkeit zur Mitwirkung an einem seiner Projekte und seine fortwährende Unterstützung währenddessen. Es war mir eine große Freude, von seinem wissenschaftlichen Erfahrungsschatz lernen zu dürfen. Er hat mir bewiesen, dass man sich, auch bei intensiver klinischer Tätigkeit, die Begeisterung für nephrologische Grundlagenforschung über Jahrzehnte hinweg bewahren kann.

Mein herzlicher Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Matthias Schott für die freundliche Co-Betreuung und Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau Dr. Eva Königshausen danke ich für ihren allumfassenden fachlichen und menschlichen Beistand in den Jahren meiner Promotion, ihr stets offenes Ohr und ihren konstruktiven Rat in allen Belangen. Besonders in Erinnerung bleiben, wird mir unsere gemeinsame Fahrt zum Treffen der „Jungen Niere“ in Graz und ihre Unterstützung vor meinem ersten wissenschaftlichen Vortrag dort.

Frau Blanka Duvnjak, Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt danke ich für die hervorragende Einarbeitung zu Beginn meiner experimentellen Tätigkeit, den strukturellen Rahmen in unserem Labor und dafür, dass sie ihre breite methodische Erfahrung jederzeit mit mir geteilt haben. Durch sie wurde das Miteinander in unserem Labor erst zu dem, was es war.

Auch mit dem „Team Sellin“ verband mich schon nach kurzer Zeit weitaus mehr als ein gemeinsames Projekt. Hinter uns liegt geteiltes Leid, aber noch mehr geteilte Freude, so manch gemeinsam verbrachte Inkubationszeit und sogar ein gemeinsamer Gletscherabstieg inmitten der Schweizer Alpen.

Meinen Freunden danke ich für die nötige Ablenkung außerhalb des Labors, ihre viele Aufmunterung in Zeiten intensiven Trouble Shootings und ihr Verständnis, wenn mich die Neugier auch zu später Stunde noch immer an die Bench fesselte.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für 30 Jahre Unterstützung in allem, was mir am Herzen liegt. Hätten meine Eltern nicht bereits in meiner Kindheit meine aufkeimende Begeisterung, erst für Naturphänomene und später für Naturwissenschaften, stets gefördert, hätte es diese Arbeit vielleicht nie gegeben.