

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

Einfluss der Glukose auf die Funktion des Proteins 4.10 und seiner Spleißvarianten

Dissertation

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

vorgelegt von
Larissa Matten

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Georg Flügen

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie (DN) gehört weltweit zu den führenden Ursachen für ein terminales Nierenversagen und stellt demzufolge finanziell und gesellschaftlich eine große Belastung dar. Bisherige Untersuchungen belegten eine Aktivitätsminderung des Hippo-Signalweges im Rahmen der DN und identifizierten *FERM Domain Containing 3* (FRMD3) als einen Kandidaten für die DN, welches für das Protein 4.1O kodiert. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Expression verschiedener Spleißvarianten des Proteins 4.1O die Aktivität des Hippo-Signalweges in Abhängigkeit von Glukose beeinflusst. Außerdem wurde in vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine Interaktion des Proteins 4.1O mit Nephrin nachgewiesen. Deswegen wurde zusätzlich geprüft, ob alle vier Protein 4.1O-Varianten 207, 201, 204 und 202 mit Nephrin interagieren und ob diese Interaktion durch Glukose beeinflusst wird.

Für die Versuche zum Hippo-Signalweg wurden HEK293T-Zellen mit den Protein 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204, 202 oder einer 207-Mutante (207 Δ FERM Δ cc) transfiziert und bei *low glucose* (5,5 mM)-, *high glucose* (25 mM)-Bedingungen oder einer osmotischen Kontrolle mit Mannitol (5,5 mM Glukose + 19,5 mM Mannitol) kultiviert. Es wurden Ganzzelllysate hergestellt, die nach dem Western Blot in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes *Yes-associated protein* (YAP) an Serin 397 gefärbt wurden. Für die Versuche mit Nephrin exprimierten die HEK293T-Zellen den C-Terminus von Nephrin und je eine der untersuchten Protein 4.1O-Spleißvarianten. Anschließend wurden sie ebenfalls bei *low glucose*-, *high glucose*- und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert. Es wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt, die Protein 4.1O-Spleißvarianten nach dem Western Blot mit einem nachweisenden Antikörper gefärbt und schließlich Densitometrien für die statistische Auswertung durchgeführt.

Es konnte eine signifikante Steigerung der YAP-Phosphorylierung unter Expression von Protein 4.1O-207, -201 und der 207-Mutante bei den *high glucose*-Bedingungen nachgewiesen werden. Die Expression der Varianten 204 und 202 zeigte dagegen keinen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung. Da nur 207 und 201 über die vollständige C-terminale Domäne verfügen, spielt diese Domäne hierbei vermutlich eine entscheidende Rolle. Im Allgemeinen legen diese Ergebnisse eine protektive Funktion der 4.1O-Varianten 207 und 201 im Kontext der pathologischen Prozesse der DN nahe, da ihre Expression die Aktivität des bei der DN normalerweise aktivitätsgeminderten Hippo-Signalweges steigert.

Mithilfe der Co-Immunpräzipitationen konnte zwar für alle vier 4.1O-Varianten eine Interaktion mit dem C-Terminus von Nephrin nachgewiesen werden, ein Glukoseeinfluss auf diese Interaktion zeigte sich jedoch nicht.

Abstract

Diabetic nephropathy (DN) is a leading cause of kidney failure worldwide and, consequently, leads to a financial and social burden. Previous work has shown that Hippo signaling is decreased in DN. Moreover, FERM Domain Containing 3 (FRMD3) encoding protein 4.1O has been identified as a candidate gene for DN. Therefore, this work aimed to examine how the expression of different protein 4.1O splice variants influences Hippo signaling in a glucose-dependent manner. As previous experiments have shown that protein 4.1O interacts with nephrin, other experiments of this work addressed the question whether all of the protein 4.1O splice variants 207, 201, 204 and 202 interact with nephrin and if this interaction is influenced in a glucose-dependent manner.

HEK293T cells were transfected with the protein 4.1O splice variants 207, 201, 204, 202 or a 207 mutant and cultivated in low glucose (5.5 mM), high glucose (25 mM) concentrations or an osmotic control (5.5 mM glucose and 19,5 mM mannitol). After cell lysis, western blot was performed for Yes-associated protein phosphorylated at serine 397 (phospho-YAP S397) and actin. To investigate the interaction between nephrin and the protein 4.1O splice variants and a possible modulation by glucose, HEK293T cells coexpressed nephrin c-terminus and protein 4.1O 207, 201, 204 or 202. These cells were cultivated in low glucose, high glucose or mannitol. After cell lysis, co-immunoprecipitations were performed and, after western blot, protein 4.1O variants were detected with an appropriate antibody.

The experiments showed an increase of Hippo signaling under high glucose conditions if protein 4.1O 207, 201 or the 207 mutant, but not 204 and 202, are expressed. As 207 und 201 have the complete c-terminal domain, but not 204 und 202, this domain may play a vital role in controlling Hippo signaling under high glucose conditions. Because of the increase in Hippo signaling due to the expression of 207 and 201, these protein 4.1O variants seem to have a protective function in DN. Nevertheless, further investigations are needed to identify the underlying pathomechanism for glucose-dependent regulation of the Hippo pathway by different splice variants of protein 4.1O, helping to understand its molecular function in DN.

The investigations of nephrin-4.1O splice variant-interactions and a possible influence by glucose revealed that protein 4.1O 207, 201, 204 and 202 interact with nephrin. However, a modulation of this interaction by different glucose conditions could not be detected.

Abkürzungsverzeichnis

207ΔFERMΔcc	207-Mutante ohne FERM- und ohne <i>Coiled-coil</i> -Domäne	CASK	Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase
4.1	Bande 4.1 Protein	CC	<i>Coiled-coil</i>
4.1B	Bande 4.1 Protein, <i>brain type</i>	CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
4.1G	Bande 4.1 Protein, <i>general type</i>	CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i> , chronische Nierenkrankheit
4.1N	Bande 4.1 Protein, <i>neuronal type</i>	CK1δ/ε	Caseinkinase 1 δ/ε
4.1O	Protein 4.1O, Bande 4.1 Protein, <i>ovary type</i>	cm	Zentimeter
4.1R	Bande 4.1 Protein, <i>red blood cell type</i> , Protein 4.1R	CO₂	Kohlendioxid
AA	<i>amino acids</i> , Aminosäuren	Co-IP	Co-Immunpräzipitation
Abb.	Abbildung	CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
ABD	Aktin-Bindungsdomäne	CTD	C-terminale Domäne
ADA	<i>American Diabetes Association</i>	CTGF	<i>Connective Tissue Growth Factor</i>
AGE	<i>advanced glycated end products</i>	cyt	zytoplasmatischer Anteil
AK	Antikörper	ddH₂O	demineralisiertes Wasser
Amp.	Ampicillin	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ANOVA	<i>One-Way Analysis of Variance</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
APS	Ammoniumperoxidsulfat	DN	diabetische Nephropathie
Aqua dest.	<i>aqua destillata</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure (Träger der Erbinformation)
AREG	Amphiregulin	DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution
AS	Aminosäuren	DTT	1,4-Dithiothreitol
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>	EASD	<i>European Association for the Study of Diabetes</i>
BMP	<i>bone morphogenetic pathway</i>	ECL	Elektrochemilumineszenz
bp	Basenpaare	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Anion
C	Carboxy	EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus		
CaCl₂	Calciumchlorid		

eGFR	<i>estimated glomerular filtration rate</i>	HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
F.	<i>FLAG-markiert</i>	Ig	Immunglobulin
F-Aktin	filamentöses Aktin	IgG	Immunglobulin G
FA	<i>FERM adjacent</i>	IP	Immunpräzipitation
FBS	<i>Fetal Bovine Serum, Fetales Rinderserum</i>	KCl	Kaliumchlorid
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	kDa	Kilodalton
FERM	<i>Four-point-one (4.1), Ezrin, Radixin, Moesin</i>	KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
FRMD3	<i>FERM Domain Containing 3</i>	KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
g	g-Kraft, relative Zentrifugalkraft, als Vielfaches der Standardbeschleunigung ausgedrückt	l	Liter
g	Gramm	LATS	<i>Large tumor suppressor kinase</i>
GBM	glomeruläre Basalmembran	LB	<i>Luria Bertani</i>
GFR	glomeruläre Filtrationsrate	M	Molar
GLEPP1	<i>Glomerular epithelial protein 1</i>	mA	Milliampere
GLP-1-RA	<i>Glucagon-like peptide 1-Rezeptoragonist</i>	mAb	<i>monoclonal antibody</i>
GoKinD	<i>Genetics of Kidneys in Diabetes</i>	MAGUK	Membran-assoziierte Guanylatkinase
GTPase	Guanosintriphosphatase	mg	Milligramm
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien	mg/dl	Milligramm pro Deziliter
GZL	Ganzzelllysate	MgCl₂	Magnesiumchlorid
HbA1c	Hämoglobin A1c (Langzeit-Blutzuckerwert)	ml	Milliliter
HCl	Salzsäure	mM	Millimolar
HEBS	<i>HEPES Buffered Saline</i>	mm	Millimeter
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>	MOB1	<i>Mps One Binder 1</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure	moe	<i>mosaic eyes</i>
HG	<i>high glucose</i>	MRA	Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten
		mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
		MST	<i>Mammalian sterile 20-like kinase</i>
		MYPT1	<i>Myosin Phosphatase Target Subunit 1</i>
		n	Stichprobenumfang
		N	Amino

NaCl	Natriumchlorid	SAV1	<i>Salvador Family WW Domain Containing Protein 1</i>
NaCO₃	Natriumcarbonat	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Na₂HPO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat	SEM	<i>standard error of the mean</i>
NaH₂PO₄	Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Ser	Serin
NaOH	Natriumhydroxid	SGLT2	<i>Sodium-glucose co-transporter 2</i>
Na₃VO₄	Natriumorthovanadat	slg	<i>soluble immunoglobulin</i>
NC-Membran	Nitrocellulose-Membran	SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
Nck	<i>Non-catalytic region of tyrosine kinase</i>	T2D	Typ-2-Diabetes
ng	Nanogramm	TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
nm	Nanometer	TAZ	transkriptioneller Ko-Aktivator mit PDZ-Bindungsmotiv
NPHS1	<i>Nephrotic syndrome type 1</i>	TEAD1-4	TEA-Domänen-Transkriptionsfaktoren 1-4
n.s.	nicht signifikant	Temed	Tetramethylethylen-diamin
p	Signifikanzwert	Tet.	Tetracyclin
P-YAP Ser397	am Serin 397 phosphoryliertes YAP	TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>	TJ	<i>Tight Junction</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-elektrophorese	TLC	Tetracyclin-Hydrochlorid
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	V	Volt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	Y	Tyrosin
P protein G	<i>Pulldown</i> mit Protein G	YAP	<i>Yes-associated protein</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System	ZO-1	<i>Zonula occludens-1</i>
RhoA	RhoA GTPase	β-TRCP	<i>β-transducin repeat containing protein</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>	µg	Mikrogramm
rpm	Umdrehungen pro Minute	µl	Mikroliter
RPTC	<i>Renal Proximal Tubular Cells</i>	µm	Mikrometer
S	Serin	°C	Grad Celcius
s.	siehe	%	Prozent
SAB	Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne		

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Diabetische Nephropathie	1
1.1.1	Epidemiologie der diabetischen Nephropathie	1
1.1.2	Klinische und histologische Merkmale der diabetischen Nephropathie	1
1.1.3	Möglichkeiten der medikamentösen Therapie der diabetischen Nephropathie	3
1.2	Der glomeruläre Filter	5
1.2.1	Aufbau des glomerulären Filters	5
1.2.2	Die glomeruläre Schlitzmembran	7
1.2.3	Das Schlitzmembranprotein Nephrin	9
1.2.4	Das Mesangium	11
1.3	Der Hippo-Signalweg	11
1.3.1	Funktion des Hippo-Signalweges	11
1.3.2	Akteure des Hippo-Signalweges	12
1.3.3	Der Hippo-Signalweg bei der diabetischen Nephropathie	14
1.4	FRMD3 – Protein 4.1O	16
1.4.1	Die Proteinfamilie 4.1	16
1.4.2	Das Protein 4.1O	18
1.4.3	Spleißvarianten des Proteins 4.1O	19
1.4.4	FRMD3 als Kandidatengen der diabetischen Nephropathie	20
1.5	Ziele der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material	24
2.1.1	Zellkultur	24
2.1.2	Transfektion	24
2.1.3	Zellernte	25
2.1.3.1	Ganzzelllysate und Co-Immunpräzipitationen	25
2.1.3.2	SDS-Gelelektrophorese	26
2.1.3.3	Western Blot	27
2.1.3.4	Immunfärbung – Antikörper	28
2.1.3.5	Chemilumineszenz	29
2.1.4	Plasmide	29
2.1.4.1	Auflistung der verwendeten Plasmide	29
2.1.4.2	Transformation und Amplifikation	30
2.1.4.3	Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation	30
2.1.4.4	DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese	30
2.1.5	Geräte	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Zellkultur	32
2.2.1.1	Kultivierung der HEK293T-Zellen	32
2.2.1.2	Aussaat der Zellen für die Transfektion	33
2.2.1.3	Transfektion	33
2.2.2	Zellernte	34

2.2.2.1	Ganzzelllysate (GZL).....	34
2.2.2.2	Co-Immunpräzipitation (Co-IP).....	35
2.2.2.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.2.4	Western Blot.....	37
2.2.2.5	Immunfärbung	38
2.2.2.6	Auswertung	39
2.2.3	Plasmide.....	40
2.2.3.1	Transformation und Amplifikation	40
2.2.3.2	Mini-Kulturen	40
2.2.3.3	Maxi-Kulturen	40
2.2.3.4	Maxi-Präparation	41
2.2.3.5	DNA-Verdau	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Der Einfluss der Expression der Protein 4.1O-Spleißvarianten auf die YAP- Phosphorylierung bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen	43
3.1.1	Die Expression von 4.1O-207 führt zur Glukose-abhängigen Steigerung der YAP-Phosphorylierung	43
3.1.2	Der Einfluss von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf die YAP- Phosphorylierung unter Expression von 4.1O-201	44
3.1.3	Der Einfluss der Expression von 4.1O-204 auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration	45
3.1.4	Der Effekt der Expression von 4.1O-202 auf die YAP-Phosphorylierung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen	47
3.1.5	Die Expression der 207-Mutante steigert die YAP-Phosphorylierung bei <i>high glucose</i> - und hyperosmolaren Bedingungen	48
3.2	Die 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204 und 202 interagieren mit Nephrin	50
3.2.1	Protein 4.1O-207 interagiert mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin....	50
3.2.2	4.1O-201 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin	51
3.2.3	4.1O-204 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin	53
3.2.4	4.1O-202 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin	54
4	Diskussion	56
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	56
4.2	Diskussion der Methodik und Ergebnisse der Versuche zum Hippo-Signalweg	56
4.2.1	Diskussion der Methodik der Versuche zum Hippo-Signalweg	56
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse zum Hippo-Signalweg	60
4.3	Diskussion der Methodik und Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin	67
4.3.1	Diskussion der Methodik der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin	67
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin	69
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	75
6	Anhang.....	97

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der histologischen Veränderungen bei der diabetischen Glomerulopathie	3
Abb. 2: Komponenten des Proteinkomplexes der glomerulären Schlitzmembran	8
Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Schlitzmembranproteins Nephrin.....	9
Abb. 4: Schematische Darstellung des Hippo-Signalweges mit seinen Hauptakteuren	13
Abb. 5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Protein 4.1O-Spleißvarianten 201, 204, 207, 202 und einer 207-Mutante.....	20
Abb. 6: 4.1O-207 steigert die Phosphorylierung des <i>Yes-associated protein</i> (YAP) unter <i>high glucose</i> -Bedingungen in HEK293T-Zellen.....	44
Abb. 7: Unter Expression von 4.1O-201 wurde die YAP-Phosphorylierung in HEK293T-Zellen bei den <i>high glucose</i> -Bedingungen signifikant gesteigert.	45
Abb. 8: Die Expression von 4.1O-204 hatte keinen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung in HEK293T-Zellen.	46
Abb. 9: Unter Expression von 4.1O-202 zeigt sich keine Veränderung der YAP-Phosphorylierung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen in HEK293T-Zellen.	48
Abb. 10: Unter Expression der 207-Mutante wurde die YAP-Phosphorylierung unter <i>high glucose</i> -Bedingungen und hyperosmolaren Bedingungen gesteigert...	49
Abb. 11: 4.1O-207 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.	51
Abb. 12: 4.1O-201 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.	52
Abb. 13: 4.1O-204 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.	54
Abb. 14: 4.1O-202 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkultur	24
Tabelle 2: Transfektion	24
Tabelle 3: Ganzzelllysate und Co-Immünpräzipitationen.....	25
Tabelle 4: SDS-Gelelektrophorese	26
Tabelle 5: Western Blot	27
Tabelle 6: Primärantikörper	28
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	28
Tabelle 8: Chemolumineszenz	29
Tabelle 9: Transformation und Amplifikation.....	30
Tabelle 10: Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation	30
Tabelle 11: DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese.....	30
Tabelle 12: Geräte	31

1 Einleitung

1.1 Diabetische Nephropathie

1.1.1 Epidemiologie der diabetischen Nephropathie

Die diabetische Nephropathie (DN) ist eine häufige mikrovaskuläre Komplikation des Diabetes mellitus. Ihre Prävalenz liegt bei Typ-1- und Typ-2-Diabetikern bei bis zu 40 % (1–3) und wird nach aktuellen Prognosen mit der steigenden Prävalenz des Diabetes mellitus weltweit zunehmen (2, 4–6).

Ferner kann sie mit erheblichen gesundheitlichen Folgen einhergehen. Sie ist weltweit die führende Ursache für Nierenversagen (2, 3, 7). So ist in Deutschland bei jedem dritten Patienten mit Nierenersatztherapie das Nierenversagen auf einen Diabetes mellitus zurückzuführen (8). Zudem sind die weltweiten Todesfälle durch eine Diabetes-bedingte chronische Nierenkrankheit (*Chronic Kidney Disease* [CKD]) im letzten Jahrzehnt bei Typ-1- und Typ-2-Diabetikern gestiegen (9).

Für das deutsche Gesundheitssystem stellt die diabetische Nephropathie eine große finanzielle Belastung dar. Bereits die Grunderkrankung Diabetes mellitus verursacht hohe Kosten für das deutsche Gesundheitssystem (10–12) und ein Großteil der Kosten resultiert aus der Behandlung der diabetischen Langzeitkomplikationen (12–14), zu denen kardiovaskuläre und renale Erkrankungen zählen (15, 16). Nichols *et al.* (17) konnten belegen, dass Patienten mit klinischen Zeichen einer DN (Mikro- oder Makroalbuminurie) signifikant höhere Gesamtkosten verursachen als Diabetiker mit Normoalbuminurie.

1.1.2 Klinische und histologische Merkmale der diabetischen Nephropathie

Wie Lin *et al.* (18) darlegten, äußert sich die DN als klinisches Syndrom, das mit einer persistierenden Albuminurie, einem erhöhten arteriellen Blutdruck, einer reduzierten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und damit assoziierter Mortalität einhergeht. Das klinisch charakteristischste Merkmal ist die Albuminurie. Die DN entwickelt sich grob von einer glomerulären Hyperfiltration, über eine Mikroalbuminurie (Albuminausscheidung 30-300 mg/d) und später Makroalbuminurie (Albuminausscheidung >300 mg/d) zu einer Abnahme der GFR. Dieser stadienhafte Verlauf ist nach neuen Erkenntnissen jedoch insbesondere bei Typ-2-Diabetikern nicht zwingend zu beobachten.

Die Diabeteserkrankung allein ist bereits ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Nierenversagens (19). Eine zusätzlich vorliegende Mikro- oder Makroalbuminurie (wie

bei der DN) erhöhen das Risiko für die Entwicklung eines Nierenversagens (20, 21) sowie für kardiovaskuläre Ereignisse und kardiovaskulär bedingten Tod (22, 23) und steigern somit die allgemeine Mortalitätsrate (23, 24). Zudem weisen Diabetiker mit Albuminurie eine stärkere Abnahme der GFR als Diabetiker ohne Albuminurie auf (20). Auch eine niedrigere GFR erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse unabhängig von einer eventuellen zusätzlichen Albuminurie (22).

Histopathologisch lässt sich die DN auf Empfehlung der *Renal Pathology Society* entsprechend der glomerulären Läsionen in vier Stadien einteilen (25): Zunächst kommt es zu einer Verdickung der glomerulären Basalmembran (GBM). Daran schließt sich eine zunächst milde (Abb. 1B), dann schwere mesangiale Expansion (Abb. 1C) an. Schließlich entwickeln die Patienten eine noduläre Sklerose (Kimmelstiel-Wilson) (Abb. 1D) und im Endstadium eine fortgeschrittene diabetische Glomerulosklerose durch eine exzessive Akkumulation von Proteinen der extrazellulären Matrix im mesangialen Raum (Abb. 1D–F). Neben den glomerulären Veränderungen sind ebenfalls eine Verdickung der tubulären Basalmembran, eine tubuläre Atrophie, eine interstitielle Fibrose und entzündliche Infiltrate mit T-Lymphozyten und Makrophagen im Interstitium möglich (25).

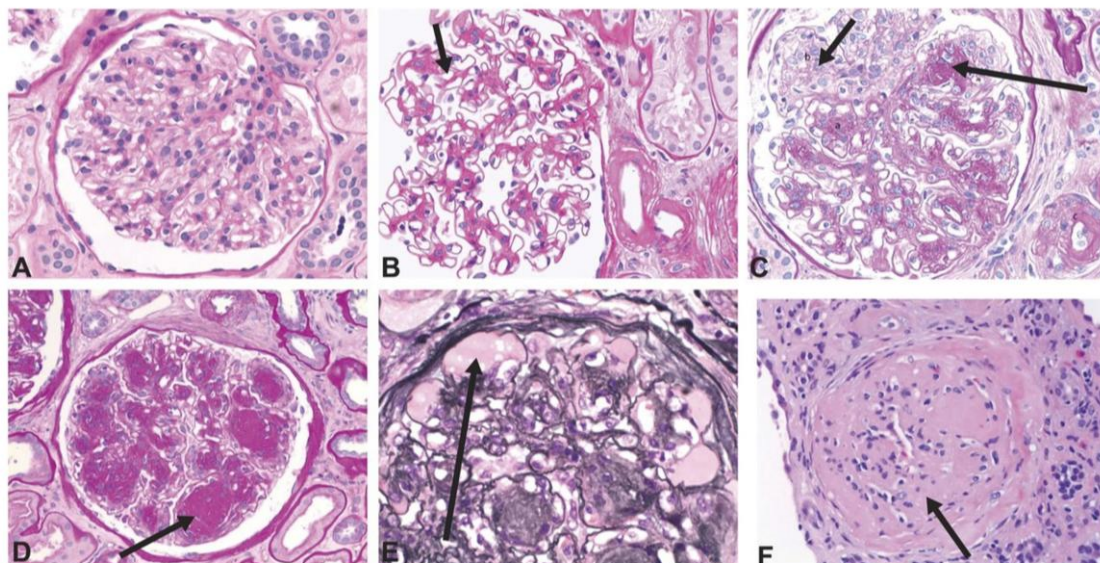


Abb. 1: Darstellung der histologischen Veränderungen bei der diabetischen Glomerulopathie

- (A) Normaler Glomerulus
- (B) Diffuse mesangiale Expansion mit Proliferation der Mesangialzellen
- (C) Prominente mesangiale Expansion mit nodulären Formationen und Mesangiolyse
- (D) Akkumulation von mesangialer Matrix mit Bildung von Kimmelstiel-Wilson-Läsionen
- (E) Dilatation der Kapillaren mit Bildung von Mikroaneurysmata und subintimaler Hyalineinlagerung (plasmatische Insudation)
- (F) Umgebauter Glomerulus

A–D und F wurden mittels Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) gefärbt, E mit der Färbung nach Jones. Originalvergrößerung, $\times 400$.

Veröffentlicht mit der Erlaubnis von Alicic, Rooney *et al.* 2017 (1), Copyright © 2017 by the American Society of Nephrology.

1.1.3 Möglichkeiten der medikamentösen Therapie der diabetischen Nephropathie

Aufgrund der in Abschnitt 1.1.1 genannten gesundheitlichen und volkswirtschaftlichen Belastungen, die durch die DN verursacht werden, ist eine effektive Vorbeugung und Therapie dieser Erkrankung von großer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden mit den Substanzgruppen der *Sodium-glucose cotransporter 2* (SGLT2)-Inhibitoren und *Glucagon-like peptide-1*-Rezeptoragonisten (GLP-1-RA) medikamentöse Therapiemöglichkeiten gefunden, die ursprünglich in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 zur Senkung des Blutzuckers eingesetzt wurden (26). Nach neuen Erkenntnissen besitzen sie darüber hinaus kardio- und renoprotektive Effekte und werden daher bereits von der *American Diabetes Association* (ADA) (27) und der *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) (28) für die Therapie von Hochrisikopatienten mit Typ-2-Diabetes empfohlen. In großen randomisierten klinischen Studien konnte gezeigt

werden, dass die SGLT2-Inhibitoren Empa-, Dapa- und Canagliflozin nicht nur kardiovaskulär protektiv wirkten, sondern auch das Risiko für die Entwicklung eines Nierenversagens und der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie senkten sowie die Progression einer vorhandenen Albuminurie und die Abnahme der GFR verhinderten (29–33). Eine Meta-Analyse von acht kardiovaskulären Endpunktstudien der GLP-1-RA wie Semaglutide und Liraglutide zeigte ganz ähnliche Effekte der GLP-1-RA (34).

Welche zugrundeliegenden Mechanismen zu den erwähnten positiven Effekten der SGLT2-Inhibitoren und GLP-1-RA führen, sind noch nicht abschließend geklärt oder bekannt. Unter anderem wird die positive Wirkung auf die Nieren durch eine Reduktion der glomerulären Hyperfiltration erklärt, die bei den beiden Substanzgruppen wahrscheinlich durch einen jeweils anderen Mechanismus über das tubuloglomeruläre Feedback vermittelt wird (35, 36). Wie Kawanami *et al.* (37) ausgehend von Tierexperimenten in ihrer Übersichtsarbeit 2017 darlegten, weisen die SGLT2-Inhibitoren zahlreiche verschiedene Angriffspunkte auf und hemmen zum Beispiel die Expression renaler Wachstumsfaktoren, *Advanced Glycated End Products* (AGE) und renaler Fibrosemarker wie *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), Fibronectin und *Transforming Growth Factor β 1* (TGF- β 1). Des Weiteren scheinen sie die renale Fibrose, Glomerulosklerose und mesangiale Expansion zu verringern. Auch für die GLP-1-RA wurde ein Einfluss auf Inflammation, oxidativen Stress, den AGE-Signalweg, Apoptose und Fibrose beschrieben (38, 39).

Wie die beiden Substanzgruppen im Menschen wirken und ihre vielseitigen positiven Effekte hervorrufen, bedarf noch weiterer Forschung.

Eine weitere Substanzgruppe, die aktuell Eingang in die Therapie der DN findet, sind die nicht-steroidalen Mineralokortikoid-Rezeptor-Antagonisten (MRA) (40, 41). Analog zu den steroidalen MRA Spironolacton und Eplerenon zielen die nicht-steroidalen MRA darauf ab, die Auswirkungen eines überaktiven Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) zu unterbinden (40, 42). Damit sind unter anderem antiinflammatorische und antifibrotische sowie kardio- und renoprotektive Wirkungen einschließlich der Reduktion einer vorhandenen Proteinurie assoziiert (40, 42, 43). Zudem wurde mit der Entwicklung der nicht-steroidalen MRA das Ziel verfolgt, die unerwünschten Wirkungen der steroidalen MRA, insbesondere das Risiko einer Hyperkaliämie, aber auch unerwünschte Sexualhormonrezeptor-vermittelte Nebenwirkungen zu vermeiden (40, 44).

Der einzige bisher von der amerikanischen *Food and Drug Administration* (FDA) (45) und der *European Medicines Agency* (EMA) (46) zugelassene Wirkstoff ist Finerenon.

In dem Konsensbericht der ADA und der *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) von 2022 wird der Einsatz von Finerenon bei Patienten mit Typ-2-Diabetes, einer eGFR von ≥ 25 ml/min/1,73 m² und einer Albumin-Kreatinin-Ratio im Urin von ≥ 30 mg/g trotz einer maximal tolerierten Dosis eines RAAS-Inhibitors empfohlen (47). Studien zu Finerenon im Kontext der DN bei Typ-2-Diabetikern zeigten, dass Finerenon das Risiko für die Progression einer CKD und das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse nachweislich senkt (48, 49). Aufgrund der kurzen Zulassungsdauer existieren bisher noch keine Langzeitdaten. Ferner muss in fortlaufenden Studien gezeigt werden, ob die gleichzeitige Anwendung von Finerenon, RAAS-Inhibitoren und SGLT2-Inhibitoren zu einer zusätzlichen Reduktion des Progressionsrisikos einer CKD führt (40).

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Pathophysiologie der DN und mit der Identifizierung neuer Signalwege als mögliches Angriffsziel ergeben sich neue Möglichkeiten zur Behandlung der DN und Verlangsamung ihrer Progression. Aus diesem Grund widmet sich diese Arbeit den zugrundeliegenden Mechanismen auf molekularer Ebene, um daraus zukünftig neue Therapieansätze ableiten zu können.

1.2 Der glomeruläre Filter

1.2.1 Aufbau des glomerulären Filters

Der glomeruläre Filter in der Niere ist der Ort der glomerulären Filtration bzw. Bildung des Primärharns. Die Integrität seiner Komponenten ist essenziell für seine lebenswichtige Aufgabe, die abnormale Filtration von Plasmaproteinen zu verhindern. Er besteht von der Blut- zur Harnseite aus drei Schichten:

1. dem fenestrierten Endothel der glomerulären Kapillaren
2. der glomerulären Basalmembran und
3. den podozytären Fußfortsätzen (50, 51).

Durch diesen dreischichtigen Aufbau entsteht ein größen- und ladungsselektiver Filter, den nicht alle Blutbestandteile frei passieren können (50, 52). Zum einen stellt das fenestrierte glomeruläre Endothel ein mechanisches Hindernis für Makromoleküle, insbesondere für negativ geladene Makromoleküle, dar (53), da die Fenestrae mit einem Durchmesser von 50-100 Nanometer (nm) (50) die Filtration größerer Blutbestandteile verhindern. Zum anderen werden die glomerulären Endothelzellen von einer negativ

geladenen Glykokalyx bedeckt, die stark glykosylierte Glykoproteine und von den Endothelzellen exprimierte Heparansulfat-Glykosaminoglykan-Ketten enthält (54).

Die endotheliale Zellmembran einschließlich ihrer Glykokalyx und die angrenzende GBM bilden zusammen die primäre Filterstruktur für große anionische Proteine wie Ferritin (52) und tragen dadurch zur Größen- und Ladungsselektivität des glomerulären Filters bei. Die GBM ist dreischichtig und besteht aus der subendothelialen Lamina rara interna, der zentralen Lamina densa und der subepithelialen Lamina rara externa (55). Die Permeabilitätseigenschaften der GBM werden durch die sich hauptsächlich in den Laminae rarae lokalisierte negative Ladung bestimmt, die durch den dortigen hohen Anteil an Heparansulfat zustande kommt (55).

Die Podozyten bilden die dritte und äußere Schicht des glomerulären Filters. Sie sind hochdifferenzierte Zellen mit einem in den Harnraum der Bowman-Kapsel hineinragenden Zellkörper und an der Basis liegenden Primärfortsätzen, die den glomerulären Kapillaren aufliegen und wiederum kleinere sog. Fußfortsätze ausbilden (56). Das Zytoskelett ihres Zellkörpers und ihrer Primärfortsätze besteht aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten (56), während die Fußfortsätze Schlingen von Mikrofilament-Bündeln aus Myosin, filamentösem Aktin (F-Aktin) und α -Aktinin enthalten (56–58). Vor allem das Zytoskelett in den Fußfortsätzen ist besonders und erfüllt eine wichtige Aufgabe für die Podozyten, da es ihre strukturelle Integrität garantiert, indem es zur Erhaltung stabiler Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Podozyten beiträgt (56).

Podozyten bilden nicht nur Zellkontakte untereinander, sondern stehen auch über $\alpha 3 \beta 1$ -Integrine mit den Komponenten der darunterliegenden Basalmembran in Verbindung (56, 59, 60). Zellexperimente legen nahe, dass eine Störung oder pathologische Veränderung dieser Integrine zu einer gestörten Adhäsion der Podozyten und damit strukturellen Integrität des Glomerulums führt und die normale Funktion des glomerulären Filters beeinträchtigen kann (61). Intrazellulär interagieren Integrine mit verschiedenen Ankerproteinen wie α -Aktinin, die entweder direkt oder über die Bindung anderer Ankerproteine Integrine mit Aktinfilamenten verknüpfen (62, 63).

Podozyten sind an einer Vielzahl von glomerulären Erkrankungen beteiligt (64). Insbesondere die morphologische Veränderung und Ablösung ihrer Fußfortsätze von der GBM wurde häufig mit der Entwicklung einer Proteinurie assoziiert (65). In diversen proteinurischen Glomerulopathien kommt es zum sog. Effacement der podozytären Fußfortsätze, welches mit einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts einhergeht, die

zu einer Fusion der Filtrationsschlitze und Veränderung der Erscheinung der Fußfortsätze von schmalen, interdigitierenden Strukturen hin zu plumpen, breiteren und abgeflachten Fortsätzen führt (65–68).

Aufgrund ihrer Komplexität und Bedeutung für diese Arbeit ist der glomerulären Schlitzmembran ein eigenes Unterkapitel gewidmet.

1.2.2 Die glomeruläre Schlitzmembran

Die podozytären Fußfortsätze benachbarter Podozyten verzweigen sich ineinander (50, 56) und begrenzen auf diese Weise die zwischen ihnen liegenden 30-40 nm weiten Filtrationsschlitze (69, 70). Diese Filtrationsschlitze werden durch die sog. glomeruläre Schlitzmembran überbrückt (56, 69). Die glomeruläre Schlitzmembran bildet eine reißverschlussartige Struktur mit einem zentral gelegenen kontinuierlichen Filament, von dem aus regelmäßige Querbrücken zu der Zellmembran der gegenüberliegenden podozytären Fußfortsätze ziehen (50, 56, 69, 70). Sie stellt möglicherweise einen feineren Filter als das glomeruläre Endothel und die glomeruläre Basalmembran dar und könnte dadurch einen bedeutenden Beitrag zur Größenselektivität des glomerulären Filters leisten (71, 72). Auf molekularer Ebene bildet sie einen dynamischen Multiproteinkomplex, der sich während der Podozytendifferenzierung und der pathologischen Prozesse, die zum podozytären Effacement führen, verändert (65, 67, 68, 73).

Die Schlüsselkomponente der glomerulären Schlitzmembran ist das Protein Nephrin (70, 74), auf das wegen seiner Bedeutung für die durchgeführten Versuche dieser Arbeit im folgenden Abschnitt detailliert eingegangen wird. Weitere Schlitzmembranproteine sind das integrale Membranprotein Podocin (75, 76), Neph1 (77), Neph2 (78), das CD2-assoziierte Protein (CD2AP) (79) und *Zonula occludens-1* (ZO-1) (80). Der Aufbau der glomerulären Schlitzmembran mit den genannten Schlitzmembranproteinen ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Schlitzmembranproteine erfüllen für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran unterschiedliche Funktionen. Podocin und CD2AP interagieren im Zytoplasma mit der intrazellulären Domäne von Nephrin (79, 81) und fördern die Lokalisation von Nephrin in spezialisierten Membrandomänen, den sog. *lipid rafts* (82, 83). Darüber hinaus dienen ZO-1, CD2AP und Catenine als Adaptermoleküle zwischen den transmembranen Schlitzmembranmolekülen Nephrin und P-Cadherin und den Aktinfilamenten (Abb. 2) (56, 73). Auf diese Weise ist das podozytäre Zytoskelett im Bereich der Seiten der Fußfortsätze mit dem Schlitzmembrankomplex verknüpft (56, 73). Allgemein sind die Schlitzmembranproteine für die Funktion der

glomerulären Schlitzmembran essenziell und ihr Fehlen oder ihr Defekt hat eine massive Proteinurie (73) und bzw. oder ein frühzeitiges Versterben in entsprechenden Tierexperimenten zur Folge (77, 81).

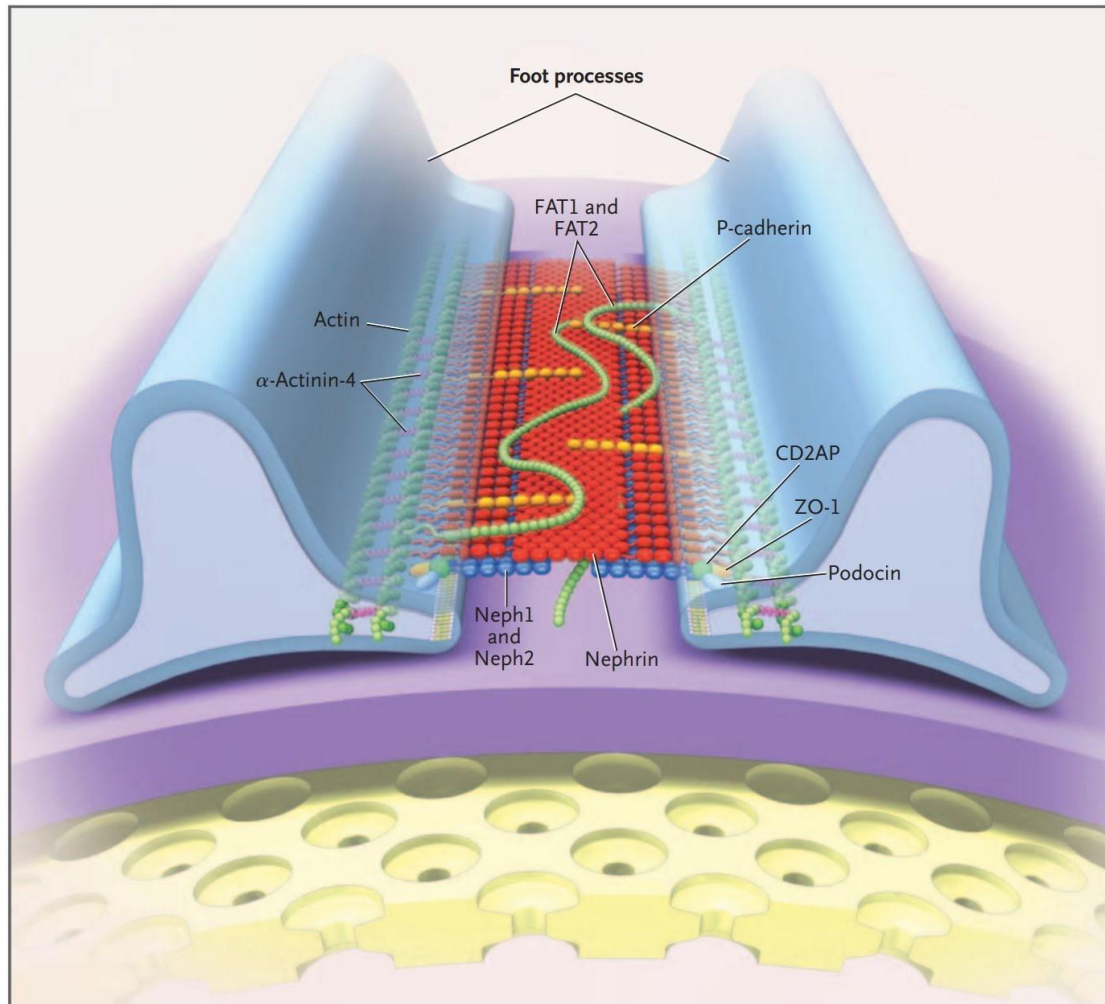


Abb. 2: Komponenten des Proteinkomplexes der glomerulären Schlitzmembran

Nephrinmoleküle gegenüberliegender Fußfortsätze interagieren in der Mitte des Filtrationschlitzes miteinander und bilden eine zentrale Dichte mit Poren zu beiden Seiten.

In den Filtrationsschlitzes interagiert Nephrin ebenfalls mit Neph1 und Neph2 sowie FAT1 und FAT2. Nephrin- und Neph-Moleküle interagieren intrazellulär mit Podocin und dem CD2-assoziierten Protein (CD2AP) und stellen dadurch vermutlich eine Verbindung zu *Zonula occludens-1* (ZO-1) und den Aktinbündeln her.

Die Aktinbündel werden von α -Aktinin-4-Molekülen begleitet. P-Cadherin ist gleichermaßen ein Transmembranprotein im Bereich der glomerulären Schlitzmembran (73).

Veröffentlicht mit der Erlaubnis von Tryggvason *et al.* 2006 (73), Copyright Massachusetts Medical Society.

1.2.3 Das Schlitzmembranprotein Nephrin

Da in den Versuchen dieser Arbeit die Interaktion von Nephrin mit den Protein 4.1O-Spleißvarianten untersucht wurde, soll im Folgenden näher auf das Schlitzmembranprotein Nephrin eingegangen werden.

Nephrin wird in der Niere ausschließlich im Bereich der glomerulären Schlitzmembranen an den podozytären Fußfortsätzen exprimiert (84). Es wird durch das Gen *Nephrotic syndrome type 1* (NPHS1) auf Chromosom 19q13.1 kodiert. Mutationen des NPHS1-Gens führen zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom Finnischen-Typ, das mit einer massiven Proteinurie im Neugeborenenalter einhergeht (85). Wie aus Untersuchungen von Nierenbiopsaten von NPHS1-Patienten und Nephrin-*Knockout*-Mäusen hervorgeht, kommt Nephrin eine wichtige Rolle für die Bildung und normale Konfiguration der Filtrationsschlitz und glomerulären Schlitzmembranen zu, da bei Fehlen oder einer Mutation von Nephrin die glomerulären Schlitzmembranen fehlten und sich engere Filtrationsschlitz als die normalerweise 30-40 nm breiten zeigten (70).

Wie in Abbildung 3 dargestellt, ist Nephrin ein Transmembranprotein der Immunoglobulin-Superfamilie und besitzt eine extrazelluläre Domäne mit acht Immunoglobulin G (IgG)-artigen Motiven und einem Fibronektin Typ III-artigen Motiv, eine transmembrane Domäne und eine zytosolische Carboxy (C)-terminale Domäne (73, 85).

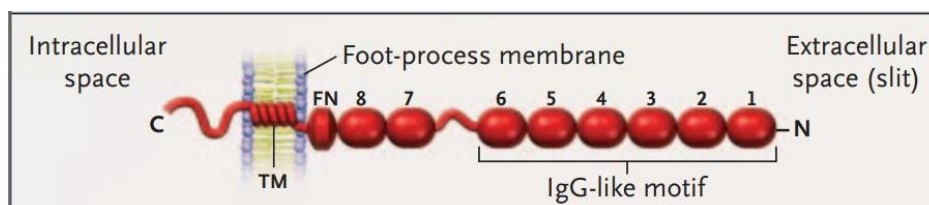


Abb. 3: Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Schlitzmembranproteins Nephrin

Nephrin ist an der Zellmembran der podozytären Fußfortsätze lokalisiert. Es besitzt eine kurze Carboxy (C)-terminale intrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne (TM) und eine Amino (N)-terminale extrazelluläre Domäne mit einem proximalen Fibronektin Typ III-artigen Motiv (FN) und acht IgG-artigen Motiven, die in den Filtrationsschlitz hineinragen.

Veröffentlicht mit der Erlaubnis von Tryggvason *et al.* 2006 (73), *Copyright Massachusetts Medical Society.*

Die extrazellulären Immunoglobulin (Ig)-Domänen bilden durch die Interaktion mit den Ig-Domänen von Nephrin-Molekülen benachbarter Fußfortsätze und den Ig-Domänen

von Neph1-Molekülen das strukturelle Grundgerüst der glomerulären Schlitzmembran (56, 74, 86, 87).

Intrazellulär interagiert Nephrin mit der C-terminalen Domäne von Podocin (82) und mit CD2AP (79). Diese Protein-Interaktionen sind insbesondere für das *Signaling* von Nephrin relevant, da Podocin durch die Rekrutierung von Nephrin zu den *lipid rafts* sein Signaling erleichtert (82). Denn Nephrin übt nicht nur eine wichtige strukturelle Funktion für die glomeruläre Schlitzmembran aus (70, 74), sondern ist darüber hinaus an verschiedenen Signalwegen beteiligt (82, 88, 89).

Huber *et al.* (89) demonstrierten, dass Nephrin zum Beispiel den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-AKT-Signalweg aktivieren kann, der unter anderem in die Phosphorylierung des pro-apoptischen Proteins Bad (*Bcl-2-associated death promoter*) mündet, welches dadurch gehemmt wird. Diese Nephrin-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B/AKT wird durch Podocin und CD2AP verstärkt. Demnach kann Nephrin mit der Unterstützung von Podocin und CD2AP einen überlebensfördernden Signalweg aktivieren, der die *Detachment*-induzierte Apoptose von Podozyten verhindern kann. Dies unterstützt die These, dass auch Nephrins intrazelluläre Domäne einen entscheidenden Beitrag zur Erhaltung der funktionellen Integrität der Podozyten leistet.

Als potenzielles Signalmolekül besitzt Nephrin an seiner intrazellulären Domäne neun Tyrosinreste, an denen es phosphoryliert und dadurch als Bindungsstelle für *Src Homology 2*-Domänen enthaltende Proteine dienen kann (88). Insbesondere die Tyrosinreste Y1176, Y1193 und Y1210 stellen solche mögliche Bindungsstellen dar (89). Die Tyrosinreste von Nephrin scheinen durch Kinasen der *Src*-Familie (90), den Protein-Tyrosinkinasen Fyn und Yes, phosphoryliert zu werden (88). Hierbei scheint vor allem die Proteinkinase Fyn für die Nephrin-Phosphorylierung wichtig zu sein (88, 90). Die Tyrosinphosphorylierung von Nephrin kann durch *Clustering*, also Clusterbildung, von Nephrin an der Zellmembran induziert werden (90, 91). Dieses *Clustering* von Nephrin führt des Weiteren zur Rekrutierung der *Non-catalytic region of tyrosine kinase* (Nck)-Adapterproteine zu Nephrin und wenn Nephrin an seinen Tyrosinresten phosphoryliert ist, können Nck1 und Nck2 über ihre *Src Homology 2*-Domäne mit Nephrin interagieren (91, 92). Diese Nck-vermittelte Nephrin-Phosphorylierung scheint mit der Aktivierung von Nephrin-vermittelten Signalwegen wie dem PI3K-AKT-Signalweg einherzugehen (93). Über die Interaktion mit den Nck-Adapterproteinen kann Nephrin nicht nur Signalwege aktivieren, sondern steht auch mit dem Aktin-Zytoskelett der podozytären Fußfortsätze in Verbindung (92). Durch die Nephrin-*Clustering*-vermittelte Rekrutierung von Nck kann die Polymerisation von Aktin induziert werden (91, 92).

Diese Tatsachen sprechen dafür, dass Nephrin neben seiner strukturellen Funktion auch zur Dynamik der glomerulären Schlitzmembran beiträgt, indem es zwischen der Schlitzmembran und dem podozytären Aktin-Zytoskelett vermittelt (94) und die Dynamik des Zytoskeletts in Abhängigkeit von seiner Phosphorylierung reguliert (91).

1.2.4 Das Mesangium

Neben den Strukturen, die sich am Aufbau des glomerulären Filters beteiligen, stellt das Mesangium die zweite große Komponente des Glomerulums dar. Es befindet sich zwischen den glomerulären Kapillarschlingen und besteht aus verschiedenen Zelltypen, die in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind (95, 96). Das gesamte Mesangium dient der Aufrechterhaltung der Struktur des glomerulären Kapillarknäuels und hilft, die Kapillaren offenzuhalten und die Filtrationsrate zu regulieren (97, 98). Bei den Zellen des Mesangiums handelt es sich hauptsächlich um Mesangiumzellen (95), die bedingt durch den Aufbau ihres Zytoskeletts (99) kontrahieren und dadurch Zug auf die GBM und die Glomerulumkapillaren ausüben können (97, 98). Darüber hinaus bilden sie unter anderem Wachstumsfaktoren, Zytokine und Matrixkomponenten, sodass sie in ihrer eigenen Matrix eingebettet sind (100). Ähnlich wie die Podozyten sind sie an der Pathogenese vieler glomerulärer Erkrankungen beteiligt (101, 102). Dabei scheinen sie meistens aktiviert zu werden und zu Myofibroblasten-ähnlichen Zellen zu transformieren (96, 103, 104). Dieses Phänomen zeigt sich auch in der diabetischen Nephropathie und kommt als mesangiale Expansion zum Ausdruck (102, 105), auf die in den Abschnitten 1.1.2 und 1.3.3 näher eingegangen wird.

1.3 Der Hippo-Signalweg

1.3.1 Funktion des Hippo-Signalweges

Den Kern des Hippo-Signalweges bildet eine hochkonservierte Kinasenkaskade, die erstmalig in *Drosophila melanogaster* beschrieben und untersucht wurde (106–108). Diese Kinasenkaskade reguliert die Expression von Genen, die in die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zellüberleben involviert sind (106, 108, 109). Diese Regulation erfolgt über die Kinasen *Large tumor suppressor kinase 1/2* (LATS1/2) (siehe Abschnitt 1.3.2) (110, 111), die durch die Phosphorylierung der transkriptionellen Ko-Aktivatoren *Yes-associated protein* (YAP) (112, 113) und dem transkriptionellen Ko-Aktivator mit PDZ-bindendem Motiv (TAZ) (114) die Genexpression inhibieren.

Da der Signalweg insbesondere bei der Regulation der Zellproliferation eine Rolle

spielt (106, 109), ist seine Funktion besonders im Kontext der Tumorgenese interessant, er ist jedoch auch an weiteren biologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören unter anderem das Organwachstum (115, 116), die Vermehrung von Stammzellen und Entscheidung über das Zellschicksal (117) sowie die Zelldifferenzierung während der Organentwicklung (118–120). Darüber hinaus spielt er nicht nur bei verschiedenen Tumorerkrankungen eine Rolle, sondern ist auch an der Pathogenese verschiedener Kardiomyopathien (121, 122) und der Leber- (123) und Lungenfibrose (124) beteiligt. Schließlich steht der Hippo-Signalweg in engem Zusammenhang mit verschiedenen Nierenerkrankungen. Dazu zählen Nierenzellkarzinome (125, 126), zystische Nierenerkrankungen (127), die Nierenfibrose (128) und die diabetische Nephropathie (129, 130).

1.3.2 Akteure des Hippo-Signalweges

Zum Kern des Hippo-Signalweges in Säugetieren gehören die folgenden Proteine: die Kinasen *Mammalian sterile 20-like kinases 1/2* (MST1/2) (106, 108, 109), LATS1 und LATS2 (110, 111), das *Salvador family WW domain containing protein 1* (SAV1) (131, 132), die Adapterproteine *Mps One Binder 1 A/B* (MOB1A/B) (107, 133) und die transkriptionellen Ko-Aktivatoren YAP (134) und TAZ (114).

Der Hippo-Signalweg ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Am Anfang des Signalweges stehen die Kinasen MST1 und MST2, die mit dem Regulatorprotein SAV1 interagieren (106, 108). MST1/2 phosphorylieren und aktivieren den Komplex aus den Kinasen LATS1/2 (108, 135) und den Regulatorproteinen MOB1A/B (133). Die Kinasen MST1/2 werden wiederum ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. Sie können einerseits durch andere Kinasen (136), andererseits durch sich selbst über eine intrinsische Homodimer-Bildung phosphoryliert werden (137). Diese Autophosphorylierung von MST1/2 wird durch die Interaktion mit SAV1 verstärkt (131).

MOB1A/B fungieren wie SAV1 als Adapterproteine und fördern den Hippo-Signalweg, indem sie die intrinsische Kinaseaktivität von LATS1/2 an YAP/TAZ steigern (107, 133).

Der aktivierte Komplex aus LATS1/2 und MOB1A/B kann schließlich die transkriptionellen Ko-Aktivatoren YAP und TAZ phosphorylieren und dadurch inaktivieren (107, 114, 134). YAP und TAZ sind die zentralen Effektoren des Hippo-Signalweges (114, 134). Wenn der Hippo-Signalweg aktiviert ist bzw. seine Kinasen LATS1/2 aktiv sind, wird die Funktion von YAP/TAZ durch ihre Retention im Zytoplasma und bzw. oder ihre

Degradation inhibiert (113, 138). Weil in den Versuchen dieser Arbeit die YAP-Phosphorylierung als Messgröße verwendet wurde, werden im Folgenden die Inaktivierungsmechanismen von YAP durch die LATS-Kinasen noch einmal genauer erläutert.

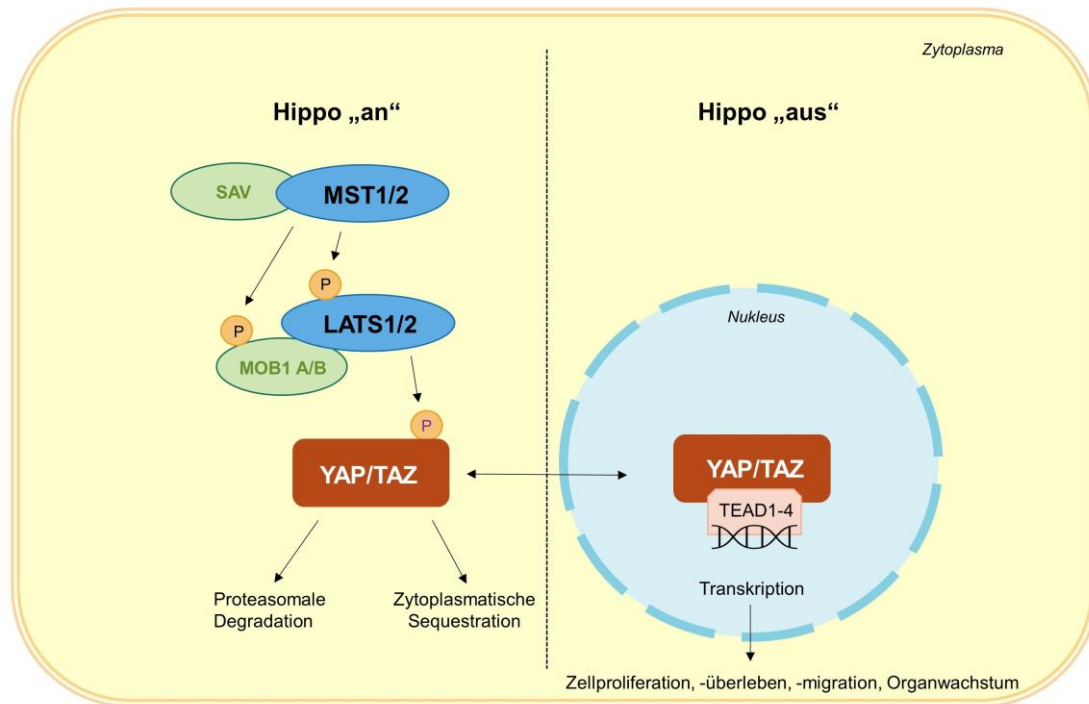


Abb. 4: Schematische Darstellung des Hippo-Signalweges mit seinen Hauptakteuren

Die Kinasen MST1 und MST2 (*Mammalian sterile 20-like kinases 1/2*) interagieren mit dem Regulatorprotein SAV1 (*Salvador family WW domain containing protein 1*), das ihre Aktivierung per Auto-Phosphorylierung fördert. Die aktiven MST1/2 phosphorylieren und aktivieren darauf den Komplex aus den Kinasen LATS1/2 (*Large tumor suppressor kinase 1/2*) und den Regulatorproteinen MOB1A/B (*Mps One Binder 1 A/B*). Dieser aktivierte Komplex kann dann die transkriptionellen Ko-Aktivatoren YAP (*Yes-associated protein*) und TAZ (transkriptioneller Ko-Aktivator mit PDZ-bindendem Motiv) phosphorylieren und dadurch inaktivieren.

Im phosphorylierten Zustand werden YAP/TAZ entweder im Zytoplasma zurückgehalten oder proteasomal degradiert. Sind die Kinasen des Hippo-Signalweges nicht aktiv, können YAP/TAZ im Zellkern mit den TEA-Domänen-Transkriptionsfaktoren 1-4 (TEAD1-4) interagieren und die Expression ihrer Zielgene fördern, die mit Zellproliferation, -überleben, -migration und Organwachstum einhergehen (139).

In Anlehnung an Piccolo, Dupont *et al.* 2014 (139), S. 1291.

YAP besitzt fünf HXRXXS-Motive (S61, S109, S127, S164 und S381), die als Phosphorylierungsstellen für die Kinasen LATS1/2 dienen (138). Von diesen Phosphorylierungsstellen sind Ser127 und Ser381 am intensivsten untersucht und scheinen für die Inaktivierung von YAP die größte Rolle zu spielen (138). Untersuchungen legten nahe, dass die Phosphorylierung von YAP am Serin 127 zur Bildung einer 14-3-3-Bindungsstelle und dadurch zur zytoplasmatischen Retention von YAP führte (113).

Den Forschungsergebnissen von Zhao *et al.* (138) zufolge schien die Phosphorylierung von YAP am Serin 381 hingegen an der Regulation der Proteinstabilität von YAP beteiligt zu sein und zu einer Instabilität von YAP zu führen. Die *In-vitro*-Versuche zeigten, dass die Phosphorylierung an Ser381 YAP für die Phosphorylierung durch die Caseinkinasen 1 δ/ϵ (CK1 δ/ϵ) vorbereitet und somit einen sequentiellen Phosphorylierungsprozess anstößt, der zur Aktivierung eines Phosphodegrons führen kann. Durch die Phosphorylierung durch die CK1 δ/ϵ wird die Interaktion von YAP mit dem *β -transducin repeats-containing protein* (β -TRCP) gesteigert und damit einhergehend die Ubiquitinierung und schließlich proteasomale Degradation von YAP gefördert (138). Folglich sind YAP/TAZ wiederum aktiv, wenn der Hippo-Signalweg inaktiv ist bzw. seine Kinasen LATS1/2 inaktiv sind (113, 134). Dann können YAP/TAZ im Zellkern mit Transkriptionsfaktoren wie den TEA-Domänen-Transkriptionsfaktoren 1-4 (TEAD1-4) interagieren und die Expression ihrer Zielgene fördern, die mit Zellproliferation, -migration und Hemmung von Apoptose einhergehen (140, 141).

Der Hippo-Signalweg und seine Kinasen sowie Effektorproteine können durch verschiedenste vorgeschaltete Signalwege bzw. Signalmoleküle in ihrer Aktivität beeinflusst werden, zum Beispiel durch Zellpolarität (142, 143), *Adherens Junctions* (144, 145), das Zytoskelett und mechanische Kräfte (146, 147), Liganden von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (148) und manche Stresssignale (149, 150). Dies ist sowohl für die Rolle des Hippo-Signalweges bei der diabetischen Nephropathie als auch für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit relevant.

1.3.3 Der Hippo-Signalweg bei der diabetischen Nephropathie

Der Hippo-Signalweg scheint an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie beteiligt zu sein. Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, dass unter diabetischen bzw. *high glucose* (HG)-Bedingungen der Hippo-Signalweg inaktiviert und dadurch die YAP-Aktivität gesteigert ist (129, 130, 151). Im Einzelnen wurde nachgewiesen, dass HG-Bedingungen bei kultivierten Mesangiumzellen zu einer Abnahme der YAP-Phosphorylierung, zur nukleären Translokation von YAP und zu einer gesteigerten YAP-TEAD-Interaktion führten (130). Auch für LLCPK-C14-Zellen (*Renal Proximal Tubular Cells* [RPTC]-artige Zelllinie), die bei HG-Bedingungen kultiviert wurden, und für renale proximale Tubuluszellen von diabetischen Mäusen wurde eine gesteigerte Proteinexpression von YAP beschrieben (129). Ebenso konnte eine hochregulierte YAP-Expression und nukleäre Translokation von YAP in RPTC von humanen Diabetesnieren gezeigt werden (151).

Mit der HG- bzw. Diabetes-induzierten Hochregulation der YAP-Aktivität konnten eine gesteigerte Expression der YAP-Zielgene CTGF und Amphiregulin (AREG) (129), eine Hochregulation von Kollagen Typ I und α -smooth muscle actin (als molekularer Marker für Myofibroblasten) (151), eine tubulointerstitielle Fibrose (151), eine Akkumulation von extrazellulärer Matrix und die Proliferation von Mesangiumzellen (130) assoziiert werden. Demnach scheint der Hippo-Signalweg in zwei bedeutsame histopathologischen Kennzeichen der DN involviert zu sein, der tubulointerstitiellen Fibrose und mesangialen Expansion.

Die gesteigerte YAP-Expression im Rahmen der DN scheint darüber hinaus Auswirkungen auf klinische Parameter zu haben. Die Beobachtungsstudie von Ma *et al.* (152) konnte eine Assoziation zwischen der gesteigerten YAP-Expression und einem gesteigerten systolischen Blutdruck, erhöhtem Harnstoff-Stickstoff im Blut und erhöhtem Serum-Kreatinin sowie der Progression des DN-Stadiums nachweisen.

Wie die HG- oder diabetischen Bedingungen zu der Steigerung der YAP-Aktivität führen, ist noch nicht abschließend geklärt, aber bisherige Untersuchungen legen nahe, dass der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR)-Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-AKT- (129, 130) und der RhoA-GTPase (RhoA)-*Rho-associated protein kinase* (ROCK)-Signalweg (151, 153–155) beteiligt sein könnten.

Die PI3K kann durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert werden, spielt unter anderem für die Zellteilung eine kritische Rolle und ist an der Aktin-Polymerisation beteiligt (156). Zahlreiche verschiedene Effektormoleküle sind ihr nachgeschaltet, darunter die Proteinkinase B bzw. die Serin-Threonin-Kinase AKT (156). Die Aktivität der AKT fördert Zellüberleben, -proliferation und -wachstum (157). Qian *et al.* (130) konnten zeigen, dass der PI3K-AKT-Signalweg in glomerulären Mesangiumzellen von diabetischen Mäusen aktiviert ist und zur Inaktivierung des Hippo-Signalweges führte, indem die Aktivität der Kinase MST1 gehemmt wurde. Auch Chen und Harris (129) konnten nachweisen, dass die Aktivierung des EGFR-PI3K-AKT-CREB (*cAMP response element-binding protein*)-Signalweges die Genexpression und nukleäre Translokation von YAP sowie seine Interaktion mit TEAD in LLCPK-C14-Zellen vermittelte und eine Inhibition des EGFR oder der AKT die HG-induzierte YAP-Expression abschwächte. Dass sich dieser Zusammenhang auch in den Folgen der gesteigerten YAP-Aktivität widerspiegelte, zeigte sich in der Hemmung der Proliferation der RPTC-artigen Zelllinie und Abnahme der CTGF- und AREG-Expression nach *Silencing* der EGFR- oder YAP-Genexpression.

Der zweite Signalweg, der nach bisherigen Untersuchungen an der unter HG-Bedin-

gungen gesteigerten YAP-Aktivität beteiligt war, ist der RhoA-ROCK-Signalweg. Verschiedene Forschungsgruppen beschrieben sowohl eine gesteigerte Aktivität der Guanosintriphosphatase (GTPase) RhoA in kultivierten humanen RPTC (151) oder Mesangiumzellen von Ratten (153) unter HG-Bedingungen, eine gesteigerte RhoA-Aktivität in der Nierenrinde von diabetischen Ratten (154) als auch eine damit verbundene Steigerung der Aktivität der nachgeschalteten ROCK (153, 155).

In welchem Zusammenhang der RhoA-ROCK-Signalweg und die unter HG-Bedingungen gesteigerte YAP-Aktivität stehen, wurde mithilfe von Inhibitionsversuchen untersucht. Dabei führte eine Vorbehandlung von humanen RPTC mit einem ROCK-Inhibitor oder *Silencing* von RhoA mit einer *small interfering RNA* zur Inhibition der HG-induzierten Hochregulation der YAP- und CTGF-Expression und nukleären Translokation von YAP (151). Andere Untersuchungen zu den Folgen einer selektiven ROCK-Inhibition zeigten einen positiven Einfluss auf weitere Eigenschaften der DN. Zum einen verringerte eine selektive ROCK-Inhibition eine bestehende Albuminurie (154, 155) sowie Proteinurie (153) und führte zur Erhaltung der Kreatinin-Clearance in diabetischen Ratten (158). Zum anderen verhinderte sie die glomeruläre Akkumulation von Kollagen Typ IV in diabetischen Mäusen (155), die Expression von TGF- β (154, 159), die glomeruläre Hochregulation von Fibronectin (153, 158) und eine glomeruläre Sklerose (153, 158) wie auch eine tubulointerstitielle Fibrose (158).

Diese Effekte der ROCK-Inhibition könnten unter anderem mit der Wirkung des RhoA-ROCK-Signalweges auf die YAP-Aktivität zusammenhängen, da die ROCK-Inhibition eine glomeruläre Sklerose und tubulointerstitielle Fibrose verhindert und für YAP ein klarer Einfluss auf die interstitielle Fibrose bzw. Fibrogenese (130, 151) und Proliferation von Mesangiumzellen beschrieben wurde (130).

1.4 FRMD3 – Protein 4.1O

1.4.1 Die Proteinfamilie 4.1

Das Protein 4.1O ist das neueste Mitglied der Proteinfamilie 4.1 (160), zu der auch die Proteine 4.1R (161), 4.1G (162), 4.1N (163) und 4.1B (164) gehören. Das Protein 4.1 bzw. 4.1R (4.1R) wurde erstmalig in humanen Erythrozyten entdeckt und stellt den Prototypen dieser Proteinfamilie dar (165). Es ist für die mechanischen Eigenschaften der erythrozytären Zellmembran und vor allem für die Membranstabilität wichtig (166), da es die Interaktion zwischen Spektrin und Aktin vermittelt (167). Hereditäre Defekte des Proteins 4.1R verursachen ein bekanntes hämatologisches Krankheitsbild, die

hereditäre Elliptozytose, die zu einer hämolytischen Anämie führt (168). Die nachfolgend entdeckten 4.1 Proteine sind nach dem Gewebe benannt, in dem sie erstmalig beschrieben wurden: 4.1R (*red blood cell type*), 4.1G (*general type*), 4.1B (*brain type*), 4.1N (*neuron type*) und 4.1O (*ovary type*) (160, 165). Nach aktuellem Kenntnisstand werden sie jedoch relativ ubiquitär exprimiert und fungieren als Adapterproteine zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett und können an Spektrin-Aktin-Filamente und zahlreiche Transmembranproteine binden (165). Sie sind meist in der Nähe von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten lokalisiert und scheinen daher an der Zelladhäsion und Gewebeorganisation beteiligt zu sein (165). Besonders für die 4.1 Proteine und relevant für die vorliegende Dissertation ist, dass alle 4.1 Proteine über diverse Isoformen bzw. Spleißvarianten verfügen, die durch alternatives Spleißen der jeweiligen Transkripte erzeugt werden und zum Teil entwicklungs- und gewebespezifisch sind (169–172).

Alle paralogen 4.1 Proteine besitzen drei gemeinsame hochkonservierte funktionelle Domänen: eine *Four-point-one* (4.1), Ezrin, Radixin, Moesin (FERM)-Domäne, eine Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne (SAB) und eine für diese Proteingruppe einzigartige C-terminale Domäne (CTD) (165, 172, 173). Amino (N)-terminal der FERM-Domäne befindet sich ein variabel gespleißtes Kopfstück (U1-Region), das sich bei den verschiedenen Isoformen der 4.1 Proteine unterscheidet, dessen funktionelle Bedeutung bei den anderen 4.1 Proteinen allerdings noch nicht ausreichend geklärt ist (165). Die 30 kDa schwere FERM-Domäne besteht aus drei unabhängig voneinander gefalteten Lappen, die mit Ligandenbindungsaktivitäten assoziiert sind (165, 172). Sie schafft die Voraussetzung für die Interaktion zwischen Membranproteinen, Phospholipiden und Adapterproteinen mit dem Zytoskelett (172, 174). C-terminal der FERM-Domäne liegt die sog. *FERM adjacent* (FA)-Domäne (175). Diese hat im Falle des Proteins 4.1R ein Molekulargewicht von 16 kDa und enthält verschiedene Serinreste, die durch die Proteinkinasen A und C phosphoryliert werden können. Diese Phosphorylierungen beeinflussen die Aktivität der angrenzenden FERM-Domäne und SAB (175).

Auch über die C-terminale Domäne können die 4.1 Proteine mit verschiedenen Membran- und zytoplasmatischen Proteinen interagieren. Die C-terminale Domäne des 4.1R kann beispielsweise an eine Untereinheit des eukaryotischen Initiationsfaktors 3 und das *Nuclear Mitotic Apparatus Protein* binden und dadurch kann 4.1R möglicherweise die Translationsmaschinerie mit dem Zytoskelett verknüpfen und zum komplexen Mechanismus der Zellteilung beitragen (176, 177). Darüber hinaus vermittelt die CTD von 4.1R die Interaktion mit *Zonula occludens-2*, *Zonula occludens-1* und Occludin und ermöglicht dadurch die Mitwirkung an der Regulation von *Tight Junctions* (TJ), indem

es TJ-Proteine mit dem Zytoskelett verknüpft (178).

Zwischen der FERM- und C-terminalen Domäne befindet sich die 8-10 Kilodalton (kDa) schwere SAB (165, 173) bzw. Aktin-Bindungsdomäne beim Protein 4.1O (siehe Abb. 5). Sie vermittelt die Assoziation von Spektrin und F-Aktin (167, 179) und ist daher in Erythrozyten maßgeblich an der Membranstabilität beteiligt (166–168).

In der Niere weisen die 4.1 Proteine 4.1R, 4.1B und 4.1N trotz ihrer strukturellen Homologien unterschiedliche Expressionsmuster auf, d. h. sie werden nur in bestimmten Segmenten des Nephrons exprimiert. Nach Meinung von Ramez *et al.* (180) unterstütze dies die Ansicht, dass die 4.1 Proteine verschiedene Aufgaben für die Struktur und Funktion der Niere haben.

1.4.2 Das Protein 4.1O

Das Protein 4.1O wird durch das Gen *FERM Domain Containing 3* (FRMD3) kodiert, welches sich auf Chromosom 9q21.32 befindet (181). Es existieren sieben verschiedene Isoformen bzw. Spleißvarianten des Proteins 4.1O (182, 183), auf die aufgrund ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird. Die von Ni *et al.* (160) beschriebene Variante besteht aus 2312 Basenpaaren; das kodierte Protein umfasst 553 Aminosäuren. Zunächst wurde die Expression des Proteins 4.1O nur für die Ovarien von Erwachsenen sowie den fetalen Skelettmuskel, Thymus und das Gehirn beschrieben (160), es konnte aber auch in der Niere in den Mesangiumzellen, den proximalen Tubuluszellen (184) und in den Podozyten (185) nachgewiesen werden.

Aus den Versuchen von Kramer-Zucker *et al.* (186) an sich entwickelnden Podozyten von Zebrafischen lassen sich wichtige Funktionen des Proteins 4.1O für die Entwicklung der Podozyten ableiten. Das Fehlen bzw. die homozygote Mutation des 4.1O-Homologs im Zebrafisch, das FERM-Domänen enthaltende Genprodukt von *mosaic eyes* (*moe*), führte zur Entstehung von apikalen „mikrovillären“ Projektionen an den Podozyten (186), wie sie in frühen Stadien der fokal-segmentalen Glomerulosklerose und anderen glomerulären Schädigungen vorkommen (56) und auch bei der Ausschaltung von Nephrin und Podocin zu beobachten waren (186). Ferner fehlten die Schlitzmembranen zwischen den Fußfortsätzen im Bereich der GBM bei gleichzeitig anzu-treffenden Schlitzmembran-artigen Strukturen im Bereich der in die Bowman-Kapsel ragenden Podozytenfortsätze und es zeigte sich eine gesteigerte glomeruläre Filtration von hochmolekularen Substanzen. Dies spricht für eine wichtige Funktion des *moe*

Genprodukts für die physiologische Morphologie der Podozyten einschließlich der Bildung und Erhaltung der glomerulären Schlitzmembranen und der einwandfreien Filtrationsdiskriminierung im Zebrafisch (186).

Des Weiteren konnten in der eigenen Arbeitsgruppe bereits einige Interaktionen des Proteins 4.1O in der Niere nachgewiesen werden. In Co-Immünpräzipitationsversuchen mit *Human Embryonic Kidney* (HEK) 293T-Zellen zeigte sich eine Interaktion der bereits erwähnten 553 Aminosäuren langen Isoform des 4.1O mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin, mit dem *Glomerular epithelial protein 1* (GLEPP1) (187, 188) und Nephrin (187). Zudem scheint die Interaktion von 4.1O und podozytären Proteinen phosphorylierungsabhängig zu sein, da das Protein 4.1O bevorzugt an phosphoryliertes Nephrin bindet und umgekehrt (189). Das Protein 4.1O könnte in diesem Zusammenhang außerdem an der dynamischen Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt sein und Signale aus der Zellperipherie von Nephrin an das Aktin-Zytoskelett weiterleiten (189). Dies bedarf jedoch noch weiterer Forschung. Eine Bindung des 4.1O an G-Aktin (187) sowie eine Co-Lokalisation von 4.1O und F-Aktin auf zellulärer Ebene (189) wurde bereits nachgewiesen.

Ferner wurde in Anwesenheit von 4.1O die Interaktion von Nephrin und Nck2 (187) und die Phosphorylierung von Nephrin an den Tyrosinresten Y1217 und Y1176/1193 gehemmt (187, 188). Welche Auswirkungen eine mögliche Konkurrenz von 4.1O und Nck2 um die Bindungsstellen an Nephrin hat und wie sich diese *in vivo* ausgestaltet, erfordert weitere Untersuchungen (188).

1.4.3 Spleißvarianten des Proteins 4.1O

Wie bei dem Protein 4.1R (169, 170) und den drei anderen 4.1 Proteinen (162–164, 180) werden auch die Transkripte des Proteins 4.1O alternativ gespleißt (182, 183). Von den sieben bekannten Spleißvarianten des Proteins 4.1O (182, 183) wurden in der vorliegenden Dissertation die Varianten 4.1O-201, -207, -204 und -202 sowie eine weitere Variante von 4.1O-207 ohne FERM- und ohne *Coiled-coil*-Domäne verwendet. Sie sind in der Abbildung 5 mit ihren funktionellen Domänen veranschaulichend dargestellt. Die Variante 4.1O-201 ist unter den bekannten 4.1O-Isoformen die längste Form mit vierzehn Exons und 597 Aminosäuren, da sie sowohl über ein N-terminales Kopfstück (U1-Region) als auch über eine vollständige C-terminale Domäne verfügt (182, 183, 190, 191). Die Variante 4.1O-207 mit 553 Aminosäuren ist diejenige, die von Ni *et al.* (160) erstmalig beschrieben wurde und nach den Erkenntnissen aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe höhere Expressionslevel als 4.1O-201 in humanen

Podozyten und HEK293T-Zellen aufweist. Die Varianten 4.1O-204 und -202 sind in der humanen Niere weniger verbreitet. 4.1O-204 ist C-terminal gegenüber der längsten Isoform 4.1O-201 verkürzt, besitzt jedoch im Gegensatz zu 4.1O-207 eine N-terminale U1-Region. 4.1O-202 ist mit 213 Aminosäuren die kürzeste Variante, sie besitzt keine FERM-Domäne und eine verkürzte C-terminale Domäne (181, 190, 191).

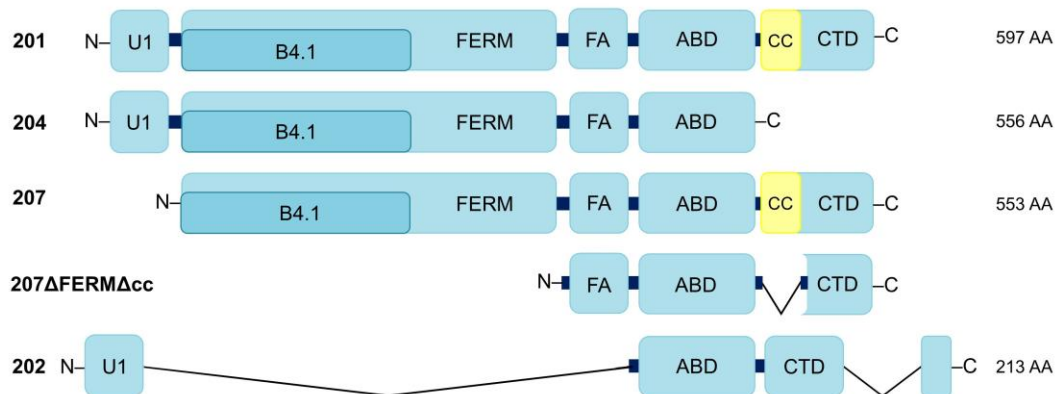


Abb. 5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur der Protein 4.1O-Spleißvarianten 201, 204, 207, 202 und einer 207-Mutante

Die vier Protein 4.1O (4.1O)-Spleißvarianten 201, 204, 207 und 202 teilen den Aufbau der anderen Proteine der 4.1 Proteinfamilie, der durch drei konservierte Domänen gekennzeichnet ist: die FERM-, Aktin-Bindungs- (ABD) und Carboxy (C)-terminale Domäne (CTD). N-terminal befindet sich die FERM-Domäne, welche eine intrinsische B4.1-Domäne besitzt. Daran schließt sich C-terminal die FA-Domäne an. Die Aktin-Bindungsdomäne liegt in der Mitte von den drei konservierten Domänen. C-terminal liegt die C-terminale Domäne. Die 4.1O-Varianten 201, 204 und 202 besitzen N-terminal von der FERM-Domäne eine U1-Region, deren Funktion noch unbekannt ist. 4.1O-204, -202 und die 207-Mutante (207 Δ FERM Δ cc) haben keine bzw. eine verkürzte CTD. Bei der 207-Mutante 207 Δ FERM Δ cc fehlt die U1-Region sowie die FERM-, FA- und *Coiled-coil* (CC)-Domäne der CTD. Rechts ist die Anzahl der Aminosäuren (*amino acids* [AA]) angegeben.

Die Abbildung wurde auf der Grundlage von einer von Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin erstellten Abbildung sowie den Informationen der Internetseiten <http://smart.embl-heidelberg.de> (192), www.ensembl.org (182, 183) und www.uniprot.org (190, 191) erstellt.

1.4.4 FRMD3 als Kandidatengen der diabetischen Nephropathie

Für die medizinische Betreuung von Diabetikern und Prävention von diabetischen Folgeerkrankungen sowie Identifikation von gefährdeten Patienten ist relevant, dass nicht alle Diabetiker im Verlauf ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie (DN) entwickeln (6, 7). Die DN scheint zudem sowohl familiär gehäuft (193, 194) als auch in bestimmten ethnischen Gruppen bevorzugt aufzutreten (7). Daher lag der Fokus verschiedener Forschergruppen auf der Identifikation möglicher Gene, die hierbei eine Rolle spielen und für die Entwicklung einer DN prädisponieren. Mittlerweile wurde in

verschiedenen Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) eine Reihe von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) und unterschiedlichen Genen identifiziert, die mit der DN assoziiert sind (195). Eine der ersten Untersuchungen dieser Art zur DN war die GWAS der *Genetics of Kidneys in Diabetes* (GoKinD) Studienkohorte, in der insbesondere ein SNP detektiert wurde, der in dieser Untersuchung die stärkste DN-Assoziation bei einem hauptsächlich weißen Kollektiv von Typ-1-Diabetikern zeigte (184). Dieser SNP befand sich auf Chromosom 9 nahe des 5'-Endes des FRMD3-Gens, das für das Protein 4.1O kodiert (184). Diese Assoziation konnte auch für Typ-2-Diabetiker (196) sowie Afroamerikaner mit einem T2D-bedingten Nierenversagen (197) bestätigt werden. Allerdings zeigte sich diese Assoziation in einer Studienpopulation von japanischen Typ-2-Diabetikern nicht (198), was auf Unterschiede in DN-assoziierten Genen zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen hinweisen könnte.

Eine Assoziation stellt zunächst nur einen statistischen Zusammenhang dar und erlaubt keine Aussagen über die Mechanismen, die dieser Assoziation zugrunde liegen. Daher ging die Gruppe um Martini (199) der Frage nach, wie ein nicht-kodierender SNP im Bereich der Promotorregion des FRMD3-Gens einen Einfluss auf den Phänotyp der DN haben könnte. Auf der Basis ihrer Untersuchungen zu FRMD3 ko-exprimierten Transkripten schlugen sie ein mögliches Modell vor, nach dem dieser SNP die Transkriptionsregulation beeinflussen könnte. Sie wiesen nach, dass besagter SNP zur Bildung eines potenziellen Transkriptionsfaktorbindungssystems führen könnte, das die transkriptionelle Koregulation von Mitgliedern des *Bone Morphogenetic Pathway* (BMP)-Signalweges und FRMD3 bedingt. Diese Koregulation führte im Kontext der DN zu einer Inhibition der Expression von BMP-Mitgliedern und FRMD3. Daher schlussfolgerten Martini *et al.* (199), dass die durch den SNP hervorgerufene Bindungsstelle wahrscheinlich in einem repressiven Promotormodul lokalisiert ist, dieser SNP die notwendigen Bindungsstellen für das BMP-Modul herstellt und den BMP-Signalweg und FRMD3 gleichermaßen unterdrückt. Ferner zeigten sie, dass die Repression von FRMD3 und BMP mit einer gesteigerten Albuminurie und fraktionellen Mesangiumfläche assoziiert war. Aus diesem Grund und infolge der von anderen Forschungsgruppen beschriebenen protektiven Wirkung des BMP-Signalwegs wurde dem FRMD3-Gen im Kontext der DN eine protektive Funktion zugeschrieben. Darüber hinaus zeigten Martini *et al.* (199) eine Abnahme der glomerulären Transkriptionslevel von FRMD3 mit dem Fortschreiten der DN von einer normalen GFR bis zum CKD-Stadium 3 bei Pima-Indianern mit Typ-2-Diabetes. Dies könnte als Verlust der protektiven Funktion von FRMD3 in fortgeschrittenen DN-Stadien gewertet werden.

Gleichermaßen scheint die FRMD3-Expression auf mRNA-Ebene in DN-Mausmodellen im Vergleich zu nicht-diabetischen Mausnieren verringert zu sein (200).

Allerdings zeigten bisher nicht veröffentlichte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe das Gegenteil. In immunhistochemischen Färbungen von Glomeruli diabetischer Patienten mit höheren CKD-Stadien (CKD 3b bis CKD 5) konnte eine Steigerung der Protein 4.1O-Färbung in Podozyten beobachtet werden (Färbungen von Herrn Prof. Dr. med. Thorsten Wiech aus Hamburg).

Weitere bisher unveröffentlichte Versuche der eigenen Arbeitsgruppe ergaben ferner einen deutlichen Anstieg der Protein 4.1O mRNA in HEK293T-Zellen, die unter *high glucose*-Bedingungen mit 25 mM Glukose als Surrogat für diabetische Bedingungen kultiviert wurden.

Aufgrund dieser widersprüchlichen Datenlage und der weiterhin unklaren Funktion des FRMD3-Gens bzw. des Proteins 4.1O für die DN wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Glukose auf das Protein 4.1O und seine Spleißvarianten näher untersucht.

1.5 Ziele der Arbeit

Wie bereits dargelegt wurde, ist die diabetische Nephropathie (DN) eine schwerwiegende Nierenerkrankung, die viele Diabetiker betrifft, ihr kardiovaskuläres Risiko erhöht und in einem terminalen Nierenversagen enden kann (1, 2, 4, 5, 7, 9, 18, 22). Ein bei der DN veränderter Signalweg ist der Hippo-Signalweg, der nach Datenlage der aktuellen Literatur zu den histopathologischen DN-Kennzeichen der mesangialen Expansion (130) und interstitiellen Fibrose (151) beiträgt. Darüber hinaus wurden aufgrund der bekannten genetischen Prädisposition für die Entwicklung einer DN genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, in denen unter anderem das FRMD3-Gen eine starke DN-Assoziation zeigte (184). Da das Protein 4.1O, das durch das FRMD3-Gen kodiert wird (181), erst 2003 erstmalig beschrieben (160) und seine Expression in der Niere noch später festgestellt wurde (184, 185), sind seine Funktionen in der Niere noch weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zu klären, welche Rolle das Protein 4.1O in der Niere spielt und welchen Einfluss Glukose auf die Funktion des Proteins 4.1O hat.

Hierzu wird exemplarisch einerseits der Einfluss der Expression der 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204, 202 und einer 207-Mutante ohne FERM- und ohne *Coiled-coil*-Domäne auf den Hippo-Signalweg in Abhängigkeit von Glukose untersucht. Anderer-

seits wird die Interaktion dieser Spleißvarianten mit Nephrin als zentrales Schlitzmembranprotein und der Einfluss von Glukose auf diese Interaktion geprüft.

Dabei sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst die Expression der 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204, 202 oder der genannten 207-Mutante die Phosphorylierung und damit Inaktivierung des *Yes-associated protein* in Abhängigkeit von Glukose?
2. Interagieren die 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204 und 202 mit dem zytosmatischen Anteil von Nephrin und wird diese Interaktion durch unterschiedliche Glukosebedingungen beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

Tabelle 1: Zellkultur

Material	Hersteller
D-Mannitol	ICN Biomedicals, Inc., Kalifornien, Vereinigte Staaten
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Na-Pyruvate, very low endotoxin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach (Bayern), Deutschland
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit 3,7 g/l NaHCO ₃ , 1 g/l Glucose, L-Glutamin, Na-Pyruvate, very low endotoxin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
<u>DMEM 1 g/l Glucose mit FBS + D-Mannitol:</u>	0,177 g D-Mannitol in 50 ml DMEM 1 g/l Glucose mit 10 % FBS (5,5 mM Glucose und 19,5 mM D-Mannitol)
DPBS (<i>Dulbecco's Balanced Salt Solution</i>) w/o Ca ⁺⁺ w/o Mg ⁺⁺ , sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HEK (<i>Human Embryonic Kidney</i>) 293T Zellen	
FBS Superior (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HEPES ≥ 99,5 % (<i>titration</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin / EDTA 0,05 % / 0.02 % in PBS w/o Ca ⁺⁺ , w/o Mg ⁺⁺ , sterile filtered	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

2.1.2 Transfektion

Tabelle 2: Transfektion

Material	Hersteller
0,25 M Calciumchlorid-Dihydrat <i>p.a.</i> (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natrimhydrogenphosphat wasserfrei (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES ≥ 99,5 % (<i>titration</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Material	Hersteller
<u>2x HEBS pH 7,05, sterifiltriert</u>	49,9 mM HEPES; 280,6 mM NaCl; 1,48 mM Na ₂ HPO ₄ wasserfrei

2.1.3 Zellernte

2.1.3.1 Ganzzelllysate und Co-Immunpräzipitationen

Tabelle 3: Ganzzelllysate und Co-Immunpräzipitationen

Material	Hersteller
2-Propanol, 100 %	VWR International S.A.S, <i>Fontenaysous Bois</i> , Frankreich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>cOmplete Mini (Protease inhibitor cocktail tablets)</i>	Roche <i>Diagnostics GmbH</i> , Basel, Schweiz
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Glycerin ROTIPURAN® ≥ 99,5 %, <i>p.a.</i> , wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Potassium chloride</i> (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) <i>pro analysi</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid ≥99,5 %, <i>p.a.</i> , ACS, ISO (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat-Hep- tahydrat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumorthovanadat ≥ 90 % (<i>titration</i>) (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Protein G (= GammaBind™ Plus Sepharose in 20 % Ethanol)	<i>GE Healthcare Bio-Sciences AB</i> , Uppsala, Schweden
<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i> (PMSF) 10 ng/ml in 100 % Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), pure</i>	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 20 %</i>	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland
Triton X-100, 100 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Material	Hersteller
<i>Tween</i> ® 20 (Polysorbat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
<u>10x PBS:</u>	pH 7,4 mit 5 M NaOH (vorher pH 6,65); 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 43 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O; 15 mM KH ₂ PO ₄
<u>1x PBS:</u>	136,89 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 4,28 mM NaH ₂ PO ₄ ; 1,46 mM KH ₂ PO ₄
<u>PMSF-Stocklösung:</u>	10 mM PMSF in 100 % 2-Propanol
<u>2x Lysispuffer:</u>	40 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA pH 8,0; 300 mM KCl
<u>1 % Triton X-100 Lysispuffer</u>	20 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 % Triton X-100; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM Na ₃ VO ₄ ; Proteaseinhibitoren (1 Tablette <i>cOmplete Mini</i>); 4,4 µl PMSF-Stocklösung pro Milliliter Lysispuffer direkt vor Verwendung hinzufügen
<u>Reduzierender Proteinpuffer nach Lämmli (2x Lämmli):</u>	0,1 M Tris-HCl pH 6,8; 4 % SDS; 20 % Glycerin; 2 % Bromphenolblau
<u>2x Lämmli mit DTT</u>	0,09 M Tris-HCl pH 6,8; 3,6 % SDS; 18 % Glycerin; 1,8 % Bromphenolblau; 0,1 M DTT (Lagerung bei -20 °C)

2.1.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Tabelle 4: SDS-Gelelektrophorese

Material	Hersteller
2-Propanol, 100,0 %	VWR International, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Ammoniumpersulfat, 10 %	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Color Protein Standard Broad Range</i>	<i>New England BioLabs</i> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Glycin ≥ 99 %, <i>Blotting-Grade</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese Gel® 30 (30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), pure</i>	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>SDS 20 % Sodium Dodecyl Sulfate, pure</i>	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Temed ≥ 98,5 % <i>p.a.</i> für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Material	Hersteller
Tris Pufferan (= Tris Base) $\geq 99,9$ % <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Trizma</i> ® hydrochloride (= Tris-HCl), $\geq 99,0$ % (<i>titration</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>10x Laufpuffer für SDS-PAGE:</u>	239 mM Tris Base; 1,92 M Glycin; 34,7 mM SDS
<u>Puffer A pH 8,8 (Trenngelpuffer):</u>	360 mM Tris-HCl; 1140 mM Tris Base; 14 mM SDS
<u>Puffer B pH 6,9 (Sammelgelpuffer):</u>	484 mM Tris-HCl; 16 mM Tris Base; 14 mM SDS

Polyacrylamidgel-Zusammensetzung:

<u>Trenngel (10 %) für 2 Gele:</u>	3 ml Rotiphorese, 1,5 ml ddH ₂ O; 4,5 ml Trenngelpuffer; 90 μ l 10 % APS; 15 μ l Temed
<u>Sammelgel (10 %) für 2 Gele:</u>	0,535 ml Rotiphorese; 1,135 ml ddH ₂ O; 1,665 ml Sammelgelpuffer; 40 μ l 10 % APS; 5 μ l Temed

2.1.3.3 Western Blot

Tabelle 5: Western Blot

Material	Hersteller
<i>BSA Protease Free - lyophilized</i>	SEQENS <i>In Vitro Diagnostic, Limoges, Frankreich</i>
Glycin ≥ 99 %, <i>Blotting-Grade</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol 100,0 %	VWR International, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
Nitrocellulose <i>Blotting Membrane</i> 0,45 μ m	<i>GE Healthcare Life Science</i> (= seit 31. März 2020 Cytiva), Amersham, Vereinigtes Königreich
Tris Pufferan (= Tris Base) $\geq 99,9$ % <i>p.a.</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Whatman</i> TM <i>Gel Blot Paper</i>	<i>GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Vereinigtes Königreich</i>
<u>BSA in Proteinwaschpuffer:</u>	5 % BSA in 1x Proteinwaschpuffer

Material	Hersteller
<u>25x Proteinwaschpuffer:</u>	3,23 M NaCl; 0,323 M Tris Base pH 7,5; 3,23 % Tween 20
<u>1x Proteinwaschpuffer:</u>	130 mM NaCl; 13 mM Tris Base pH 7,5; 0,13 % Tween 20
<u>1x Transferpuffer:</u>	2,4 M Glycin p.A.; 310 mM Tris Base; 20 % Methanol p.A.

2.1.3.4 Immunfärbung – Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
alpha-Tubulin (DM1A) <i>Mouse mAb</i>	<i>Cell Signaling Technology</i> , Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten	1:1000
<i>ECL Anti-human IgG Horseradish Peroxidase-linked whole antibody (from sheep)</i>	Cytiva, Vereinigte Staaten	1:500
<i>Monoclonal Anti-β-Actin antibody produced in mouse</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	1:15.000
<i>Monoclonal ANTI-FLAG M2 Antibody</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	1:400
P-YAP (S397) (D1E7Y) <i>Rabbit mAb</i>	<i>Cell Signaling Technology</i> , Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten	1:1000

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody</i>	<i>Cell Signaling Technology</i> , Danvers, Massachusetts, Vereinigte Staaten	1:1000
<i>Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP</i>	Agilent Dako, Santa Clara, Vereinigte Staaten	1:10.000

2.1.3.5 Chemilumineszenz

Tabelle 8: Chemilumineszenz

Material	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FluorChem FC2 Chemilumineszenz <i>Imager</i>	<i>Alpha Innotech Corp.</i> , Kalifornien, Vereinigte Staaten
Luminol	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
<u>Luminol, 250 mM in DMSO</u>	440 mg Luminol in 10 ml DMSO gelöst
<i>p-Coumaric acid</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>p-Coumaric acid, 90 mM in DMSO</u>	150 mg <i>p-Coumaric acid</i> in 10 ml DMSO gelöst, 88 µl Aliquots bei -20 °C gelagert
<i>Trizma® hydrochloride</i> (= Tris-HCl), ≥ 99.0 % (<i>titration</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>ECL Lösung A (20 ml):</u>	100 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,396 mM p-Coumarinsäure; 2,5 mM Luminol; <i>Aqua dest.</i>
<u>ECL Lösung B (20 ml):</u>	100 mM Tris-HCl pH 8,5; 12 µl 30 % H ₂ O ₂ ; <i>Aqua dest.</i>

2.1.4 Plasmide

2.1.4.1 Auflistung der verwendeten Plasmide

cdm8

cdm.slg

cdm.slg.nephrin.cyt (zytoplasmatischer Teil von Nephrin, AS 1086-1242)

F.4.1O 201 (*FLAG*-markierte/*FLAG*-tagged 4.1O-Variante 201)

F.4.1O 202

F.4.1O 204

F.4.1O 207

F.4.1O 207ΔFERMΔcc (4.1O-207 ohne *Coiled-coil*-Domäne 1330-1410 Basenpaare [bp] und ohne FERM-Domäne 1-817 bp)

F.Nck1

2.1.4.2 Transformation und Amplifikation

Tabelle 9: Transformation und Amplifikation

Material	Hersteller
Ampicillin <i>Na-salt research grade</i>	Serva <i>Electrophoresis GmbH</i> , Heidelberg, Deutschland
<i>E. coli</i> MC1061 mit oder ohne P3 Plasmid	
<i>LB Broth with agar</i> (Lennox), <i>Powder microbial growth medium</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<i>Tetracyclin Hydrochloride Minimum 95 % (TLC)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
<u>Ampicillin-Stammlösung:</u>	10 mg Ampicillin/1 ml ddH ₂ O
<u>Tetracyclin-Stammlösung:</u>	1 mg Tetracyclin/0,5 ml ddH ₂ O + 0,5 ml Ethanol
<u>LB-Agarplatten:</u>	8,75 g <i>LB Broth with agar</i> (Lennox) auf 250 ml ddH ₂ O mit 150 µl 5 M NaOH autoklavieren, im Wasserbad auf ca. 60 °C herunterkühlen. Anschließend Zugabe von Antibiotika entsprechend der Resistenzen im Verhältnis: Tetracyclin 1 mg/ml; Ampicillin 10 mg/ml

2.1.4.3 Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation

Tabelle 10: Mini- und Maxi-Kulturen und Maxi-Präparation

Material	Hersteller
Ethanol, <i>gradient grade for liquid chromatography</i> LiChrosolv®	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>LB Broth Base</i> (Lennox <i>L Broth Base</i>)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Qiagen® <i>Plasmid Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<u><i>LB Broth Base-Medium</i> mit Ampicillin/Tetracyclin:</u>	<i>LB Broth Base-Medium</i> (autoklaviert) mit Ampicillin 25 µg/ml und Tetracyclin 7,5 µg/ml

2.1.4.4 DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese

Tabelle 11: DNA-Restriktion und Agarose-Gelelektrophorese

Material	Hersteller
<i>100 bp DNA-Ladder</i>	<i>New England Biolabs GmbH</i> , Frankfurt am Main, Deutschland

Material	Hersteller
Agarose NEEO Ultra Qualität Roti@ga-rose, für DNA/RNA Elektrophorese	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Electrophoresis Power Supply – EPS 300</i>	<i>Amersham Pharmacia Biotech Inc.</i> , Uppsala, Schweden
Essigsäure 100 %	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidium Bromidlösung 0,025 % i. d. Tropfflasche, wässrige Lösung, 250 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate</i> (EDTA) pH 8,0	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ficoll® 400	<i>Pharmacia Biotech AB</i> , Uppsala, Schweden
<i>Lambda DNA-BstE II Digest</i> , 500 µg/ml	<i>New England Biolabs GmbH</i> , Frankfurt am Main, Deutschland
<i>NEBuffer 3.1</i>	<i>New England Biolabs GmbH</i> , Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Orange G</i>	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Restriktionsenzyme	<i>New England Biolabs GmbH</i> , Frankfurt am Main, Deutschland
<i>Water for HPLC</i>	VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten
<u>1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:</u>	0,04 M Tris Base, 0,02 M Essigsäure, 0,5 M EDTA pH 8,0
<u>5x TAE Ladepuffer <i>Orange G</i>:</u>	0,25 % <i>Orange G</i> , 15 % Ficoll 400, 15 % Glycerin
<u>50x TAE-Puffer:</u>	2 M Tris Base; 0,05 M EDTA; 0,95 M Essigsäure 100 %; 0,6 M Aqua dest.
<u>1 % Agarosegel (100 ml):</u>	1 g Agarose auf 100 ml 1x TAE, 4 Tropfen Ethidium Bromidlösung 0,025 %

2.1.5 Geräte

Tabelle 12: Geräte

Verwendung	Gerät	Hersteller
Stromgerät für die Agarose-Gelelektrophorese	<i>Electrophoresis Power Supply – EPS 300</i>	<i>Pharmacia Biotech</i> (jetzt Cytiva, Marlborough, Massachusetts, Vereinigte Staaten)

Verwendung	Gerät	Hersteller
Zentrifuge für 1,5 ml Eppis	Eppendorf <i>Centrifuge</i> 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für 15 ml Tubes und Maxi-Präparation	Eppendorf <i>Centrifuge</i> 5910 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kochen der Ganzzelllysate, Lysate und Co-IPs	Eppendorf Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Imager</i> für Chemilumineszenz	FluorChem FC2	<i>Alpha Innotech Corp.</i> , San Leandro, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Shaken der WB-Membranen während Inkubation im Antikörper bei Raumtemperatur	IKA® HS 260 <i>control</i> Horizontalerschüttler	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Inkubationsschüttler für Mini- und Maxi-Kulturen	Infors HT Multitron	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Stromgerät für SDS-PAGE und Western Blot	<i>PowerPac</i> ™ Universal	<i>Bio-Rad Laboratories, Inc.</i> , Hercules, Kalifornien, Vereinigte Staaten
Shaken der WB-Membranen bei Inkubation im Antikörper über Nacht bei 4 °C	<i>Rocking Platform</i>	VWR International, Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung der HEK293T-Zellen

Für die Versuche der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Zellen der Zelllinie HEK293T verwendet. Diese wurden in 10 Zentimeter (cm)-Schalen mit ungefähr 10 Milliliter (ml) DMEM (*Dulbeccos modified Eagles medium*) mit 4,5 Gramm (g) Glukose pro Liter und 10 Prozent (%) Fetalem Rinderserum (FBS) bei 37 Grad Celcius (°C) kultiviert. Die HEK293T-Zellen wurden alle 48 Stunden passagiert, wenn ihre Konfluenz bei 70-80 % lag (201). Das bedeutet, das alte, verbrauchte Medium wurde mittels einer Absaugvakuumpumpe entfernt und die Zellkultur wurde mit 5 ml *Dulbecco's Balanced Salt Solution* (DPBS) pro Schale gewaschen. Anschließend wurde das DPBS ebenfalls abgesaugt und 1 ml auf 37°C vorgewärmtes Trypsin mittig auf die Zellen pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank waren die HEK-Zellen vom Schalenboden abgelöst, konnten mit frischem Medium versetzt und auf neue Zellschalen mit bereits vorgelegtem Medium passagiert werden. Die

HEK-Zellen wurden jeweils in dem Verhältnis passagiert, so dass sie nach 48 Stunden wieder zu 70-80 % konfluent waren.

2.2.1.2 Aussaat der Zellen für die Transfektion

Am Abend vor der Transfektion wurden die HEK293T-Zellen für die Versuche dieser Promotionsarbeit in 10 cm-Schalen in DMEM mit 1 g/L Glukose und 10 % FBS ausgesät. Dabei wurde wie bei der im Abschnitt „Kultivierung der HEK293T-Zellen“ beschriebenen Passagierung vorgegangen. Die Zellen wurden in dem Verhältnis passagiert, dass sie am nächsten Morgen möglichst einzeln zu liegen kamen, um eine gute Transfektion zu gewährleisten. Dies wurde unmittelbar vor der Transfektion mittels Mikroskop überprüft.

2.2.1.3 Transfektion

Für die Transfektion der HEK293T-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Methode angewendet. Dafür wurde die zuvor festgelegte µg-Menge des zu transfizierenden Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Plasmids in 1,5 ml Eppis vorgelegt. Es wurden jeweils 500 Mikroliter (µl) 0,25 Molar (M) Calciumchlorid (CaCl₂) hinzugegeben und anschließend je 500 µl 2x HEBS tröpfchenweise und unter Vortexen zum CaCl₂-DNA-Gemisch pipettiert. Dann konnte die DNA zu den Zellen gegeben werden. Dazu wurden die 1000 µl des hergestellten DNA-Gemisches entweder tröpfchenweise oder unter Schräghalten der Zellschale auf das Zellmedium pipettiert und die Zellen mit der DNA für mindestens sechs Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um eine adäquate Transfektion sicherzustellen. Nach 6-8 Stunden wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, indem das alte DNA-enhaltende Medium entfernt und 10 ml neues Medium zu den Zellen gegeben wurde.

Der Mediumwechsel für die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Versuche erfolgte mit drei unterschiedlichen Medien, um den Einfluss von Glukose bei den jeweiligen Versuchen zu untersuchen. Zur Beendigung der Transfektion wurde je einer Schale DMEM mit 10 % FBS und 5,5 mM Glukose (*low glucose*-Bedingungen), 25 mM Glukose (*high glucose*-Bedingungen) oder 5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol (osmotische Kontrolle) zugegeben. Durch die unterschiedlichen Glukosekonzentrationen sollten normoglykämische (5,5 mM Glukose) und moderat hyperglykämische (25 mM Glukose) Bedingungen simuliert werden. Das Medium mit D-Mannitol diente dem Nachweis eines möglichen osmotischen Einflusses.

Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mittels verschiedener Techniken geerntet.

2.2.2 Zellernte

2.2.2.1 Ganzzelllysate (GZL)

Im Rahmen der Transfektion wurde in Bakterien vervielfältigte DNA in die Zellen eingebracht, die daraufhin die durch diese DNA kodierten Proteine exprimierten. Bei der Zellernte werden die Zellen lysiert, um diese Proteine zu isolieren und weiter untersuchen zu können. Für die Untersuchung des Glukose-abhängigen Einfluss der Expression der 4.10-Spleißvarianten 207, 201, 204, 202 und einer 207-Mutante auf die Phosphorylierung des Yes-assoziierten Proteins (YAP) wurden Ganzzelllysate hergestellt. Dafür wurden je drei Zellschalen mit 7,5 Mikrogramm (μg) des Plasmids cdm8 und F.207, F.201, F.204, F.202 oder F.207 Δ FERM Δ cc wie oben beschrieben transfiziert. Der Mediumwechsel erfolgte dann so, dass die Zellkulturen, die mit demselben Plasmid transfiziert wurden, in den drei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen kultiviert wurden.

Vor der Zellernte wurden die Zellen mikroskopiert, um den Erfolg der Transfektion zu beurteilen. Als erstes wurde das Medium mittels Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellkultur mit 5 ml 4 °C kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Darauf wurde der Inhalt einer Zellschale in ein 15 ml Tube überführt. Diese 15 ml Tubes wurden auf Eis gehalten, um jegliche Enzymaktivität zu unterbinden. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation der gereinigten Zellen bei $483 \times g$ und 4 °C, um die transfizierten Zellen von Mediumresten und PBS zu trennen. Anschließend wurden die entstandenen Zellpellets in den 15 ml Tubes betrachtet und die Menge des benötigten 2x Laemmli und Dithiothreitol (DTT) für die Lyse abgeschätzt. Der flüssige Überstand wurde entfernt und verworfen, sodass nur die Zellpellets in den 15 ml Röhrchen verblieben. Im nächsten Schritt wurde die abgeschätzte Menge 2x Laemmli + DTT auf die Zellpellets pipettiert und die Pellets vorsichtig suspendiert. Dieses Gemisch wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Wurden alle Proben auf diese Weise behandelt, wurden sie fünf Minuten bei 95 °C im vorgeheizten Eppendorf-Thermocycler gekocht.

Bevor das wie in Abschnitt 2.1.3 hergestellte 10 % SDS-Gel mit den Proben beladen wurde, wurden sie für drei Minuten bei $20817 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Proben erneut für ungefähr eine Minute auf 95 °C erhitzt, sodass die heißen Proben in die Geltaschen pipettiert werden konnten. Die Konsistenz

der geladenen Probe sollte flüssig sein und sich leicht pipettieren lassen, damit man die gewünschten Proteine und keine anderen Bestandteile pipettiert.

2.2.2.2 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Zur Untersuchung der Interaktion des zytoplasmatischen Anteils von Nephrin und den Protein 4.O-Spleißvarianten 207, 201, 204 und 202 wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden jeweils sechs Schalen mit HEK293T-Zellen mit 7 µg slg.Nephrin.cyt und 5 µg der 4.1O-Spleißvariante 207, 201, 204 oder 202 und zwei Zellschalen mit 7 µg slg.Nephrin.cyt und 5 µg F.NCK1 (F = *FLAG-Tag*) als Negativkontrolle wie oben beschrieben transfiziert. Von den Zellschalen mit der 4.1O-Spleißvariante wurden nach dem Mediumwechsel je zwei bei den gleichen Glukosebedingungen (5,5 mM, 25 mM Glukose oder 5,5 mM Glukose + 19,5 mM D-Mannitol) wie oben beschrieben kultiviert.

Am Folgetag wurden die transfizierten Zellen mit 5 ml 4 °C kalter PBS gewaschen. Der Inhalt von je zwei Zellschalen, die mit derselben DNA transfiziert und nach der Transfektion bei derselben Glukosekonzentration (5,5 mM, 25 mM Glukose oder 5,5 mM Glukose und 19,5 mM Mannitol) kultiviert wurden, wurde in ein 15 ml Tube überführt. Diese 15 ml Tubes wurden auf Eis gehalten, um jegliche Enzymaktivität zu unterbinden. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation der gereinigten Zellen bei 483 × g und 4 °C zur Trennung der Zellen von Mediumresten und PBS. Der flüssige Überstand wurde abgenommen und verworfen, sodass nur die Zellpellets in den 15 ml Röhrchen verblieben. Im nächsten Schritt wurden je nach Pelletgröße 200-400 µl des vorbereiteten Lysispuffers 1 % Triton X-100 (siehe Material) nach Zugabe von 4,4 µl PMSF/ml Lysispuffer zum Pellet gegeben. Das Pellet wurde darin suspendiert und dieses Gemisch in ein 1,5 ml Eppi überführt. Dann wurden die Zellen für 30 Minuten im Eppi-Shaker bei 4 °C lysiert. Nach der Lyse wurden Zellmembranen, Zellkerne und -organellen sowie zytosolische Proteine durch eine mindestens 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 20817 × g voneinander getrennt. Anschließend wurde das Lysat bzw. die lösliche Phase in ein leeres 1,5 ml-Eppi überführt, das für die Co-Immunpräzipitation vorgesehen war. Bevor der Inhalt entsprechend weiter behandelt wurde, wurden 10 % hiervon mittels Pipette abgenommen und in ein leeres Eppi pipettiert, das mit dem gleichen Volumen 2x Laemmli und DTT versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C gekocht wurde.

In das IP-Eppi wurden 30 µl mit Protein G beschichtete *Beads* hinzugefügt. Die mit den *Beads* versetzten Lysate wurden mindestens eine Stunde bei 4 °C und unter ständigem „Shaken“ inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die IP-Proben drei Minuten lang bei 4 °C und 956 × g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 800 µl des einprozentigen Triton X-100 Lysispuffers und Zugabe von 4,4 µl PMSF/ml Lysispuffer gewaschen. Die dritte Zentrifugation erfolgte nur eine Minute lang bei 17949 × g. Dann wurde der komplette Überstand mit der Pipette entfernt. Es wurden 30 µl 2x Laemmli + DTT hinzugefügt und mit dem Pellet durch Beklopfen der 1,5 ml Eppis vermischt. Schließlich wurden diese Proben für fünf Minuten bei 95 °C gekocht und anschließend auf Eis gestellt. Durch die Zugabe der denaturierend wirkenden Substanzen 2x Laemmli und DTT wurden die Proteine von den mit Protein G beschichteten *Beads* gelöst.

Vor der Beladung des SDS-Gels mit den Proben wurden diese unmittelbar vorher eine Minute bei 20817 × g zentrifugiert, um nur die lösliche Phase auf das Gel zu laden.

2.2.2.3 Sodiundodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die im Rahmen der Zellernte hergestellten Proben wurden mithilfe der SDS-PAGE nach ihrer Größe und elektrischen Ladung aufgetrennt. Es handelte sich hier um ein diskontinuierliches System, da die Gelmatrix aus zwei verschiedenen Anteilen besteht: einem Trenngel und einem darauf liegenden Sammelgel. Für die für diese Promotionsarbeit durchgeführten Versuche wurden zehnpromzentige Gele mit einer Dicke von 75 Millimeter (mm) hergestellt. Zuerst erfolgte die Herstellung des Trenngels. Dafür wurden die Zutaten des Trenngels (s. Material) nacheinander in ein 50 ml Falcon gegeben. Zum Schluss wurden das 10 % APS und Temed hinzugefügt und alle Zutaten gut vermischt. Das Trenngel wurde zügig zwischen die beiden vorher in die Gießstation eingespannten Glasplatten gegossen, sodass es ungefähr drei Viertel des Raumes zwischen den Glasplatten einnahm. Direkt im Anschluss wurde reines Isopropanol auf das Trenngel gegeben, um es zu begradigen und etwaige Luftblasen zu entfernen. Nach der Polymerisation des Gels wurde das Isopropanol vollständig vom Trenngel entfernt. Nun wurde das Sammelgel in derselben Vorgehensweise wie das Trenngel erzeugt (s. Material) und auf das Trenngel gegossen. Dabei wurden circa 2-3 ml bis zum oberen Rand der dünnen Glasplatte freigelassen. Sofort wurde der Gelkamm zur Bildung der Geltaschen in das Sammelgel eingesetzt.

Die SDS-PAGE-Gele konnten unter feuchten Bedingungen luftdicht verpackt bei 4 °C

aufbewahrt werden. Vor ihrer Benutzung wurden die Gele einschließlich der umliegenden Glasplatten aus ihrem Rahmen geklemmt und Kamm und mögliche Gelreste unter Zuhilfenahme eines feuchten Tuchs beseitigt. Die Gele in den Glasplatten wurden in den Gelelektrophorese-Einsatz eingespannt und in der Gelelektrophorese-Kammer platziert. Dann wurde die Kammer mit dem 1x Laufpuffer (s. Material) bis zur Markierung aufgefüllt. Neben den eigentlichen Proben wurden 7 µl eines Proteinmarkers als Größenreferenz mitgeladen. In die restlichen Geltaschen wurden je 15 µl einer Probe pipettiert. Nach Beladen der Geltaschen wurde die Elektrophorese mit einer Sammelgelpphase von 30 Minuten bei 70 Volt (V) und einer anschließenden Trenngelpphase von 90 Minuten bei 20 Milliampere (mA) pro Gel gestartet.

2.2.2.4 Western Blot

Beim Western Blot wurden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran übertragen. Sie wurden bei den hier durchgeführten Versuchen anschließend immunologisch im Rahmen einer Enzym-Substrat-Umsetzung durch die Aktivität der *horseradish peroxidase* nachgewiesen. Als Vorbereitung für den Western Blot wurde der Transferpuffer entsprechend der Zutaten im Material (s. Abschnitt 2.1.3) angesetzt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-(SDS-)Gele von den Glasplatten getrennt und in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale gelegt. Auch die Schaumstoffschwämme, das Filterpapier und die NC-Membran wurden zur Befeuchtung in Schalen mit Transferpuffer gelegt. Anschließend folgte der Zusammenbau des Western Blot-Sandwiches: Auf die Kathoden-Seite des geöffneten Plastiksandwiches wurden nacheinander ein nasser Western Blot-Schwamm, ein Filterpapier und das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Das Gel wurde dann mit dem Transferpuffer übergossen, sodass es vollständig von einem Flüssigkeitsfilm bedeckt war. Sofort wurde die NC-Membran unter Vermeidung von Luftblasen auf das Gel aufgelegt bzw. abgerollt, sodass das Gels vollständig von der Membran bedeckt wurde. Auf die NC-Membran wurde dann ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Western Blot-Schwamm gelegt. Das Sandwich konnte nun zugeklappt und verschlossen werden. Das fertige Western Blot-Sandwich wurde dann in den Western Blot-Einsatz in die Blot-Kammer geschoben, dahinter ein Eisblock zur Kühlung gesetzt und die Kammer vollständig mit Transferpuffer gefüllt. Der Western Blot erfolgte bei 200 mA für 60 bis 70 Minuten (je nach Versuch).

2.2.2.5 Immunfärbung

Um die auf die NC-Membran übertragenen Proteine sichtbar zu machen, wurde für die Versuche dieser Promotionsarbeit das Verfahren der Chemilumineszenz angewendet. Zunächst wurde die NC-Membran nach dem *Blotting* in 5 %igem Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumin*, BSA) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schütteln inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran möglichst vollständig abzusättigen. Darauf folgte die ebenfalls mindestens einstündige Inkubation im Primärantikörper bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Die Antikörper wurden im in Abschnitt 2.1.4 angegebenen Verdünnungsverhältnis mit der entsprechenden Menge 1x Proteinwaschpuffer angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran dreimal für fünf Minuten in 1x Proteinwaschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die mindestens einstündige Inkubation der Membran im speziespezifischen Sekundärantikörper bei Raumtemperatur und ein erneuter Waschvorgang in 1x Proteinwaschpuffer.

Für die Ganzzelllysate wurde als Primärantikörper der P-YAP (Ser397) (D1E7Y) *Rabbit mAb* und als Sekundärantikörper der *Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody* der Firma *Cell Signaling Technology* verwendet. Der *Phospho-YAP (Ser397) Rabbit mAb* bindet an endogenes YAP, das an Serin 397 phosphoryliert ist, welches dem Serin 381 der zweiten YAP-Isoform entspricht (siehe Abschnitt 1.3.2) (202).

Bei den Co-Immünpräzipitationen dienten der *Monoclonal ANTI-FLAG M2 Antibody* als Primärantikörper und der *Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP* als Sekundärantikörper.

Die hier verwendeten Sekundärantikörper waren an das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, das für die folgende Nachweisreaktion benötigt wurde. Die Nachweisreaktion erfolgte über ein Elektrochemilumineszenz (ECL)-System, das Luminol enthält. Zur Sichtbarmachung der auf der NC-Membran gebundenen Immunkomplexe aus Primär- und HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper wurden Lösung A und Lösung B des ECL-Systems 1:1 in einem 5 ml- Reaktionsgefäß miteinander vermischt. Die immunologisch gefärbte NC-Membran wurde auf der dafür vorgesehenen Plastikschiene platziert und mit 1-1,5 ml der ECL-Mischung vollständig bedeckt. Durch die Vermischung der beiden ECL-Lösungen wurde die HRP-katalysierte Reaktion in Gang gesetzt: Die Meerrettich-Peroxidase katalysierte die Oxidation von Luminol zu einem kurzlebigen, energiereichen Peroxid unter Umsetzung von Wasserstoffperoxid. Dieses Peroxid zerfiel in ein 3-Aminophthalat-Dianion

und die dabei freiwerdende Energie resultierte in der Anregung einer der beiden entstehenden Carbonylbindungen (203). Das bei dieser enzymatisch-katalysierten Reaktion emittierte Licht wurde von dem *Phosphorimager* FluorChem FC2 detektiert und aufgezeichnet. Die so detektierten Proteinbanden konnten anschließend densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.2.6 Auswertung

Die mit dem *Imager* detektierten Proteinbanden der Ganzzelllysate wurden mit dem Computerprogramm *AlphaView SA* densitometrisch ausgewertet. Die Densitometrien der Co-Immunpräzipitationsversuche wurden mit dem Programm *Fiji/ImageJ* Version 1.53c durchgeführt.

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse der GZL-Versuche wurden zunächst jeweils alle gemessenen Werte der P-YAP-Banden und der Aktin- bzw. Tubulin-Banden derselben Glukosekonzentration gemittelt. Danach wurden die Einzelwerte jeweils auf diese berechneten Mittelwerte bezogen und dann das Verhältnis von P-YAP zu β -Aktin gebildet, um die gemessenen Dichtewerte der AK-markierten Banden miteinander vergleichen zu können. Gleichmaßen wurden bei den Co-IP-Versuchen zuerst die Werte der IPs und der Lysate gemittelt, die Einzelwerte auf die Mittelwerte bezogen und die auf diese Weise berechneten Werte zueinander in Beziehung gesetzt. Dies hatte in gleicher Weise zum Ziel, die Intensität der Banden miteinander vergleichen zu können.

Sowohl bei den GZL als auch bei den Co-IPs wurden die so erhaltenen Werte anschließend auf die *low glucose*-Bedingungen (5,5 mM Glukose) normiert. Die normierten Werte wurden für die Bestimmung einer statistischen Signifikanz zwischen den bei unterschiedlichen Glukosebedingungen kultivierten HEK293T-Zellen, die dasselbe Protein exprimierten, verwendet. Signifikante Unterschiede mit einem Signifikanzniveau von P für α mit 0,05 wurden mittels *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und anschließendem Kruskal-Wallis-Test für multiple Vergleiche überprüft. Für die statistischen Berechnungen und die Anfertigung der graphischen Darstellungen wurde die *GraphPad-Software Prism 9.0* (*GraphPad Software*, San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten) verwendet.

2.2.3 Plasmide

2.2.3.1 Transformation und Amplifikation

Zur Vervielfältigung der in den Versuchen dieser Promotionsarbeit verwendeten DNA-Plasmide müssen diese zunächst transformiert werden. Dafür wurde die zu amplifizierende DNA zunächst vorverdünnt. Da 100 (Nanogramm (ng) DNA transformiert werden sollten, wurde die DNA mit *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)-Wasser so verdünnt, dass ein Mikroliter 100 ng DNA enthielt und dementsprechend immer ein Mikroliter pipettiert werden konnte. Dann wurde ein Mikroliter mit 100 ng DNA in ein 1,5 ml Eppi-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden 25 µl *Escherichia coli* (*E. coli*) MC1061 mit P3 für Ampicillin/Tetracyclin-resistente Plasmide hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubation bei 37 °C im Wärmeblock. Nun konnten die transformierten *E. coli* auf den passenden Agarplatten (s. Material) entsprechend des Plasmids bzw. der Antibiotikaresistenz mit einem Drigalskispatel ausgestrichen werden. Für die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Plasmide waren dies Agarplatten mit Ampicillin-/Tetrazyklin-Resistenz. Nach dem Ausstreichen ließ man die Platten 5-10 Minuten an der Luft trocknen. Schließlich wurden die auf diese Weise behandelten Agarplatten für 12-20 Stunden im 37 °C-Schrank inkubiert. Eine erfolgreiche Transformation zeigte sich durch die Vermehrung der *E. coli* zu zahlreichen einzelnen Kolonien.

2.2.3.2 Mini-Kulturen

Zur Herstellung von Mini-Kulturen wurden zunächst 3 ml *Luria Bertani* (LB)-Medium (s. Material) mit 25 µg Ampicillin/ml und 7,5 µg Tetrazyklin/ml in ein 15 ml Tube gegeben. Eine Kolonie von der zuvor mit den transformierten *E. coli* bestrichenen Agarplatte wurde mithilfe einer Pipettenspitze hinzugefügt und diese Mischung wurde mindestens acht Stunden bei 37 °C, ständiger Umdrehung von 220 Umdrehungen/min und nicht ganz zugedrehtem Röhrchen-Deckel inkubiert. Die Trübung des Mediums zeigte eine erfolgreiche Vermehrung der *E. coli* an.

2.2.3.3 Maxi-Kulturen

Für die Maxi-Kulturen wurden 200 ml autoklaviertes LB-Medium mit 25 µg Ampicillin/ml und 7,5 µg Tetrazyklin/ml und 200 µl der zugehörigen Mini-Kultur in sterilisierte 500 ml Kolben gegeben. Diese wurden mit Alufolie verschlossen und für mindestens 12 Stunden bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute inkubiert.

2.2.3.4 Maxi-Präparation

Bei der Maxi-Präparation wurde die in den *E. coli* vervielfältigte DNA aus den Bakterien isoliert. Dafür wurde das *Genopure Plasmid Maxi Kit* von Roche verwendet und die Maxi-Präparation wurde entsprechend der Hersteller-Anleitung „2. How to Use this Product – High-Copy-Number Plasmids“ (siehe Anhang) durchgeführt. Nachdem das DNA-Pellet, wie in der Anleitung angegeben, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und der Überstand verworfen wurde, wurde die Plasmid-DNA in dem Falcon-Röhrchen für mindestens zehn Minuten lufttrocknen lassen. Danach wurde die DNA je nach Pellet-Größe vorsichtig in 100-300 (250) µl HPLC-Wasser über Nacht gelöst.

2.2.3.5 DNA-Verdau

Nach der Präparation der in den *E. coli* amplifizierten DNA wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob die richtige bzw. gewünschte DNA vervielfältigt wurde. Dazu wurde zunächst die Konzentration der gewonnenen DNA mithilfe eines Eppendorf Photometers gemessen. Dafür wurde die aus den Bakterien isolierte DNA mit HPLC-Wasser im Verhältnis 1:70 verdünnt, d.h. 1 µl Plasmid-DNA und 69 µl HPLC-Wasser wurden in eine Photometer-Küvette gegeben und vermischt. Bevor die Konzentrationen der Proben gemessen wurden, wurde das Photometer mit einer Küvette mit 70 µl HPLC-Wasser geeicht. Anschließend konnten die Konzentrationen der Plasmid-DNA gemessen werden.

Diese Information wurde benötigt, um die Proben für den DNA-Verdau herzustellen, da hier das richtige Verhältnis von DNA-Menge und Volumen des Restriktionsenzym oder Restriktionsenzyme wichtig ist, damit die DNA-Restriktion suffizient ablaufen kann. Für den DNA-Verdau wurden Proben von insgesamt 20 µl angesetzt und 1-1,5 g DNA verwendet. Diese wurde in ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, in dem zuvor HPLC-Wasser vorgelegt wurde. Die Menge des HPLC-Wassers richtete sich nach der Differenz der DNA-Menge und der übrigen Reagenzien, um ein Gesamtvolumen von 20 µl zu erreichen. In die 0,5 ml Eppis wurden darüber hinaus 2 µl des Restriktionsenzym-Puffers mit maximaler Enzymaktivität und je 1 µl des Restriktionsenzym oder der Restriktionsenzyme gegeben. Im Anschluss wurden die so zusammengesetzten Proben für mindestens ein bis anderthalb Stunden bei 37 °C im Wärmeblock inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Agarose-Gel für die anschließende Restriktionsanalyse hergestellt. Wenn nur vier vervielfältigte DNA-Plasmide analysiert werden sollten, wur-

den nur 50 ml Agarose-Gel hergestellt. Für 50 ml eines 1,5 %igen Agarose-Gels wurden 0,75 g Agarose abgewogen und in eine 250 ml Glasflasche gegeben. Dann wurden 50 ml 1x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 2-3 Minuten in der Mikrowelle bei maximaler Watt-Zahl erhitzt. Zwischendurch wurde es händisch durch kreisförmiges Schwenken vermischt. Ziel war, eine flockenfreie, klare Flüssigkeit zu erhalten. Wurde dies erreicht, ließ man den Flascheninhalt für 1-2 Minuten abkühlen und fügte zwei Tropfen Ethidiumbromid hinzu (4 Tropfen/100 ml). Durch Schwenken der Flasche wurde der komplette Flascheninhalt gut vermischt. Nun wurde das Gel in die vorbereitete und mit einem Gel-Kamm versehene Gel-Gießstation gegossen. Die Polymerisation des Agarose-Gels dauerte ungefähr 20 Minuten.

Nach Ende der DNA-Restriktion wurden die Proben mit 5 µl *Orange G* versetzt und gut vermischt. Das auspolymerisierte Agarose-Gel wurde in der Gel-Kammer platziert und der Kamm entfernt. Dann wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt war. Es folgte die Beladung der Geltaschen mit 7 µl des 100 Basenpaare (bp)-Markers, gefolgt von 12 µl der DNA-Proben. In die letzte Geltasche wurden 20 µl des *Lambda*-Markers gegeben. Die Gel-Kammer wurde mit dem Deckel verschlossen und für 40 Minuten unter eine Stromspannung von 85 V gesetzt. War die Agarose-Gelelektrophorese beendet, wurde das Ergebnis mithilfe des FluorChem F2 *Imagers* fotografisch festgehalten und die durch die Restriktionsenzyme entstandenen DNA-Fragmente entsprechend der Anzahl ihrer Basenpaare beurteilt. Wenn diese DNA-Fragmente die richtige Länge des *Inserts* und Vektors aufwiesen, ist die gewünschte DNA amplifiziert worden und sie konnte nun in 1,5 ml Eppis bei 4 °C gelagert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss der Expression der Protein 4.1O-Spleißvarianten auf die YAP-Phosphorylierung bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen

3.1.1 Die Expression von 4.1O-207 führt zur Glukose-abhängigen Steigerung der YAP-Phosphorylierung

Wegen der oben beschriebenen Beteiligung des Hippo-Signalweges an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie (DN) und der möglichen Bedeutung des Proteins 4.1O für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran wurde der Einfluss der Expression eines der häufigsten 4.1O-Transkripte des renalen Kortex, 4.1O-207, auf die YAP-Phosphorylierung untersucht. Um dabei den Einfluss von Glukose zu ermitteln, wurde der Effekt auf die YAP-Phosphorylierung bei *low glucose* (5,5 mM Glukose)-, *high glucose* (25 mM Glukose)- und hyperosmolaren Bedingungen als osmotische Kontrolle (5,5 mM Glukose + 19,5 mM D-Mannitol) verglichen. Dafür wurden wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben Ganzzelllysate hergestellt, die anschließend in der Sodiuumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und per Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen wurden. Dann wurde eine Färbung gegen am Serin 397 phosphoryliertes *Yes-associated protein* (P-YAP Ser397), β -Aktin als *housekeeping*-Protein und gegen *FLAG* zum Nachweis des mit dem *FLAG-Tag* markierten 4.1O-207 durchgeführt (Abb. 6A). Wie in Abb. 6B dargestellt ist, zeigte sich eine signifikante Steigerung ($p \leq 0,05$) der YAP-Phosphorylierung unter Expression von 4.1O-207 bei den *high glucose* (HG)-Bedingungen im Vergleich zu den *low glucose*-Bedingungen. Die hyperosmolaren Bedingungen hatten hingegen keinen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung im Vergleich zu den *low glucose*-Bedingungen.

Bei der Kontrolle zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der YAP-Phosphorylierung zwischen den *low glucose*- und den HG-Bedingungen. Allerdings ließ sich ein signifikante Steigerung der YAP-Phosphorylierung ($p \leq 0,05$) beim Vergleich der HG- mit den hyperosmolaren Kultivierungsbedingungen verzeichnen.

Insgesamt wurden fünf unabhängige Versuche für die statistische Analyse verwendet.

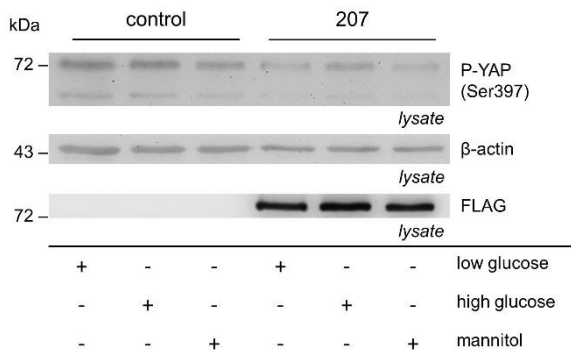
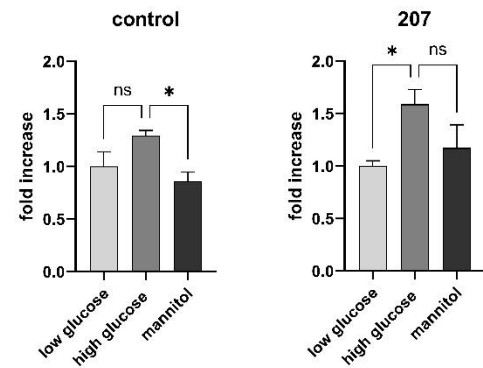
A**B**

Abb. 6: 4.1O-207 steigert die Phosphorylierung des Yes-associated protein (YAP) unter high glucose-Bedingungen in HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen exprimierten den Vektor ohne *Insert* (cdm8) als Kontrolle (*control*) oder die Protein 4.1O-Spleißvariante 207 (207). Sie wurden nach der Transfektion entweder bei *low glucose* (5,5 mM Glukose), *high glucose* (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Von diesen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) aufgetrennt wurden.

(A) Diese Lysate wurden in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes YAP am Serinrest 397 (P-YAP Ser397) und β -Aktin als Gegenfärbung gefärbt. Zum Nachweis des mit dem *FLAG-tag* markierten 207 wurde zusätzlich eine Färbung gegen *FLAG* durchgeführt. Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Ermittlung der Menge des phosphorylierten Anteils von YAP wurde eine Densitometrie der P-YAP-Banden und der Aktin-Banden vorgenommen. Danach wurden die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist die statistische Analyse von fünf unabhängigen Versuchen. Es zeigte sich eine signifikant höhere YAP-Phosphorylierung unter *high glucose*-Bedingungen (normiert auf *low glucose*-Bedingungen, $n = 5$ pro Datenpunkt, ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean* [SEM]) dar.

3.1.2 Der Einfluss von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf die YAP-Phosphorylierung unter Expression von 4.1O-201

Wegen der zuvor beschriebenen Ergebnisse bei der 4.1O-Variante 207 wurde vermutet, dass auch die Expression von 4.1O-201 einen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung haben könnte. Daher wurden HEK293T-Zellen mit der 4.1O-Variante 201 transfiziert, anschließend bei *low glucose*-, *high glucose*- und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert und Ganzzelllysate (s. Abschnitt 2.2.2) angefertigt. Diese wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt, im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und gegen P-YAP Ser397, β -Aktin als Ladekontrolle und *FLAG* zum Nachweis von 4.1O-201 gefärbt (Abb. 7A). Es konnte gezeigt werden, dass unter Expression von 4.1O-201 die YAP-Phosphorylierung bei den HG-Bedingungen signifikant ($p \leq 0,01$) gegenüber den *low glucose*-Bedingungen gesteigert wurde (Abb. 7B). Die hyperosmolaren Bedingungen hatten wiederum keinen signifikanten Effekt

verglichen mit den *low glucose*-Bedingungen (Abb.7B).

Die Kontrollen zeigten beim Vergleich der HG-Bedingungen mit den *low glucose*- wie auch mit den hyperosmolaren Bedingungen eine signifikante Steigerung ($p \leq 0,05$) der YAP-Phosphorylierung unter den HG-Bedingungen.

Bei diesen Versuchen wurden acht unabhängige Versuche für die statistischen Analysen verwendet.

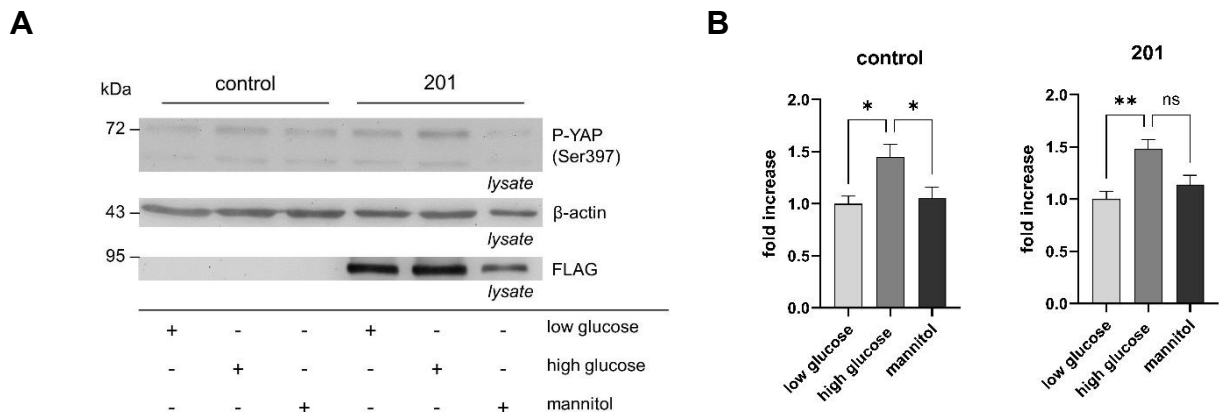


Abb. 7: Unter Expression von 4.1O-201 wurde die YAP-Phosphorylierung in HEK293T-Zellen bei den *high glucose*-Bedingungen signifikant gesteigert.

Die HEK293T-Zellen exprimierten den leeren Vektor (cdm8) als Kontrolle (*control*) oder die Protein 4.1O-Spleißvariante 201 (201). Nach der Transfektion wurden sie bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen mit Mannitol (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Von diesen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

(A) Diese Lysate wurden in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes YAP am Serinrest 397 (P-YAP Ser397) und β -Aktin als Gegenfärbung gefärbt. Zum Nachweis des mit dem *FLAG-Tag* markierten 201 wurde zusätzlich eine Färbung gegen *FLAG* durchgeführt. Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Die Menge des phosphorylierten Anteils von YAP wurde durch eine Densitometrie der P-YAP-Banden bestimmt, die Aktin-Banden dienten als Referenz des Proteingehalts der Zellen. Danach werden die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Abgebildet ist das Ergebnis der statistischen Analyse von acht unabhängigen Versuchen (normiert auf *low glucose*-Bedingungen, $n = 8$ pro Datenpunkt, ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Es zeigte sich eine signifikante Steigerung der YAP-Phosphorylierung unter *high glucose*-Bedingungen. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) an.

3.1.3 Der Einfluss der Expression von 4.1O-204 auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration

Da sowohl für die Expression der 4.1O-Variante 207 als auch für 4.1O-201 ein Glukose-abhängiger Effekt auf die YAP-Phosphorylierung verzeichnet werden konnte, wurde nun untersucht, ob auch 4.1O-204 die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit

von Glukose beeinflusst. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit dem leeren Vektor (cdm8) als Negativkontrolle oder 4.1O-204 transfiziert. Es wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine NC-Membran übertragen wurden. Die Membranen wurden anschließend gegen phosphoryliertes YAP, β -Aktin und *FLAG* zum Nachweis des 4.1O-204 gefärbt (Abb. 8A). Die statistische Analyse von sieben unabhängigen Versuchen mit Vergleich der YAP-Phosphorylierung bei den *low glucose*-, *high glucose*- und hyperosmolaren Bedingungen ergab keinen Glukose-abhängigen Effekt der Expression von 4.1O-204 auf die YAP-Phosphorylierung (Abb. 8B). Auch bei den Kontrollen konnte kein Unterschied der YAP-Phosphorylierung unter den unterschiedlichen Glukosebedingungen nachgewiesen werden.

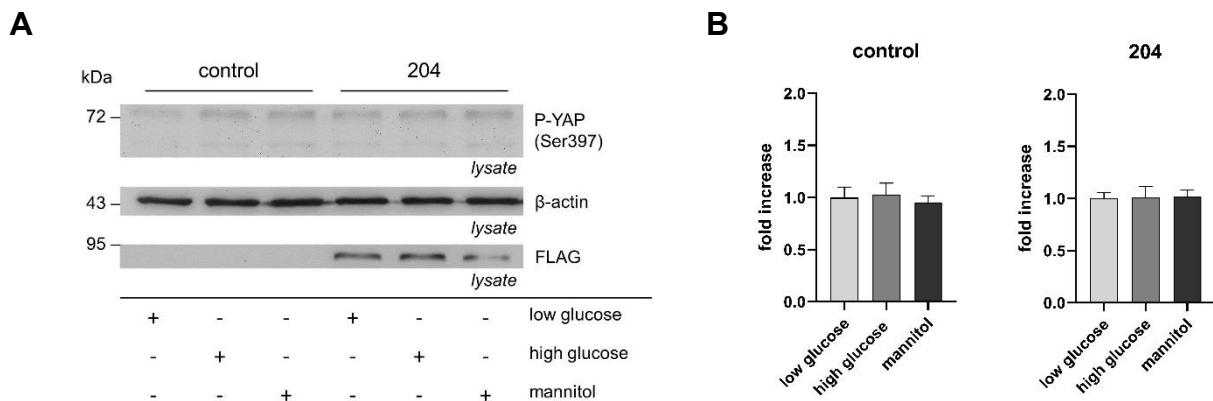


Abb. 8: Die Expression von 4.1O-204 hatte keinen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung in HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen exprimierten den Vektor ohne *Insert* (cdm8) als Negativkontrolle (*control*) oder die Protein 4.1O-Spleißvariante 204 (204). Sie wurden nach der Transfektion entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen mit Mannitol (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Von diesen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

(A) Diese Lysate wurden in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes YAP am Serinrest 397 (P-YAP Ser397) und β -Aktin als Ladekontrolle gefärbt. Die zusätzliche Färbung gegen *FLAG* diente dem Nachweis des mit dem *FLAG-Tag* markierten 204. Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben. (B) Um die Menge des phosphorylierten Anteils von YAP zu ermitteln, wurden Densitometrie der P-YAP-Banden und der Aktin-Banden durchgeführt. Anschließend wurden die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis der statistischen Analyse von sieben unabhängigen Versuchen (normiert auf *low glucose*-Bedingungen, n = 7 pro Datenpunkt, keine Beschriftung = nicht signifikant = $p > 0,05$; berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Der Standardfehler des Mittelwertes wird durch die Fehlerbalken dargestellt. Es zeigte sich keine Veränderung der YAP-Phosphorylierung bei den verschiedenen Kultivierungsmedien.

3.1.4 Der Effekt der Expression von 4.1O-202 auf die YAP-Phosphorylierung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen

Nachdem gezeigt wurde, dass die 4.1O-Varianten 207 und 201 einen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung zu haben scheinen, jedoch nicht 4.1O-204, stellte sich die Frage, welchen Effekt die Expression von 4.1O-202 auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Glukose hat. Wie in Abschnitt 1.4.3 dargestellt wurde, unterscheidet sich die Variante 202 von den vier für diese Promotionsarbeit verwendeten 4.1O-Spleißvarianten am stärksten von den anderen, da sie weder über eine U1-Region noch über eine FERM-Domäne oder vollständige C-terminale Domäne verfügt. Auch hierzu wurden Ganzzelllysate von HEK293T-Zellen hergestellt, die den leeren Vektor als Kontrolle oder 4.1O-202 exprimierten. Die Ganzzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Im Anschluss wurde gegen P-YAP Ser397, α -Tubulin als Haushaltsprotein und *FLAG* zum Nachweis des 4.1O-202 gefärbt (Abb. 9A). Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und die Daten von sechs unabhängigen Versuchen wurden für die statistische Analyse verwendet. Wie bei 4.1O-204 zeigte sich auch unter der Expression von 4.1O-202 keine Veränderung der YAP-Phosphorylierung bei den verschiedenen Glukosekonzentrationen (Abb. 9B). Gleiches gilt für die im Rahmen dieser Versuchsreihe angelegten Kontrollen mit dem leeren Vektor.

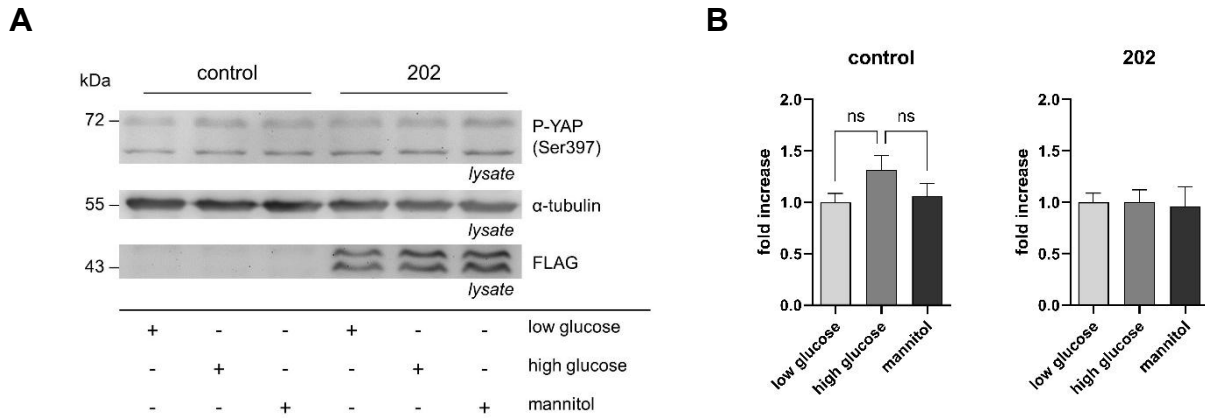


Abb. 9: Unter Expression von 4.1O-202 zeigt sich keine Veränderung der YAP-Phosphorylierung bei verschiedenen Glukosekonzentrationen in HEK293T-Zellen.

HEK293T-Zellen wurden mit dem leeren Vektor (cdm8) als Negativkontrolle (*control*) oder der Protein 4.1O-Spleißvariante 202 (202) transfiziert. Nach der Transfektion wurden sie entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen mit Mannitol (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Von diesen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt.

(A) Diese Lysate wurden in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes YAP am Serinrest 397 (P-YAP Ser397) und α -Tubulin als Ladekontrolle gefärbt. Zum Nachweis des mit dem *FLAG-Tag* markierten 202 wurde zusätzlich eine Färbung gegen *FLAG* durchgeführt. Die in der *FLAG*-Färbung zu beobachtenden Doppelbanden wurden als Resultat einer posttranslationalen Modifikation interpretiert. Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Ermittlung der Menge des phosphorylierten Anteils von YAP wurde zunächst eine Densitometrie der P-YAP-Banden und der Tubulin-Banden vorgenommen. Danach wurden die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Abgebildet ist das Ergebnis der statistischen Analyse von sechs unabhängigen Versuchen (normiert auf *low glucose*-Bedingungen, $n = 6$ pro Datenpunkt; ns = $p > 0,05$; keine Beschriftung = ns = $p > 0,05$, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Die Fehlerbalken markieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Es zeigte sich keine Veränderung der YAP-Phosphorylierung bei den unterschiedlichen Glukosebedingungen.

3.1.5 Die Expression der 207-Mutante steigert die YAP-Phosphorylierung bei *high glucose*- und hyperosmolaren Bedingungen

In den bisherigen Versuchen wurde gezeigt, dass zwei der verwendeten 4.1O-Spleißvarianten einen Glukose-abhängigen Einfluss auf die YAP-Phosphorylierung zu haben scheinen, die zwei anderen allerdings nicht. Um diesem Phänomen näher auf den Grund zu gehen und Vermutungen über dabei involvierte Domänen der 4.1O-Spleißvarianten anstellen zu können, wurde nun der Einfluss einer bekannten Mutante der 4.1O-Variante 207 auf die YAP-Phosphorylierung bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen untersucht. Dieser 207-Mutante fehlt im Vergleich zu 4.1O-207 die *Coiled-coil*-Domäne (1330-1410 Basenpaare [bp]) und die *FERM*-Domäne (1-817 bp). Entsprechend der vorherigen Versuche wurden HEK293T-Zellen mit dem leeren Vektor als Negativkontrolle oder der 207-Mutante transfiziert und danach bei *low glucose*-

high glucose- und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert. Ganzzelllysate wurden hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine NC-Membran übertragen. In der Immunfärbung wurde gegen phosphoryliertes YAP an Serin 397, β -Aktin und *FLAG* gefärbt (Abb. 10A). Insgesamt wurden die Densitometriedaten von sechs unabhängigen Versuchen für die statistische Analyse verwendet. Wie aus der Abb. 10B hervorgeht, kam es unter Expression der 207-Mutante zu einer statistisch signifikanten Steigerung ($p < 0,05$) der YAP-Phosphorylierung sowohl bei den *high glucose*-Bedingungen als auch bei den hyperosmolaren Bedingungen. Die Auswertung der Kontrollen ergab keine signifikanten Unterschiede der YAP-Phosphorylierung bei den unterschiedlichen Glukosebedingungen.

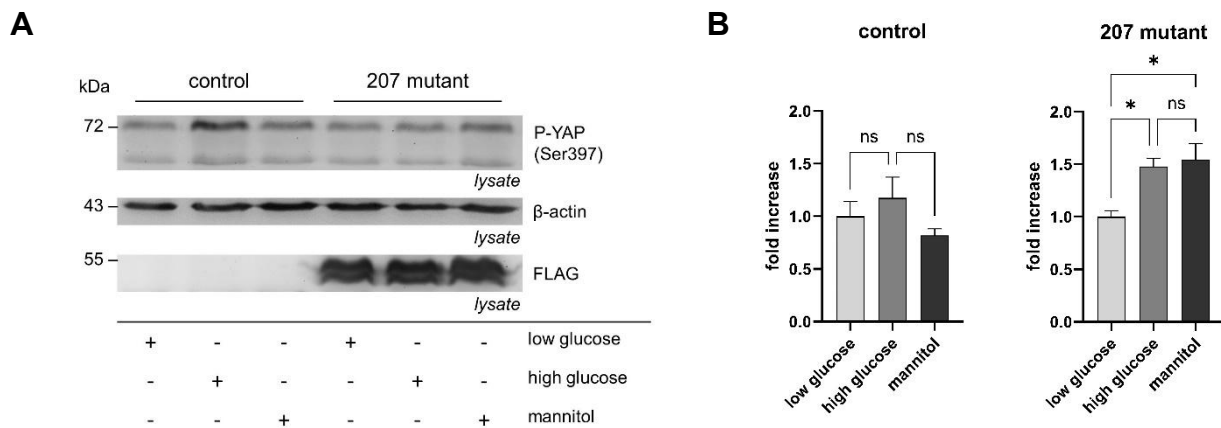


Abb. 10: Unter Expression der 207-Mutante wurde die YAP-Phosphorylierung unter *high glucose*-Bedingungen und hyperosmolaren Bedingungen gesteigert.

HEK293T-Zellen exprimierten den Vektor ohne *Insert* (*cdm8*) als Kontrolle (*control*) oder eine Mutante von Protein 4.1O-207 (*207 mutant*) ohne *Coiled coil*-Domäne (Basenpaare 1330-1410) und ohne *FERM*-Domäne (Basenpaare 553-816). Sie wurden nach der Transfektion entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Von diesen Zellen wurden Ganzzelllysate hergestellt, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden.

(A) Diese Lysate wurden in der Immunfärbung gegen phosphoryliertes YAP am Serinrest 397 (P-YAP Ser397) und β -Aktin als Gegenfärbung gefärbt. Zum Nachweis der mit dem *FLAG-Tag* markierten 207-Mutante wurde zusätzlich eine Färbung gegen *FLAG* durchgeführt. Die molekulare Masse ist in Kilo-dalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Ermittlung der Menge des phosphorylierten Anteils von YAP wurde zunächst eine Densitometrie der P-YAP-Banden und der Aktin-Banden vorgenommen. Danach wurden die beiden Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt. Es zeigte sich eine signifikant höhere YAP-Phosphorylierung sowohl unter *high glucose*- als auch unter hyperosmolaren Bedingungen (normiert auf *low glucose*-Bedingungen, $n = 6$ pro Datenpunkt, ns = $p > 0,05$; * = $p \leq 0,05$, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar.

3.2 Die 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204 und 202 interagieren mit Nephrin

3.2.1 Protein 4.1O-207 interagiert mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin

Wie in Abschnitt 1.4.1 erläutert wurde, fungieren die Proteine der 4.1 Proteinfamilie als Adapterproteine zwischen Membranrezeptoren und dem Aktin-Zytoskelett. Um zu klären, ob dies auch für das Protein 4.1O bzw. seine Spleißvarianten im Bereich der Niere zutrifft, wurde exemplarisch untersucht, ob die 4.1O-Spleißvarianten mit der zytoplasmatischen Domäne des Schlitzmembranproteins Nephrin interagieren. Zusätzlich wurde in Anlehnung an die diabetische Nephropathie geprüft, ob diese Interaktion durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst wird. Dazu wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. HEK293T-Zellen wurden mit 4.1O-207 und dem Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Nephrin oder mit Nck1 und dem Nephrin C-Terminus (AS 1086-1242) als Negativkontrolle transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) weiterkultiviert. Von diesen Zellen wurden Lysate hergestellt und diese wurden mit Protein G präzipitiert, um die Protein-Protein-Interaktion nachzuweisen. Die gebundenen Proteinkomplexe sowie die Lysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Zum Nachweis der Lysate und Co-Immunpräzipitationen (Co-IP) wurden sie gegen *FLAG* gefärbt, da sowohl 4.1O-207 als auch Nck1 mit dem *FLAG-Tag* markiert wurden (Abb. 11A). Anschließend folgte eine Densitometrie der Banden mithilfe des Programms *ImageJ*. Die erhobenen Werte der Co-IP-Proben wurden mit denen der Lysate der gleichen Kulturbedingungen in Beziehung gesetzt und dieses Ergebnis mit der Negativkontrolle verglichen. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass 4.1O-207 mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin interagiert (Abb. 11B). Unterschiedliche Glukosekonzentrationen bei der Kultivierung der HEK293T-Zellen hatten keinen signifikanten Einfluss auf diese Interaktion (Ergebnis nicht dargestellt).

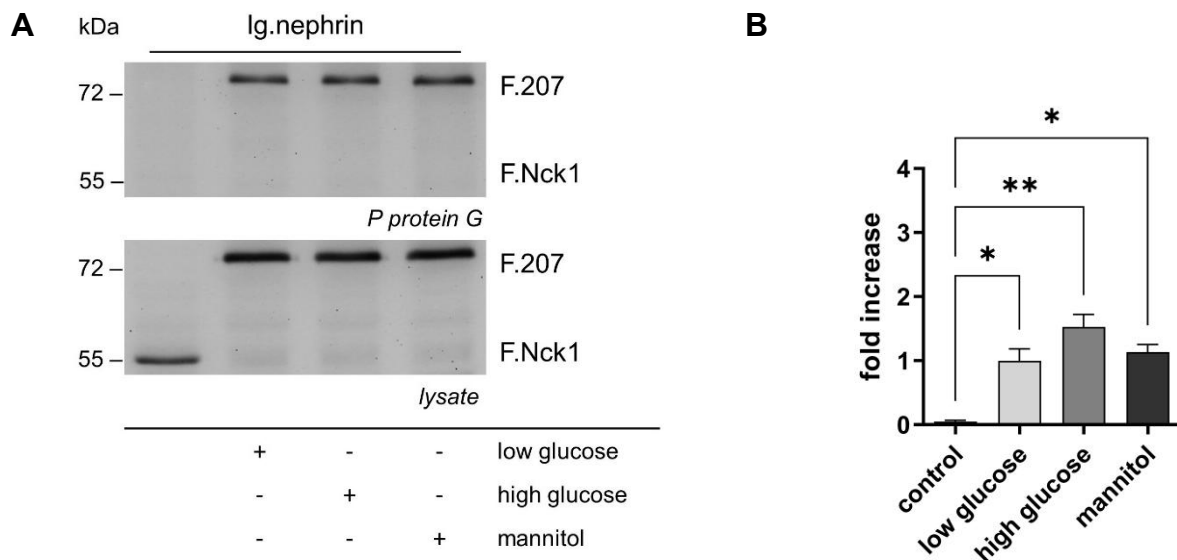


Abb. 11: 4.1O-207 interagiert mit dem C-Terminus von Nephtrin. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.

Die HEK293T-Zellen exprimierten entweder *FLAG*-markiertes Protein 4.1O-207 (F.207) oder Nck1 (F.Nck1) als Negativkontrolle (*control*) mit dem C-Terminus von Nephtrin (Ig.nephrin). Die mit 4.1O-207 und dem C-Terminus von Nephtrin (Aminosäuren 1086-1242) transfizierten Zellen wurden entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Das Kulturmedium der Negativkontrolle enthielt 25 mM Glukose. Nach Zellyse wurden die Proben mit Protein G präzipitiert.

(A) In der Immunfärbung wurden die Proteinpräzipitate (*P protein G* = Pulldown mit Protein G) und Lysate (*lysate*) gegen *FLAG* gefärbt (F = *FLAG*-Tag). Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Ermittlung der Interaktion von Nephtrin C-Terminus und 4.1O-207 bei unterschiedlichen Glukosebedingungen wurden fünf unabhängige Versuche densitometrisch ausgewertet und die arithmetischen Mittelwerte für die statistische Analyse verwendet. Dargestellt ist das Ergebnis als Verhältnis der Signalintensität der IP (Immunpräzipitation) zur Signalintensität der Lysate (Ratio *FLAG*-Färbung IP/Lysate) mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken (normiert auf *low glucose*; n = 5 pro Datenpunkt; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Interaktion von 4.1O-207 und dem Nephtrin C-Terminus im Vergleich zur Negativkontrolle (*control*). Zudem konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf diese Interaktion nachgewiesen werden (hier nicht dargestellt).

3.2.2 4.1O-201 interagiert mit dem C-Terminus von Nephtrin

Da nachgewiesen wurde, dass 4.1O-207 mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephtrin interagiert, wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch 4.1O-201 mit Nephtrin interagieren könnte. Dazu wurden Co-Immunpräzipitationen mit HEK293T-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit dem C-Terminus von Nephtrin (AS 1086-1242) und 4.1O-201 oder Nck1 als Negativkontrolle transfiziert und zur Untersuchung des möglichen Einflusses von Glukose bei *low glucose*-, *high glucose*- und hyperosmolaren Bedingungen kultiviert. Sie wurden wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben weiterbehandelt. Die Lysate und Co-IP-Proben wurden gegen *FLAG* gefärbt, um 4.1O-201 und Nck1 nachzuweisen (Abb. 12A). Nach der Durchführung von Densitometrien konnten die erhobenen Werte

der Immunpräzipitationen (IP) mit den Werten der Lysate ins Verhältnis gesetzt werden. Für die statistischen Berechnungen wurden zehn unabhängige Versuche verwendet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch 4.1O-201 mit dem C-Terminus von Nephrin interagiert (Abb. 12B), unabhängig von unterschiedlichen Glukosekonzentrationen des Kulturmediums (nicht dargestellt).

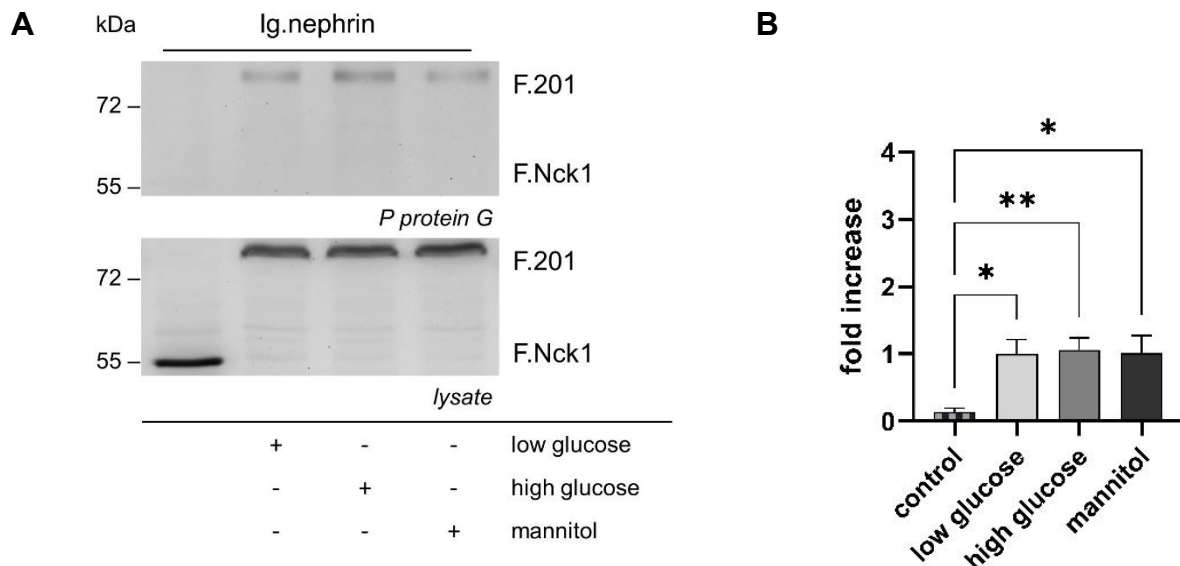


Abb. 12: 4.1O-201 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.

Die HEK293T-Zellen exprimierten die Protein 4.1O-Spleißvariante 201 (F.201) mit dem C-Terminus von Nephrin (Ig.nephrin) oder Nck1 (F.Nck1) mit dem C-Terminus von Nephrin als Negativkontrolle (*control*). Die mit 201 und Nephrin (Aminosäuren 1086-1242) transfizierten Zellen wurden entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Das Kulturmedium der Negativkontrolle enthielt 25 mM Glukose. Nach der Lyse der Zellen wurden die Proben mit Protein G präzipitiert.

(A) In der Immunfärbung wurden die Proteinpräzipitate (*P protein G* = Pulldown mit Protein G) und Lysate (*lysate*) gegen FLAG gefärbt (F = *FLAG-Tag*). Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Beurteilung der Interaktion von 4.1O-201 mit Nephrin wurde bei allen Proteinbanden eine Densitometrie durchgeführt, die Signalintensitäten der Immunpräzipitationen auf die der Lysate bezogen und die arithmetischen Mittelwerte für die statistische Analyse verwendet. Dargestellt ist das Ergebnis der statistischen Analyse von zehn unabhängigen Versuchen mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken (normiert auf *low glucose*; n = 10 pro Datenpunkt; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Interaktion von 4.1O-201 und dem Nephrin C-Terminus im Vergleich zur Negativkontrolle (*control*).

3.2.3 4.1O-204 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin

Nachdem eine Interaktion von 4.1O-207 und -201 mit Nephrin nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob auch 4.1O-204 mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin interagiert und ob diese Interaktion durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst wird, weil 4.1O-204 gegenüber 207 und 201 eine kürzere CTD besitzt. Dafür wurden HEK293T-Zellen einerseits mit 204 und Nephrin C-Terminus (AS 1086-1242), andererseits mit Nck1 und Nephrin C-Terminus als Negativkontrolle transfiziert. Um einen möglichen Einfluss von Glukose zu untersuchen, wurden sie nach der Transfektion bei *low glucose*-, *high glucose*- oder hyperosmolaren Bedingungen mit Mannitol inkubiert. Diese Zellen wurden im nächsten Schritt lysiert und dann mit Protein G präzipitiert, um die Protein-Protein-Interaktion nachzuweisen. Zum Nachweis von 4.1O-204 und Nck1 wurde in der Immunfärbung gegen *FLAG* gefärbt. Die mit dem Programm *ImageJ* durchgeführten Densitometrien der Co-IP-Proben und Lysate wurden miteinander ins Verhältnis gesetzt und die Ergebnisse mit den Werten der Negativkontrolle mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Bei den statistischen Berechnungen wurden sieben Versuche ausgewertet. Es zeigte sich eine statistisch signifikante, wenn auch schwache Interaktion (Abb.13A) zwischen 4.1O-204 und dem C-Terminus von Nephrin im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 13B).

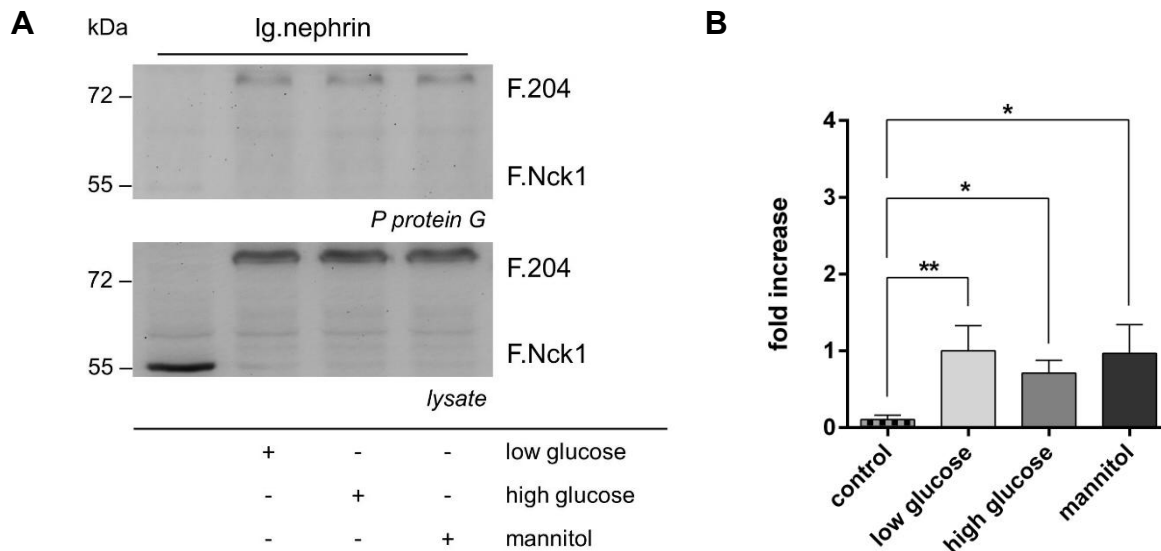


Abb. 13: 4.1O-204 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.

Die HEK293T-Zellen exprimierten die Protein 4.1O-Spleißvariante 204 (F.204) mit dem C-Terminus von Nephrin (Ig.nephrin) oder *FLAG*-markiertes Nck1 (F.Nck1) mit dem C-Terminus von Nephrin als Negativkontrolle (*control*). Die mit 4.1O-204 und Nephrin (Aminosäuren 1086-1242) transfizierten Zellen wurden entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Das Kulturmedium der Negativkontrolle enthielt 25 mM Glukose. Nach der Zellyse wurden die Proben mit Protein G präzipitiert.

(A) In der Immunfärbung wurden die Proteinpräzipitate (*P protein G* = Pulldown mit Protein G) und Lysate (*lysate*) gegen *FLAG* gefärbt (F = *FLAG-Tag*). Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Zur Bestimmung der Interaktion von des C-Terminus von Nephrin und 4.1O-204 bei unterschiedlichen Glukosebedingungen wurden alle Proteinbanden densitometrisch ausgewertet und die arithmetischen Mittelwerte für die statistische Analyse verwendet. Dargestellt ist das Ergebnis der statistischen Analyse von sieben unabhängigen Versuchen mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken (normiert auf *low glucose*; n = 7 pro Datenpunkt; * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,01, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Es wurde eine statistisch signifikante Interaktion von 204 und dem Nephrin C-Terminus im Vergleich zur Negativkontrolle (*control*) nachgewiesen.

3.2.4 4.1O-202 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin

Für die 4.1O-Varianten 207, 201 und 204 konnte eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne von Nephrin nachgewiesen werden. Weil sich die Variante 4.1O-202 am stärksten von den vier in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten 4.1O-Spleißvarianten unterscheidet, sollte nun untersucht werden, ob auch 4.1O-202 mit dem C-Terminus von Nephrin (AS 1086-1242) interagiert. Wie bei den anderen 4.1O-Varianten wurde auch hier der Einfluss von Glukose untersucht. HEK293T-Zellen mit 4.1O-202 und dem Nephrin C-Terminus oder mit Nck1 und dem Nephrin C-Terminus als Negativkontrolle transfiziert. Anschließend wurden sie wie bei *low glucose*-, *high glucose*- oder hyperosmolaren Bedingungen mit Mannitol kultiviert. Wie bei den drei

anderen 4.1O-Varianten wurden Co-Immünpräzipitationen durchgeführt und in der Immunfärbung gegen *FLAG* gefärbt (Abb.14A). Es wurden insgesamt sieben unabhängige Versuche für die statistische Analyse verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse ergaben, dass 4.1O-202 mit dem C-Terminus von Nephrin im Vergleich zur Negativkontrolle interagiert (Abb. 14B). Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede dieser Interaktion bei unterschiedlichen Glukosebedingungen festgestellt werden (hier nicht dargestellt).

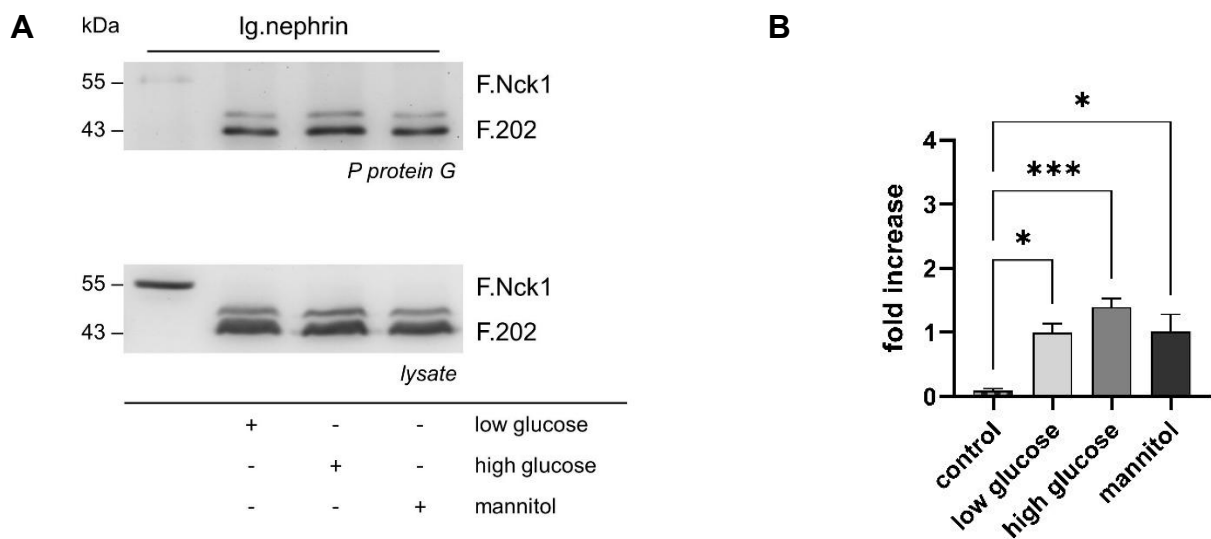


Abb. 14: 4.1O-202 interagiert mit dem C-Terminus von Nephrin in HEK293T-Zellen. Diese Interaktion wird nicht durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst.

Die HEK293T-Zellen exprimierten entweder *FLAG*-markiertes Protein 4.1O-202 (F.202) oder Nck1 (F.Nck1) als Negativkontrolle mit dem C-Terminus von Nephrin (Ig.nephrin). Die mit 202 und Nephrin (Aminosäuren 1086-1242) transfizierten Zellen wurden entweder bei *low glucose*- (5,5 mM Glukose), *high glucose*- (25 mM Glukose) oder hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) kultiviert. Das Kulturmedium der Negativkontrolle enthielt 25 mM Glukose. Nach der Zellyse wurden die Proben mit Protein G präzipitiert.

(A) In der Immunfärbung wurden die Proteinpräzipitate (*P protein G* = Pulldown mit Protein G) und Lysate (*lysate*) gegen *FLAG* gefärbt (F = *FLAG-Tag*). Die molekulare Masse ist in Kilodalton (kDa) angegeben.

(B) Um die Interaktion von 4.1O-202 und dem C-Terminus von Nephrin nachzuweisen, wurde für alle Proteinbanden eine Densitometrie durchgeführt und die arithmetischen Mittelwerte der gemessenen Daten für die statistische Analyse verwendet. Dargestellt ist das Ergebnis der statistischen Analyse von acht unabhängigen Versuchen mit dem Standardfehler des Mittelwertes als Fehlerbalken (normiert auf *low glucose*; n = 8 pro Datenpunkt; * = p ≤ 0,05; *** = p ≤ 0,001, berechnet mit dem Kruskal-Wallis-Test). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Interaktion von 4.1O-202 und dem Nephrin C-Terminus im Vergleich zur Negativkontrolle (*control*).

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten eine Modulation des Hippo-Signalweges durch das Protein 4.1O bzw. seine Spleißvarianten in Abhängigkeit von Glukose nachweisen. Es wurde gezeigt, dass die Expression der beiden Protein 4.1O-Varianten 207 und 201 den Hippo-Signalweg Glukose-abhängig beeinflussen. Ihre Expression führte bei *high glucose* (HG)-Bedingungen (25 mM Glukose) kultivierten HEK293T-Zellen zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Phosphorylierung des *Yes-associated protein* (YAP). Bei den 4.1O-Varianten 204 und 202 hingegen war kein Effekt auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Glukose zu beobachten. Unter der Expression einer 207-Mutante (4.1O-207 ohne *Coiled-coil*-Domäne und ohne FERM [*Four-point-one*, Ezrin, Radixin, Moesin]-Domäne) kam es interessanterweise zu einer Steigerung der YAP-Phosphorylierung sowohl bei den HG- als auch bei den hyperosmolaren Bedingungen (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol).

Mittels Co-Immunpräzipitationsversuchen konnte für die vier 4.1O-Varianten 207, 201, 204 und 202 eine Interaktion mit der zytoplasmatischen Domäne des Schlitzmembranproteins Nephtrin nachgewiesen werden. Verschiedene Glukosekonzentrationen hatten bei allen vier 4.1O-Spleißvarianten keinen Einfluss auf diese Interaktion im Sinne einer Abschwächung oder Steigerung bei HG- oder hyperosmolaren Bedingungen.

4.2 Diskussion der Methodik und Ergebnisse der Versuche zum Hippo-Signalweg

4.2.1 Diskussion der Methodik der Versuche zum Hippo-Signalweg

Hintergrund der Versuche zum Hippo-Signalweg war die Beobachtung, dass in Untersuchungen an Mäusen und Patienten mit einer diabetischen Nephropathie (DN) die YAP-Aktivität und -Expression gesteigert waren (130, 151). Dies war mit einem ungünstigen Einfluss auf klinische Parameter wie den systolischen Blutdruck, das Serumkreatinin und die Progression des DN-Stadiums (152) sowie den histomorphologischen Kennzeichen der mesangialen Expansion und interstitiellen Fibrose assoziiert (130, 151). Auch wurde eine vermehrte Expression der YAP-Zielgene *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF) und *Amphiregulin* (AREG) unter HG- oder diabetischen Bedingungen beschrieben (129, 204–206). Diese scheinen an der mesangialen Expansion und interstitiellen Fibrose im Rahmen der DN beteiligt zu sein (130, 151).

Demnach scheint, der Hippo-Signalweg bzw. einer seiner zentralen Effektoren YAP zur Pathogenese und eventuell zur Progression der DN beizutragen. Wie genau der Hippo-Signalweg im Kontext der DN reguliert wird und es zu einer gesteigerten YAP-Aktivität kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Bisher konnte eine Verknüpfung zum EGFR-PI3K-AKT- (129, 130, 151) und RhoA-ROCK-Signalweg (151, 153–155) hergestellt werden, wie in Abschnitt 1.3.3 ausführlich beschrieben wurde.

Demgegenüber wurden dem Protein 4.1O bzw. dem FRMD3-Gen ebenfalls Eigenschaften als Tumorsuppressorgen sowie als Kandidatengen für die DN zugeschrieben. Daher wurde in den Versuchen dieser Arbeit gezielt untersucht, ob die Expression der Protein 4.1O-Varianten einen Glukose-abhängigen Effekt auf die YAP-Phosphorylierung und damit dessen Inaktivierung hat.

Um diese Frage zu beantworten, wurden HEK293T-Zellen mit Protein 4.1O-207, -201, -204, -202 oder einer 207-Mutante ohne FERM- und ohne *Coiled-coil*-Domäne transfiziert und Ganzzelllysate hergestellt. Diese wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Western Blot (WB) wurde in der Immunfärbung gegen P-YAP Ser397 (am Serinrest 397 phosphoryliertes YAP) gefärbt. Die Wahl des Antikörpers, der spezifisch an Serin 397 phosphoryliertes YAP bindet, ist deshalb günstig, weil dieser Serinrest spezifisch von den Kinasen LATS1/2 des Hippo-Signalweges phosphoryliert wird (138, 202). Daraus kann gefolgert werden, dass eine durch die Densitometrien nachgewiesene Steigerung der YAP-Phosphorylierung an diesem Serinrest spezifisch in den Kontext des Hippo-Signalweges eingeordnet und als Aktivität der Kinasen LATS1/2 gewertet werden kann. Einflüsse durch andere Kinasen, die andere Motive oder Aminosäurereste von YAP phosphorylieren oder anderweitig modifizieren (207, 208), können somit weitgehend als Ursache der YAP-Phosphorylierung an Ser397 ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Vorteil des gewählten Ansatzes ist die Gegenüberstellung der YAP-Phosphorylierung unter Expression der Protein 4.1O-Varianten bei *low glucose* (5,5 mM Glukose)-, *high glucose* (25 mM Glukose)- und hyperosmolaren (5,5 mM Glukose und 19,5 mM D-Mannitol) Bedingungen. Dadurch wird nicht nur die Auswirkung von Glukose allein geprüft, sondern auch, ob ein Glukose-abhängiger Effekt durch den Unterschied in der Osmolarität bedingt sein kann.

Zuletzt stellt der Nachweis phosphorylierter Proteine durch spezifische Antikörper an WB-Membranen eine bewährte Methode dar. Diese wurde bereits von anderen Forschungsgruppen zum Nachweis der Phosphorylierung bzw. Inaktivierung von YAP als

Methode gewählt (113, 138). Zusätzlich erlauben die im Anschluss an die Antikörperfärbung durchgeführten Densitometrien eine quantitative und statistische Auswertung der Proteinphosphorylierung.

Interessanterweise zeigte sich bei Transfektion des Leervektors für die Versuchsansätze mit den Protein 4.1O-Varianten 207 (Abb. 6), 201 (Abb. 7), 202 (Abb. 9) und der 207-Mutante (Abb. 10) ein Anstieg der YAP-Phosphorylierung unter HG-Bedingungen. Für 4.1O-202 und die 207-Mutante war dies nicht, bei 4.1O-207 und -201 jedoch statistisch signifikant unterschiedlich (Abb. 6B und 7B).

Eine Erklärung könnte sein, dass der vermeintliche Einfluss des leeren Vektors auf die YAP-Phosphorylierung bei den HG-Bedingungen auf eine erhöhte Zellzahl zurückzuführen war. Verschiedene Forschungsgruppen zeigten, dass die Phosphorylierung von YAP durch die Zelldichte von Zellkulturen beeinflusst wird. Je höher die Zelldichte war, desto höher war die YAP-Phosphorylierung (113, 209). Allerdings fanden Zhao *et al.* (138) bei hoher Zelldichte zwar eine erhöhte YAP-Phosphorylierung an Serin 127, aber eine verringerte YAP-Phosphorylierung an Serin 381. Wie in den Methoden (Abschnitt 2.2.2) bereits erläutert wurde, entspricht der Serinrest 381 dem Serinrest 397 der ersten YAP-Isoform (202), dessen Phosphorylierung in den durchgeführten Versuchen mittels Antikörperfärbung nachgewiesen wurde. Vor der Zellernte wurde keine Zellzählung durchgeführt, bei Zellaussaat wurde die gleiche Zellzahl verwendet. Die mit dem leeren Vektor transfizierten und unter HG-Bedingungen kultivierten Zellschalen wiesen vor der Zellernte jedoch eine höhere Dichte als die mit der Protein 4.1O-Variante transfizierten Zellschalen auf. Dies ließe sich durch die Tatsache erklären, dass alle verwendeten 4.1O-Varianten in unterschiedlichem Maße den regulierten Zelltod der HEK293T-Zellen induzieren (210) und daher die Zelldichte der mit der 4.1O-Variante transfizierten Zellkultur nach der Transfektion gegenüber der mit dem leeren Vektor (cdm8) transfizierten Zellkultur reduzierten.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die unter HG-Bedingungen gesteigerte YAP-Phosphorylierung bei den Kontrollen ist, dass die YAP-Phosphorylierung eine sehr sensible Messgröße ist. Sie wird nicht nur durch die Zelldichte einer Zellkultur, sondern beispielsweise auch durch zellulären Energiestress (150) und Serumentzug (148) sowie durch metabolische Einflüsse (211) und osmotischen Stress beeinflusst (149, 212). Daher ist es schwierig, den isolierten Einfluss einer bestimmten Einwirkung auf die YAP-Phosphorylierung nachzuweisen, wenn andere beeinflussende Faktoren nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Umso wichtiger ist es zu überprüfen, ob die erzielten Ergebnisse in anderen Zelllinien oder Organismen sowie unter verschiedenen Bedingungen repliziert werden können.

Bei nachfolgenden Versuchen könnten zum Beispiel stabil transduzierte, induzierbare Zelllinien verwendet werden, um die Zelldichte-abhängige YAP-Phosphorylierung als mögliche Ursache für den nachgewiesenen Effekt bei den Kontrollen zu minimieren.

Wie in Abschnitt 1.3.2 dargestellt, besteht der Hippo-Signalweg aus einer Reihe von verschiedenen Proteinen, wobei YAP einer der beiden zentralen Effektoren dieses Signalweges ist. In den durchgeführten Versuchen wurde allein der Effekt der Genexpression der Protein 4.1O-Spleißvarianten auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Glukose und der Osmolarität untersucht. Daher könnte man hinterfragen, ob die Untersuchung einer einzigen Komponente des Hippo-Signalweges ausreicht, um weitreichendere Schlussfolgerungen zu ziehen, ob die verwendeten 4.1O-Spleißvarianten den gesamten Signalweg beeinflussen. Aufgrund dessen könnten in folgenden Versuchen weitere Komponenten des Hippo-Signalweges und deren Modulation durch das Protein 4.1O untersucht werden.

Um den Einfluss der Protein 4.1O-Varianten auf den Hippo-Signalweg in Abhängigkeit von Glukose zu untersuchen, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die HEK293T-Zellen nach der Transfektion in drei unterschiedlichen Medien kultiviert wurden (siehe Abschnitt 2.2.1). Die *low glucose*-Bedingungen wurden als Äquivalent für normoglykämische Bedingungen gewählt, wobei 5 mM Glukose 90 mg/dl entsprechen. Die HG-Bedingungen mit 25 mM Glukose entsprechen dabei einer Hyperglykämie mit einem Blutzucker von 450 mg/dl. Die hyperosmolaren Bedingungen sollten einen möglichen Glukose-Effekt, der auf der höheren Osmolarität beruht, detektieren. Um mögliche Rückschlüsse zwischen dem Hippo-Signalweg und dem Protein 4.1O im Rahmen der diabetischen Nephropathie zu ziehen, eignet sich dieser Versuchsaufbau nur begrenzt, da hierbei lediglich ein Aspekt der DN untersucht wird. Die DN ist jedoch nicht nur durch die mit Diabetes einhergehende Hyperglykämie geprägt. Sie ist darüber hinaus mit einer erhöhten Aktivität inflammatorischer Prozesse (1), einem gestörten Lipidstoffwechsel (213) und im Anfangsstadium mit einer glomerulären Hyperfiltration infolge eines erhöhten hydrostatischen Drucks in den Glomerulumkapillaren (1, 18) vergesellschaftet. Bei der Interpretation der Ergebnisse und daraus gezogenen Schlussfolgerungen in Bezug auf die bei der DN vorherrschenden Bedingungen sollte dies in jedem Fall berücksichtigt werden.

Des Weiteren wurde der Einfluss der Expression der genannten 4.1O-Varianten auf die YAP-Phosphorylierung in Abhängigkeit von Glukose in den dargelegten Experimenten nur in HEK293T-Zellen untersucht. Daher muss geprüft werden, ob die gleichen Ergebnisse auch in anderen Zelllinien, in ganzen Organen und im Tiermodell

gezeigt werden können. Die Übertragung der Ergebnisse bzw. ihre Überprüfung im menschlichen Organismus ist nicht möglich, da die Expression einer bestimmten Spleißvariante nicht simuliert werden kann.

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, ist Serin 381 bzw. 397 nicht der einzige Serinrest, der durch die LATS-Kinasen phosphoryliert wird. Deshalb wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression von 4.1O-207, -201 oder der 207-Mutante den gleichen Glukose-abhängigen Effekt auf die YAP-Phosphorylierung an Serin 127 hat oder die 4.1O-Varianten eventuell spezifisch die YAP-Phosphorylierung an Serin 381 bzw. 397 in Abhängigkeit von Glukose fördern. Dies könnte Gegenstand zukünftiger Forschung zur Klärung des zugrundeliegenden Mechanismus der Steigerung der YAP-Phosphorylierung unter Expression von Protein 4.1O-Spleißvarianten sein.

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse zum Hippo-Signalweg

Verschiedene Forschungsgruppen beschrieben unter HG- bzw. diabetischen Bedingungen eine gesteigerte Aktivität eines der beiden zentralen Effektorproteine des Hippo-Signalweges, dem *Yes-associated protein* (YAP), und damit einhergehend eine gesteigerte Expression seiner Zielgene (129, 130, 151). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression der Protein 4.1O-Varianten 207 und 201 unter HG-Bedingungen zu einer gesteigerten YAP-Phosphorylierung an Serin 397 führte. Laut den erzielten Ergebnissen würden 4.1O-207 und -201 unter HG-Bedingungen und damit potenziell im Kontext der DN den Mechanismen, die zu einer gesteigerten YAP-Aktivität führen, entgegenwirken. Die YAP-Phosphorylierung an Serin 397 geht mit einer Inaktivierung von YAP einher (138, 202) und die Expression der YAP-Zielgene würde dementsprechend durch 4.1O-207 und -201 unter HG-Bedingungen verringert werden. Das heißt, die beiden 4.1O-Varianten könnten in diesem Zusammenhang eine protektive Funktion ausüben, da mit einer gesteigerten YAP-Aktivität negative Folgen wie eine gesteigerte mesangiale Expansion und tubulointerstitielle Fibrose assoziiert wurden (130, 151).

Dies passt zu der Beobachtung von Martini *et al.* (199), dass eine verminderte Genexpression des FRMD3-Gens bei Typ-2-Diabetikern mit einer Steigerung einer vorhandenen Albuminurie und der mesangialen Fläche assoziiert wurde und damit negative Konsequenzen zur Folge hatte.

Während in den Untersuchungen von Martini *et al.* (199) eine verringerte Genexpression des FRMD3-Gens in höheren DN-Stadien nachgewiesen wurde, zeigte die eigene Arbeitsgruppe in Versuchen mit Proteinfärbungen hingegen eine gesteigerte FRMD3-

Expression unabhängig vom CKD-Stadium.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Forschungsgruppe um Martini und der eigenen Arbeitsgruppe könnten darin begründet sein, dass Martini *et al.* (199) die Expression von FRMD3 auf mRNA-Ebene untersuchten, während die eigene Arbeitsgruppe mittels Proteinfärbungen die letztendliche Proteinexpression detektiert hat. Bereits Buffon *et al.* (185) beschrieben eine negative Korrelation zwischen der Protein- und der Genexpression des FRMD3-Gens und folgerten, dass die Expression des FRMD3-Gens auf mRNA-Ebene nicht zwangsläufig der Proteinexpression entspricht und dieses Phänomen möglicherweise durch bestimmte Regulationsmechanismen auf Translationsebene bedingt sein kann. Dies könnte zu der scheinbar widersprüchlichen Datenlage führen, dass die FRMD3-Expression bei der DN auf mRNA-Ebene reduziert und auf Proteinebene gesteigert ist.

Weiterhin sollte hierbei berücksichtigt werden, dass bei den Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe nur eine kleine Stichprobengröße mit $n = 3$ vorlag, wohingegen bei Martini *et al.* (199) 22 Personen mit normaler eGFR und 7 Personen im CKD-Stadium 3 verglichen wurden. Untersuchungen mit größeren Stichproben wären demnach sinnvoll, um die erbrachten Daten zu bestätigen.

Während die Proteinfärbungen der eigenen Arbeitsgruppe an Glomeruli im CKD-Stadium 3b bis 5 durchgeführt wurden, wurden Personen in den CKD-Stadien 4 und 5 bei Martini *et al.* (199) nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wären künftige Untersuchungen hilfreich, die sich nochmals mit der Proteinexpression des FRMD3-Gens in unterschiedlichen CKD-Stadien als auch mit der FRMD3-Expression auf mRNA-Ebene in den CKD-Stadien 4 und 5 befassen.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse passen ferner dazu, dass Veränderungen in der Promotorregion und im Bereich der 5'-untranslatierten Region des FRMD3-Gens für eine DN prädisponieren und das Protein 4.1O als FRMD3-Genprodukt für die Entwicklung einer DN eine Rolle zu spielen scheint (184). Eine gesteigerte FRMD3-Expression bei der DN könnte in diesem Sinne als Kompensationsmechanismus zu werten sein, wenn 4.1O-207 und -201 die YAP-Aktivität verringern. Jedoch reicht dies nicht aus, um die Klinik und damit insbesondere die Albuminurie zu verbessern, da im Rahmen der diabetes- oder HG-bedingten Aktivierung des Hippo-Signalweges zumindest nach aktueller Datenlage hauptsächlich die tubulointerstitielle Fibrose und die mesangiale Expansion adressiert werden (130, 151). Eine Unterdrückung dieser histologischen Phänomene könnte allenfalls die Progression zum Nierenversagen verhindern oder verzögern. Diese Hypothese wird durch die Daten von Pezzolesi *et al.* (196) ge-

stützt, die eine statistisch signifikante Assoziation zwischen einem Einzelnukleotid-Polymorphismus innerhalb des FRMD3-Gens und dem Risiko einer ausgeprägten Mikroalbuminurie, Proteinurie und eines Nierenversagens bei Diabetikern darlegen. Während Pezzolesi *et al.* (196) eine besondere Bedeutung des FRMD3-Gens für die frühen DN-Stadien schlussfolgern, legen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch einen möglichen Einfluss auf fortgeschrittene DN-Stadien nahe, der über den Hippo-Signalweg vermittelt werden könnte.

Demzufolge sind die erzeugten Ergebnisse bedeutsam, weil eine weitere funktionelle Verknüpfung des Proteins 4.1O und der DN bei bekannter genetischer Prädisposition durch Veränderungen im FRMD3-Gen hergestellt werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung des FRMD3-Genprodukts für die Pathogenese der DN.

Bisher gibt es keine veröffentlichten Daten zu einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Hippo-Signalweg und dem Protein 4.1O und seinen Spleißvarianten im Kontext der DN. Allerdings belegen zahlreiche Studien sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch im Menschen einen Einfluss von anderen FERM-Domänen-enthaltenen Proteinen auf die Aktivität der Kinasen des Hippo-Signalweges (113, 142, 214). Eines dieser Proteine ist Merlin, das durch das *Neurofibromatosis-Type-2*-Gen kodiert wird (215). Es besteht aus einer konservierten N-terminalen FERM-Domäne, einer zentralen α -helikalen Region und einem C-terminalen Ende (215). Untersuchungen zeigen, dass Merlin über verschiedene Mechanismen die Aktivität des Hippo-Signalweges beeinflussen kann (142, 214, 216). Dies hält mögliche Erklärungsansätze für den Einfluss von 4.1O-207 und -201 auf die YAP-Phosphorylierung bereit. Im Bereich von Zell-Zell-Kontakten kann Merlin die Assemblierung der zugehörigen Proteingerüste fördern, die eine Aktivierung von LATS und Phosphorylierung von YAP erlauben (142, 143, 216, 217). Ferner kann Merlin in *Drosophila* und Säugetierzellen direkt an LATS binden und es an die Zellmembran rekrutieren, wo LATS synergistisch durch den MST/SAV1-Kinasekomplex aktiviert wird (216). Schließlich interagiert in *Drosophila* das Merlin-Ortholog Mer über seine N-terminale Hälfte mit dem FERM-Bindungsmotiv des Regulatorproteins Sav und führt zur Phosphorylierung von Sav (142). Darüber könnte ebenfalls eine Aktivierung der Hippo-Kinasenkaskade vermittelt werden. Eine weitere Parallele zwischen Merlin und dem Protein 4.1O ist, dass nicht nur Merlin als Tumorsuppressor gilt (218–221), sondern wahrscheinlich auch das FRMD3-Genprodukt als Tumorsuppressor für Tumorerkrankungen wie nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (210), Mammakarzinome (222) und Prostatakarzinome (223) fungiert.

Analog zu Merlin könnten die Protein 4.1O-Varianten ähnliche Mechanismen wie Merlin nutzen, um die Aktivität des Hippo-Signalweges und damit die YAP-Phosphorylierung zu steigern. Da das Protein 4.1O wie Merlin zur 4.1 Superproteinfamilie gehört und es daher über eine FERM-Domäne verfügt (160, 192, 224), könnten seine Spleißvarianten wie Merlin über die FERM-Domäne mit dem Regulatorprotein SAV1 interagieren. Außerdem sind die 4.1O-Varianten aller Wahrscheinlichkeit nach wie Merlin (142, 225) im Bereich der Zellmembran lokalisiert, da sie wie die anderen 4.1 Proteine als Adapterproteine zwischen Membranrezeptoren und dem Zytoskelett vermitteln (187, 189). Diese Lokalisation legen ebenfalls bisher unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe von Frau Dr. med. Eva Königshausen nahe.

Allerdings kann damit nicht erklärt werden, wieso die 4.1O-Varianten 204 und 202 nicht den gleichen Glukose-abhängigen Einfluss wie 4.1O-207 und -201 auf die YAP-Phosphorylierung haben. Es ist jedoch plausibel, dass die verschiedenen 4.1O-Varianten unterschiedliche Funktionen haben, da dies auch für die anderen 4.1 Proteine und deren Isoformen beschrieben wurde. Die Transkripte der 4.1 Proteine werden alternativ gespleißt (163, 164, 169, 170, 180). Dies impliziert unter anderem ein zell- und gewebespezifisches Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen des jeweiligen 4.1 Proteins und kann zudem mit einer Funktionsänderung einhergehen (226–230). Dazu passt, dass sich 4.1O-204 und -202 in ihrer C-terminalen Domäne (CTD) von den Varianten 207 und 201 unterscheiden (siehe Abb. 5). Während 207 und 201 über eine „vollständige“ CTD verfügen, ist die CTD von 204 und 202 dagegen verkürzt. Demzufolge könnte die CTD bei der Glukose-abhängigen Beeinflussung des Hippo-Signalweges durch die 4.1O-Varianten 207 und 201 eine entscheidende Rolle spielen. Dafür spricht, dass die CTD für die 4.1 Proteine spezifisch und daher vermutlich wichtig ist (226).

Es muss jedoch geklärt werden, wie die CTD konkret an der Glukose-abhängigen Steigerung der YAP-Phosphorylierung durch 4.1O-207 und -201 beteiligt sein könnte. Die CTD ist bei den anderen 4.1 Proteinen häufig mit der Bindung von Membranrezeptoren assoziiert (227, 229–232). Insbesondere das Protein 4.1N interagiert über seine CTD mit diversen Membranrezeptoren wie D2- und D3-Dopaminrezeptoren (232), dem α 7-Acetylcholinrezeptor (231), der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors (233) und dem Typ-1-Inositol-(1,4,5)-Triphosphat-Rezeptor (227, 234). Über diese Interaktion fördert es die Oberflächenexpression, eine bestimmte Lokalisation dieser Rezeptoren oder deren Verknüpfung mit dem (Aktin-)Zytoskelett und trägt damit zur normalen Zellfunktion, Signaltransduktion und Membranstabilität der jeweiligen Zelltypen bei (227, 231, 232, 234, 235). Zudem können die 4.1 Proteine über ihre CTD auch die den

Membranrezeptoren nachgeschalteten Signalwege bzw. die Funktionen der interagierenden Rezeptoren beeinflussen (229, 236–238). Ebenso können sie die Assemblierung bestimmter Signaltransduktionskomplexe im Bereich der Zellmembran fördern, die wiederum für die nachfolgende Signaltransduktion wichtig ist (230, 237, 239). Besonders diese Funktion könnte im Kontext des Hippo-Signalweges bedeutsam sein, da das Zusammenbringen bzw. die Interaktion der beteiligten Kinasen und Regulatorproteine für die Aktivität des Signalweges wichtig ist. Demnach wäre es möglich, dass 4.1O-207 und -201 über ihre CTD die Interaktion der beteiligten Proteine fördern und auf diese Weise die Aktivität des Hippo-Signalweges steigern.

Eine andere Möglichkeit ist, dass 4.1O-207 und -201 den Hippo-Signalweg über die Interaktion mit bestimmten Membranrezeptoren beeinflussen. Wie bereits erwähnt, scheint der EGFR-PI3K-AKT-Signalweg unter diabetischen Bedingungen aktiviert zu sein, die Aktivität des Hippo-Signalweges durch Inhibition seiner Kinasen zu hemmen und damit die YAP-Aktivität mit den damit verbundenen Folgen zu steigern (129, 130). Die 4.1O-Varianten 207 und 201 könnten über ihre CTD beispielsweise mit dem membrangebundenen EGFR interagieren und darüber den EGFR-PI3K-AKT-Signalweg hemmen oder zumindest dessen Aktivierung stören. Die Datenlage zu den anderen 4.1 Proteinen in Zusammenhang mit dem EGFR-PI3K-AKT-Signalweg ist zwar spärlich, aber für das Protein 4.1B ist eine Interaktion mit dem EGFR im Kontext von Tumorerkrankungen beschrieben (240). Diese trägt im Falle des Proteins 4.1B zu dessen tumorsupprimierenden Funktion bei (240). Zum einen führt die Bindung des Proteins 4.1B zur einer Hemmung der Dimerisierung und Autophosphorylierung des EGFR, zum anderen scheint die Expression des Proteins 4.1B die Expression des EGFR zu reduzieren (240). Womöglich existieren ähnliche Phänomene zwischen dem EGFR und den 4.1O-Varianten 207 und 201.

Den möglichen Zusammenhang zwischen 4.1O-207 und -201 und dem EGFR-PI3K-AKT-Signalweg unter HG-Bedingungen könnte man untersuchen, indem man den Expressionseinfluss der Protein 4.1O-Varianten auf die Stimulation des EGFR durch EGF in Abhängigkeit von Glukose bestimmt und anschließend die YAP-Phosphorylierung quantifiziert. Entsprechend der aufgestellten Vermutungen wäre eine Glukose-abhängige Hemmung des Signalweges und damit eine Reduktion der EGFR-Stimulation unter Expression der 4.1O-Varianten zu erwarten, die zugleich mit einer Erhöhung der YAP-Phosphorylierung einhergeht.

Über eine CTD-vermittelte Interaktion mit dem EGFR könnten 4.1O-207 und -201 auch mit dem RhoA-ROCK-Signalweg in Verbindung stehen und darüber Einfluss auf den Hippo-Signalweg nehmen. Unter HG- bzw. diabetischen Bedingungen ist die Aktivität

von RhoA (151, 153, 154) und ROCK (153, 155) gesteigert und mit einer erhöhten YAP- und CTGF-Expression assoziiert (151). Inhibitionsversuche belegen außerdem einen direkten Zusammenhang zwischen der gesteigerten RhoA- und ROCK-Aktivität und der gesteigerten YAP-Aktivität, da eine Hemmung von RhoA oder ROCK zu einer Inhibition der HG-bedingten Hochregulation der YAP- und CTGF-Expression und nukleären Translokation von YAP führt (151). Weiterhin legen die Forschungsergebnisse von Chen *et al.* (151) nahe, dass die gesteigerte YAP-Aktivität unter HG-Bedingungen durch eine wechselseitige Interaktion zwischen den EGFR-PI3K-AKT- und RhoA-ROCK-Signalwegen bedingt sein könnte. Sie lassen schlussfolgern, dass der RhoA-ROCK-Signalweg unter HG-Bedingungen durch einen EGFR-abhängigen Signalweg aktiviert wird und RhoA und ROCK daraufhin die AKT-Phosphorylierung vermitteln. Ferner scheint die Aktivierung des RhoA-ROCK-Signalweges essenziell für die Vermittlung der nukleären Translokation von YAP sowie für die Induktion der AKT- und YAP-Genexpression durch die EGFR-Aktivierung in Säugetierzellen zu sein (151). Möglicherweise können 4.1O-207 und -201 über ihre CTD diesen Mechanismus unter HG-Bedingungen unterbinden und dadurch die YAP-Phosphorylierung und damit dessen Inaktivierung begünstigen.

Unabhängig vom EGFR-PI3K-AKT-Signalweg könnten der RhoA-ROCK-Signalweg und die Protein 4.1O-Varianten über das Aktin-Zytoskelett in Verbindung stehen. Während der RhoA-ROCK-Signalweg in der Bildung von Aktin-Stressfasern resultiert (241, 242), interagieren die 4.1 Proteine über ihre Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne mit Aktin (167, 179) und verknüpfen Membranrezeptoren mit dem Zytoskelett (165).

Darüber hinaus gibt es derzeit keine veröffentlichten Daten zu einer direkten Interaktion der 4.1 Proteine und dem RhoA-ROCK-Signalweg. Allerdings ist interessant, dass die Rho-GTPase für ihre Aktivierung im Bereich der Zellmembran lokalisiert sein muss (241) und auch die 4.1 Proteine (165) sowie das Protein 4.1O dort lokalisiert sind (unveröffentlichte Daten von Frau Dr. med. Eva Königshausen). Untersuchungen zeigen, dass HG-Bedingungen zu einer Zunahme des membrangebundenen und damit biologisch aktiven Anteils der Rho-GTPase führen (243). Eventuell könnten die 4.1O-Varianten 207 und 201 die Membranbindung der Rho-GTPase stören, dadurch deren Aktivität reduzieren und infolgedessen die YAP-Aktivität verringern. Es gilt zu prüfen, ob die genannten 4.1O-Varianten tatsächlich die Aktivität des RhoA-ROCK-Signalweges beeinflussen und ob in der Folge darüber die Beeinflussung des Hippo-Signalweges unter HG-Bedingungen vermittelt werden könnte. Mittels RhoA-Aktivierungsassays von ko-transfizierten HEK293T-Zellen könnte überprüft werden, ob die Expression von

4.1O-207 oder -201 den Anteil der GTP-gebundenen RhoA in Abhängigkeit von Glukose beeinflusst. Zusätzlich könnte man den Expressionseinfluss der 4.1O-Varianten auf die ROCK-Aktivität messen. Dazu könnte zum Beispiel in Ko-Transfektionsversuchen der Anteil der spezifisch durch die ROCK phosphorylierten *Myosin-Phosphatase Target Subunit 1* (MYPT1) an Threonin 853 unter Expression der jeweiligen 4.1O-Variante bestimmt und dieser dann zur gesamten MYPT1-Menge in Relation gesetzt werden.

Um die Frage zu klären, ob bei der Glukose-abhängigen Steigerung der YAP-Phosphorylierung die CTD tatsächlich die entscheidende Rolle spielt, ist zunächst die Betrachtung der Versuchsreihe zur Expression der 207-Mutante ohne FERM- und *Coiled-coil*-Domäne der CTD hilfreich (Abb. 10). Aus den Versuchen kann abgeleitet werden, dass die *Coiled-coil*-Domäne der CTD nicht relevant zu sein scheint, da unter Expression der 207-Mutante eine Glukose-abhängige Steigerung der YAP-Phosphorylierung beobachtet wurde. Interessanterweise zeigte sich hier sowohl bei den *high glucose*-als auch bei den hyperosmolaren Bedingungen eine Zunahme der YAP-Phosphorylierung. Dies deutet auf einen Glukose-Effekt hin, der auf der glukosebedingt gesteigerten Osmolarität beruht. Da die 207-Mutante über keine FERM-Domäne verfügt, kann außerdem von einem Mechanismus ausgegangen werden, der von der FERM-Domäne unabhängig ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass bei der Glukose-abhängigen Beeinflussung des Hippo-Signalweges vermutlich der C-terminal der *Coiled-coil*-Domäne liegende Anteil der CTD ausschlaggebend ist. Zur weiteren Klärung dieser Frage wären gleichartige Versuche mit verschiedenen Trunkierungen von 4.1O-207 und -201 hilfreich. Diese könnten auch dazu beitragen, die hierbei relevante Aminosäuresequenz bzw. den entsprechenden Domänenabschnitt zu identifizieren.

Zusammenfassend führte die Expression von 4.1O-207, -201 oder der 207-Mutante zu einer gesteigerten YAP-Phosphorylierung unter HG-Bedingungen. Daher könnten diese Protein 4.1O-Varianten im Rahmen der DN eine protektive Funktion ausüben, indem sie die pathologisch gesteigerte YAP-Aktivität und die damit einhergehende mesangiale Expansion und tubulointerstitielle Fibrose reduzieren. Dass nur die 4.1O-Varianten 207 und 201 diesen Effekt auf die YAP-Phosphorylierung haben, könnte daran liegen, dass nur sie über eine vollständige CTD verfügen. Diese könnte eine Interaktion mit Membranrezeptoren vermitteln und möglicherweise eine Verbindung zum EGFR-PI3K-AKT- oder RhoA-ROCK-Signalweg herstellen, deren Aktivität unter diabetischen Bedingungen ebenfalls gesteigert ist (129, 130, 151, 153). Die durchgeführten Versuche unterstützen in jedem Fall den beobachteten Zusammenhang zwischen

dem FRMD3-Genprodukt und der Entwicklung einer DN (184, 185, 199). Es bleibt zu untersuchen, wie genau der Hippo-Signalweg und auch die anderen beiden Signalwege dabei involviert sind.

4.3 Diskussion der Methodik und Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin

4.3.1 Diskussion der Methodik der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin

Die Funktionen der Spleißvarianten des Proteins 4.1O in der Niere sowie ihre Rolle bei der DN sind noch weitgehend ungeklärt. Da Kramer-Zucker *et al.* (186) zeigen konnten, dass das Protein 4.1O wahrscheinlich eine wichtige Rolle für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran spielt, wurde untersucht, ob die in der Niere exprimierten Protein 4.1O-Spleißvarianten 207, 201, 204 und 202 mit dem zentralen Schlitzmembranprotein Nephrin interagieren.

Die Bedeutung von Nephrin für die glomeruläre Schlitzmembran zeigt sich eindrücklich bei Patienten mit Mutationen im NPHS1-Gen, welche eine starke Proteinurie, veränderte Filtrationsschlitze und fehlende Schlitzmembranen aufweisen (70, 85). Zudem übt Nephrin im Bereich der glomerulären Schlitzmembran nicht nur eine wichtige strukturelle Funktion aus, sondern fungiert auch als Signalmolekül, das mit Podocin und CD2AP im Bereich der *lipid rafts* lokalisiert ist und von dort Signalwege aktivieren kann (89, 92, 93).

Basierend auf der zuvor beschriebenen Rolle des Proteins 4.1O als Kandidatengen für die Entwicklung einer DN wurde zudem geprüft, ob unterschiedliche Glukosekonzentrationen die Interaktion zwischen Nephrin und den Protein 4.1O-Varianten beeinflussen. Dies ist außerdem interessant, weil auch Nephrin bei der DN eine Rolle zu spielen scheint. Diverse Untersuchungen zeigen, dass die Oberflächenexpression von Nephrin durch diabetische oder HG-Bedingungen beeinflusst wird (244–246). Allerdings sind die Daten hierzu widersprüchlich. Die einen beschreiben gesteigerte mRNA-Level von Nephrin bei einem gleichzeitigen Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere in diabetischen Ratten und Mäusen (244), die anderen eine Reduktion der Gen- und Proteinexpression von Nephrin (245). Auch in Menschen mit Diabetes scheint die Genexpression von Nephrin verringert zu sein und konnte mit dem Ausmaß der Proteinurie assoziiert werden (246). Weitere Versuche legen einen Einfluss der Proteinkinase C α nahe, die die Endozytose und damit die Oberflächenexpression von Nephrin beeinflusst (247). Ferner scheinen HG-Bedingungen die Stabilität von Nephrin zu

reduzieren (248). Dies könnte durch eine HG-vermittelte Deacetylierung von Nephrin durch die Histon-Deacetylase 4 bedingt sein, die in der Folge die Ubiquitinierung und Degradation von Nephrin begünstigt (249). All diese Daten suggerieren, dass Nephrin in gewisser Hinsicht durch diabetische Bedingungen beeinflusst wird und durch Verlust an der entstehenden Albuminurie bei der DN beteiligt ist. Daher ist es umso wichtiger zu untersuchen, ob weitere Veränderungen bezüglich Nephrin und seiner Interaktionen unter diabetischen bzw. HG-Bedingungen nachgewiesen werden können.

Um zu untersuchen, ob die Protein 4.1O-Spleißvarianten mit Nephrin interagieren und ob diese Interaktion durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen beeinflusst wird, wurden Co-Immunpräzipitationsversuche durchgeführt. Diese stellen eine bewährte Methode dar und wurden schon von vielen anderen Arbeitsgruppen zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen verwendet (250–252).

Mithilfe des gewählten Versuchsaufbaus (s. Abschnitt 2.2.1 und Abschnitt 2.2.2) konnte für alle untersuchten 4.1O-Varianten eine Interaktion mit dem C-Terminus von Nephrin nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Einfluss durch die unterschiedlichen Glukosebedingungen.

In den Versuchen wurde bewusst die Interaktion zwischen den 4.1O-Varianten und dem C-Terminus von Nephrin untersucht, da in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe bereits eine Interaktion von 4.1O-207 und dem Nephrin C-Terminus nachgewiesen werden konnte (187–189). Außerdem hat der Nephrin C-Terminus eine vergleichbare Lokalisation im Bereich der Zellmembran wie Glycophorin C oder das Zelladhäsionsmolekül CD44, die bekanntermaßen mit dem Protein 4.1R in Erythrozyten interagieren (253, 254). Weiterhin ist der C-Terminus von Nephrin der intrazellulär liegende Anteil (73) und somit am ehesten relevant, wenn eine mögliche Interaktion mit den ebenfalls intrazellulär gelegenen 4.1O-Varianten untersucht werden soll.

Eine interessante Beobachtung ist die unterschiedlich hohe Interaktionsstärke zwischen den Protein 4.1O-Varianten und dem Nephrin C-Terminus. Wenn man die Abbildungen der Western Blots (Abb. 11A, 12A, 13A, 14A) vergleicht, fällt auf, dass die Interaktion zwischen 4.1O-207 und Nephrin am stärksten zu sein scheint. Da man dies anhand mehrerer voneinander unabhängiger Versuchsreihen nicht sicher beurteilen oder beweisen kann, wären Versuche hilfreich, bei denen alle vier 4.1O-Varianten in einem Versuch jeweils in Kombination mit dem Nephrin C-Terminus exprimiert werden. In einem derartigen Versuchsaufbau könnte anschließend mittels Densitometrien und statistischen Analysen die Interaktion der verschiedenen 4.1O-Varianten mit Nephrin verglichen werden.

Wie bei den Versuchen zum Hippo-Signalweg können auch die Ergebnisse zum Nachweis einer Interaktion mit Nephrin nur unzureichend auf die komplexe Erkrankung der diabetischen Nephropathie übertragen werden. Denn auch bei diesen Versuchen wurde mit der Verwendung von HG-Bedingungen nur ein Aspekt der DN berücksichtigt. Die DN kennzeichnet sich daneben durch weitere metabolische Veränderungen wie eine gesteigerte Entzündungsaktivität (1) oder eine häufig bestehende Dyslipidämie (213). Dies führt zu einer eingeschränkten Interpretationsfähigkeit der Ergebnisse im Sinne einer Beeinflussung der Nephrin-4.1O-Spleißvarianten-Interaktion bei DN-Bedingungen. Dennoch stellt dieser Ansatz ein verbreitetes Vorgehen zur Imitation von diabetischen Bedingungen dar und wurde auch von diversen anderen Arbeitsgruppen zu diesem Zweck gewählt (129, 151, 247, 255).

Bisher steht kein adäquates *In-vitro*-Modell des glomerulären Filters zur Verfügung, das sämtliche Eigenschaften des glomerulären Filters aufweist. Lediglich isolierte Glomeruli aus z.B. Mäusen könnten auf eine Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin untersucht werden. Bisher existieren jedoch keine Spleißvarianten-spezifischen Antikörper, sodass nur Experimente an transgenen Tieren weiterführen würden.

Podozytenzelllinien weisen zudem *in vitro* keine ausreichende Expression von Nephrin auf (79, 256), sodass das Modell der HEK293T-Zellen gewählt wurde.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Co-Immunpräzipitationsversuche mit Nephrin

In den dargestellten Versuchen (siehe Abb. 11-14) konnte eine Interaktion zwischen dem C-terminalen, zytoplasmatischen Anteil von Nephrin und den Protein 4.1O-Varianten 207, 201, 204 und 202 nachgewiesen werden. Dies bestätigt die Daten der eigenen Arbeitsgruppe, die eine Interaktion zwischen dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin und den AS 506-553 von 4.1O-207 belegen (187–189). Nun konnte auch für die 4.1O-Varianten 201, 204 und 202 eine Interaktion mit Nephrin gezeigt werden.

Dieses Ergebnis ist mit der Tatsache vereinbar, dass die weiteren Mitglieder der 4.1 Proteinfamilie bekanntlich mit Membranstrukturen assoziiert und meist in der Nähe von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten lokalisiert sind (164, 165, 178, 257). Es kann daher als wahrscheinlich angesehen werden, dass dies auch auf die Spleißvarianten des Proteins 4.1O zutrifft, da nun eine Interaktion mit Nephrin nachgewiesen wurde und Nephrin ebenfalls an diesen Lokalisationen zu finden ist (84, 258). Um die tatsäch-

liche subzelluläre Lokalisation der Protein 4.1O-Varianten zu bestimmen, könnten Versuche mit transienter Transfektion von COS-7-Zellen und anschließender Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden.

Auch weil 4.1 Proteine als Adapterproteine zwischen Membranrezeptoren und dem Zytoskelett gelten (165), überrascht es nicht, dass eine Interaktion zwischen Nephrin und den 4.1O-Varianten nachgewiesen werden konnte. Über Nephrin ist bekannt, dass es über verschiedene Adapterproteine wie Nck1 und Nck2 (91, 92) oder CD2AP (79, 94) mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert und sogar dessen Reorganisation beeinflussen kann (92). Aufgrund der beschriebenen Funktionen der anderen Mitglieder der 4.1 Proteinfamilie erscheint es daher plausibel, dass das Protein 4.1O bzw. seine Spleißvarianten sich in die Reihe dieser Adapterproteine einreihen können.

Die erzielten Ergebnisse passen außerdem dazu, dass die 4.1 Proteine als zytoskelettale Proteine gelten, die die Form und Integrität verschiedener Zelltypen erhalten (166, 168, 239, 257). So könnten die Spleißvarianten des Proteins 4.1O über die Interaktion mit Nephrin die gleiche Funktion in Nierenzellen erfüllen. Denn auch für Nephrin ist beschrieben, dass es für die Integrität von Podozyten wichtig ist (70, 186). Dies steht ferner mit den Beobachtungen von Kramer-Zucker *et al.* (186) in Einklang, dass die Expression des FRMD3-Orthologs im Zebrafisch für die regelrechte Bildung der Schlitzmembran-Zellkontakte erforderlich ist. Das Fehlen oder die homozygote Mutation des FRMD3-Orthologs geht mit fehlenden Schlitzmembranen und einer erhöhten Durchlässigkeit der glomerulären Filtrationsbarriere einher. Möglicherweise könnte hierbei die Interaktion mit Nephrin als zentrales Schlitzmembranprotein eine entscheidende Rolle spielen. Sowohl die Abwesenheit von Nephrin als auch die des FRMD3-Orthologs führt im Zebrafisch zum Verlust der glomerulären Filtrationsdiskriminierung und zur aberranten Passage hochmolekularer Substanzen durch den glomerulären Filter (186). Dabei stellt sich die Frage, ob an dieser Stelle die Nephrin-FRMD3-Ortholog-Interaktion von besonderer Relevanz ist. Dazu wäre es interessant, zu erfahren, wie sich der Phänotyp gestaltet, wenn Nephrin und das FRMD3-Ortholog gleichzeitig defizient sind. Dies könnte im Rahmen von Doppelt-KO-Versuchen an Zebrafischlarven untersucht werden. Dabei sollten der resultierende Phänotyp sowie das Ausmaß der glomerulären Filtration hochmolekularer Substanzen evaluiert werden. Darüber hinaus könnten nachfolgend *Rescue*-Versuche durchgeführt werden mit der Frage, ob eine regelrechte Nephrin- oder FRMD3-Ortholog-Expression allein ausreicht, um den Phänotyp zu retten bzw. abzuschwächen.

Ein wichtiges, zu klärendes Thema bleibt, welche Funktion der Interaktion zwischen Nephrin und den Protein 4.1O-Varianten zukommt. Weiterhin ist zu klären, inwieweit die 4.1O-Varianten *in vivo* mit Nephrin interagieren und ob sie zum Beispiel um die Interaktion mit Nephrin konkurrieren. Zu diesem Zweck wären Untersuchungen sinnvoll, die dem Expressionseinfluss einer 4.1O-Variante auf die Interaktion zwischen Nephrin und einer jeweils anderen 4.1O-Variante nachgehen.

In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls untersucht werden, ob die vier 4.1O-Spleißvarianten alle dieselbe Funktion hinsichtlich der Interaktion mit Nephrin ausüben oder ob ihre Defizienz die gleichen Folgen für den Phänotyp hat. Dazu müsste man eruieren, ob das FRMD3-Ortholog im Zebrafisch gleichartige Varianten wie die Spleißvarianten des humanen Proteins 4.1O besitzt oder es einen anderen Organismus mit vergleichbaren Varianten gibt, der experimentell leicht zugänglich ist.

Hinsichtlich möglicher Funktionen beziehungsweise der Ausgestaltung der Nephrin-4.1O-Varianten-Interaktion *in vivo* sind bestimmte Erkenntnisse über die anderen 4.1 Proteine interessant. Nach aktuellem Kenntnisstand sind diese an der Bildung von ternären Komplexen mit einer Membran-assoziierten Guanylatkinase (MAGUK) und einem Transmembranprotein beteiligt. Im Detail wurde gezeigt, dass das Protein 4.1R nicht nur mit Glycophorin C und der MAGUK p55 einen Komplex in Erythrozyten bildet (259, 260), sondern auch mit Syndecan-2 und der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Proteinkinase (CASK) einen Komplex bilden kann (261). Zudem scheinen die an dieser Komplexbildung beteiligten Domänen der Protein 4.1R-Bindungspartner hochkonserviert zu sein (173, 261). Zusätzlich wurde die CASK als Teil des Multiproteinkomplexes um Nephrin identifiziert (262), sodass auch hierüber eine mögliche Verbindung zwischen Nephrin und dem Protein 4.1O bestehen könnte. Dazu müsste in nachfolgenden Versuchen geklärt werden, ob das Protein 4.1O wie 4.1R mit der CASK interagiert und ob tatsächlich ein Zusammenhang mit der Nephrin-Interaktion besteht. Eine direkte Interaktion zwischen dem Protein 4.1O bzw. seinen Spleißvarianten und der CASK in Kombination mit Nephrin könnte in einem Pulldown-Assay mit rekombinanten Proteinen nachgewiesen werden.

Da für alle vier verwendeten 4.1O-Spleißvarianten eine Interaktion mit dem Nephrin C-Terminus nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass diese Interaktion über eine Domäne vermittelt wird, die bei allen vier Varianten vorhanden ist. In Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurden unter Verwendung verschiedener Trunkierungen von 4.1O-207 die Aminosäuren 506-553 als die mit dem Nephrin C-Terminus interagierenden Aminosäuren ermittelt (187). Dieser Aminosäurebereich befindet

sich zwar C-terminal und damit dort, wo sich die vier 4.1O-Varianten teilweise voneinander unterscheiden, aber alle vier besitzen den definierten AS-Abschnitt (190, 191). Demnach haben gemäß der Aminosäuresequenz alle vier Spleißvarianten die Voraussetzung mit Nephrin zu interagieren. Untersuchungen zu den anderen Mitgliedern der 4.1 Proteinfamilie belegen außerdem, dass diese ebenfalls über ihre CTD mit unterschiedlichen Membranrezeptoren und Proteinen interagieren (176, 178, 229, 231, 232, 239). Daher erscheint es schlüssig, dass bei allen vier 4.1O-Varianten die CTD die vermittelnde Domäne bei der Interaktion mit Nephrin ist. In weiteren Versuchen sollte geprüft werden, ob sich dies bestätigen lässt oder ob möglicherweise weitere Domänen oder Aminosäureabschnitte der anderen 4.1O-Varianten an der Interaktion mit Nephrin beteiligt sind. Dazu würden sich erneut Versuche mit Trunkierungen der 4.1O-Varianten 201, 204 und 202 anbieten.

Um der Frage nach der Funktion des Proteins 4.1O und seiner Spleißvarianten im Rahmen der diabetischen Nephropathie nachzugehen, wurde in dem gewählten Versuchsaufbau der Einfluss von Glukose auf die Interaktion von Nephrin und den 4.1O-Varianten untersucht. In den durchgeführten Co-Immünpräzipitationen konnte kein statistisch signifikanter Einfluss der unterschiedlichen Glukosekonzentrationen auf die Interaktion festgestellt werden. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Interaktion von Nephrin und den Protein 4.1O-Spleißvarianten bei der Entwicklung einer Proteinurie bei der DN womöglich keine entscheidende Rolle spielt.

Allerdings ist zu beachten, dass verschiedene Forschungsgruppen einen Einfluss von diabetischen bzw. HG-Bedingungen auf die Expression von Nephrin beobachten konnten. Unter diabetischen bzw. HG-Bedingungen wurde eine Abnahme der Nephrin-Expression auf mRNA- sowie Proteinebene beschrieben (245, 246, 263). Außerdem scheinen diabetische bzw. HG-Bedingungen zu einer Reduktion der Oberflächenexpression von Nephrin zu führen (255, 263). Ob eine durch HG-Bedingungen verursachte Veränderung der Nephrin-Expression Auswirkungen auf die Interaktion mit den 4.1O-Varianten hat, wurde in den Versuchen dieser Arbeit nicht untersucht. Dies sollte in künftigen Versuchen geklärt werden. Problematisch ist dabei, dass die Nephrin-Expression unter diabetischen Bedingungen in den erwähnten Forschungsarbeiten entweder im Maus- bzw. Rattenmodell oder an Nierenbiopsaten von Menschen untersucht wurde. Das Mausmodell ist für die Untersuchung der 4.1O-Varianten jedoch unzulänglich, da Mäuse nicht die gleichen 4.1O-Varianten wie Menschen aufweisen (182, 183, 264). Ist ein geeigneter Modellorganismus gefunden, sollte zunächst die Nephrin-

Expression unter HG-Bedingungen untersucht werden. Anschließend könnte die Interaktion zwischen Nephrin und der jeweiligen 4.1O-Variante in Abhängigkeit von der Nephrin-Expression überprüft werden.

Darüber hinaus schließen die genannten Ergebnisse nicht aus, dass die Interaktion zwischen Nephrin und den Protein 4.1O-Varianten nicht für andere Glomerulopathien als die DN relevant ist und dort zur Pathogenese beiträgt. Deshalb ist der Nachweis dieser Interaktionen trotz des fehlenden Nachweises eines Glukoseeinflusses relevant und kann Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen in Bezug auf andere nephrotische Nierenerkrankungen sein.

Weiterhin sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass die Protein 4.1O-Varianten im Bereich der glomerulären Schlitzmembran weitere Funktionen erfüllen und Interaktionen aufweisen können, die bei der DN verändert und an der Pathogenese der DN beteiligt sein könnten. Wie in Abschnitt 1.2.2 dargelegt wurde, gibt es neben Nephrin eine Reihe weiterer Proteine, die für die regelrechte Funktion der glomerulären Schlitzmembran wichtig sind. Für das Protein 4.1R wurde zum Beispiel eine Interaktion mit *Tight Junction*-Proteinen wie *Zonula occludens-1* beschrieben (178), welches auch an der glomerulären Schlitzmembran zu finden ist (80). Für das Protein 4.1O konnte bereits eine Interaktion mit den Schlitzmembranproteinen Neph1 (187) und GLEPP1 (187, 188) nachgewiesen werden. Daher sollte Ziel künftiger Untersuchungen sein, weitere Interaktionen zwischen dem Protein 4.1O bzw. seinen Spleißvarianten und anderen Proteinen der glomerulären Schlitzmembran zu detektieren. Im Anschluss kann der Frage nachgegangen werden, ob diese Interaktionen zur Pathogenese glomerulärer Erkrankungen beitragen. Diese Untersuchungen könnten außerdem dabei helfen, zu eruieren, ob die vier 4.1O-Varianten möglicherweise unterschiedliche Funktionen in der Niere und an der glomerulären Schlitzmembran ausüben. Neue Interaktionsnachweise könnten gleichermaßen mittels Co-Immunpräzitationsversuchen erbracht werden.

Abschließend konnte in den Co-Immunpräzitationsversuchen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Protein 4.1O-Varianten 207, 201, 204 und 202 mit dem C-Terminus des Schlitzmembranproteins Nephrin interagieren. Künftige Versuche sollten klären, welchem Zweck diese Interaktion dient. Außerdem ist unklar, wie sich diese Interaktion *in vivo* gestaltet und ob eine bestimmte 4.1O-Variante hierbei die Hauptrolle spielt. Ein Glukoseeinfluss auf diese Interaktion konnte in den Versuchen dieser Arbeit vorläufig ausgeschlossen werden. Da die DN jedoch durch mehr Aspekte als nur eine

Hyperglykämie gekennzeichnet ist, ist eine Veränderung der nachgewiesenen Interaktion im Rahmen der DN nicht vollständig auszuschließen. Die Bedeutung der Interaktion für andere nephrotische Glomerulopathien ist ebenfalls ein potenzielles Thema für zukünftige Forschungsarbeiten.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *CJASN* 2017; 12(12):2032–45. doi: 10.2215/CJN.11491116.
2. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas Reports 2023: Diabetes and kidney disease*: International Diabetes Federation; 2023 [Stand: 26.05.2025]. Verfügbar unter: <https://diabetesatlas.org/atlas/diabetes-and-kidney-disease/>.
3. Couser WG, Remuzzi G, Mendis S, Tonelli M. The contribution of chronic kidney disease to the global burden of major noncommunicable diseases. *Kidney Int* 2011; 80(12):1258–70. Verfügbar unter: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0085253815550047>.
4. Boer IH de, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA* 2011; 305(24):2532–9. doi: 10.1001/jama.2011.861.
5. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157:107843. doi: 10.1016/j.diabres.2019.107843.
6. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas 11th Edition; 2025* [Stand: 26.05.2025]. Verfügbar unter: <https://diabetesatlas.org/resources/idf-diabetes-atlas-2025/>.
7. United States Renal Data System. *2024 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of kidney disease in the United States*. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD; 2024 [Stand: 08.06.2025]. Verfügbar unter: <https://adr.usrds.org/2024>.
8. DDG Deutsche Diabetes Gesellschaft. *Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2021: Die Bestandsaufnahme*; 14.11.2020 [Stand: 27.05.2025]. Verfügbar unter: https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/user_upload/06_Gesundheitspolitik/03_Veroeffentlichungen/05_Gesundheitsbericht/20201107_Gesundheitsbericht2021.pdf.
9. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N et al. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392(10159):1736–88. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
10. Köster I, Ferber L von, Ihle P, Schubert I, Hauner H. The cost burden of diabetes mellitus: the evidence from Germany--the CoDiM study. *Diabetologia* 2006; 49(7):1498–504. doi: 10.1007/s00125-006-0277-5.

11. Statistisches Bundesamt (Destatis) G-O. Krankheitskosten 2020 für Diabetes mellitus; 2023 [Stand: 28.12.2023]. Verfügbar unter: www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/Tabellen/_tabellen-innen-krankheitskosten-diagnosen.html.
12. DGG Deutsche Diabetes Gesellschaft. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2025: Die Bestandsaufnahme; 14.11.2024 [Stand: 27.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ddg.info/politik/veroeffentlichungen/gesundheitsbericht>.
13. Ferber L von, Köster I, Hauner H. Medical costs of diabetic complications total costs and excess costs by age and type of treatment results of the German CoDiM Study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115(2):97–104. doi: 10.1055/s-2007-949152.
14. Williams R, van Gaal L, Lucioni C. Assessing the impact of complications on the costs of Type II diabetes. *Diabetologia* 2002; 45(S1):S13-S17. doi: 10.1007/s00125-002-0859-9.
15. Dal Canto E, Ceriello A, Rydén L, Ferrini M, Hansen TB, Schnell O et al. Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of macro and micro vascular complications. *Eur J Prev Cardiol* 2019; 26(2_suppl):25–32. doi: 10.1177/2047487319878371.
16. Nationale Diabetes-Surveillance am Robert Koch-Institut: Diabetes in Deutschland - Bericht der Nationalen Diabetes-Surveillance 2019. Robert Koch-Institut, Berlin; 2019 [Stand: 29.12.2023]. Verfügbar unter: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Diabetes_Surveillance/Diabetesbericht.pdf?__blob=publicationFile.
17. Nichols GA, Vupputuri S, Lau H. Medical care costs associated with progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2011; 34(11):2374–8. doi: 10.2337/dc11-0475.
18. Lin Y-C, Chang Y-H, Yang S-Y, Wu K-D, Chu T-S. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018; 117(8):662–75. doi: 10.1016/j.jfma.2018.02.007.
19. Bash LD, Astor BC, Coresh J. Risk of incident ESRD: a comprehensive look at cardiovascular risk factors and 17 years of follow-up in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Kidney Dis* 2010; 55(1):31–41. doi: 10.1053/j.ajkd.2009.09.006.
20. Koye DN, Magliano DJ, Reid CM, Jepson C, Feldman HI, Herman WH et al. Risk of Progression of Nonalbuminuric CKD to End-Stage Kidney Disease in People With Diabetes: The CRIC (Chronic Renal Insufficiency Cohort) Study. *Am J Kidney Dis* 2018; 72(5):653–61. doi: 10.1053/j.ajkd.2018.02.364.
21. Robles NR, Villa J, Gallego RH. Non-Proteinuric Diabetic Nephropathy. *J Clin Med* 2015; 4(9):1761–73. doi: 10.3390/jcm4091761.

22. Ninomiya T, Perkovic V, Galan BE de, Zoungas S, Pillai A, Jardine M et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(8):1813–21. doi: 10.1681/ASN.2008121270.
23. González-Pérez A, Saez M, Vizcaya D, Lind M, Garcia Rodriguez L. Incidence and risk factors for mortality and end-stage renal disease in people with type 2 diabetes and diabetic kidney disease: a population-based cohort study in the UK. *BMJ Open Diabetes Res Care* 2021; 9(1). doi: 10.1136/bmjdr-2021-002146.
24. Groop P-H, Thomas MC, Moran JL, Wadèn J, Thorn LM, Mäkinen V-P et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes* 2009; 58(7):1651–8. doi: 10.2337/db08-1543.
25. Tervaert TWC, 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. doi: 10.1681/ASN.2010010010.
26. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 9. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Care in Diabetes - 2025. *Diabetes Care* 2025; 48(Suppl 1):S181-S206. doi: 10.2337/dc25-S009.
27. American Diabetes Association Professional Practice Committee. 11. Chronic kidney disease and risk management: Standards of Care in Diabetes-2025. *Diabetes Care* 2025 2025; (48 (Suppl. 1)):239-251 [Stand: 28.05.2025]. Verfügbar unter: https://diabetesjournals.org/care/article/48/Supplement_1/S239/157554/11-Chronic-Kidney-Disease-and-Risk-Management.
28. Buse JB, Wexler DJ, Tsapas A, Rossing P, Mingrone G, Mathieu C et al. 2019 Update to: Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2020; 43(2):487–93. doi: 10.2337/dci19-0066.
29. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, Bompoint S, Heerspink HJL, Charytan DM et al. Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* 2019; 380(24):2295–306. doi: 10.1056/NEJMoa1811744.
30. Guthrie R. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes. *Postgrad Med* 2018; 130(2):149–53. doi: 10.1080/00325481.2018.1423852.
31. Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, Chertow GM, Greene T, Hou F-F et al. Dapagliflozin in Patients with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* 2020; 383(15):1436–46. doi: 10.1056/NEJMoa2024816.
32. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2015; 373(22):2117–28. doi: 10.1056/NEJMoa1504720.
33. Wanner C, Inzucchi SE, Lachin JM, Fitchett D, Eynatten M von, Mattheus M et al. Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2016; 375(4):323–34. doi: 10.1056/NEJMoa1515920.

34. Giugliano D, Scappaticcio L, Longo M, Caruso P, Maiorino MI, Bellastella G et al. GLP-1 receptor agonists and cardiorenal outcomes in type 2 diabetes: an updated meta-analysis of eight CVOTs. *Cardiovasc Diabetol* 2021; 20(1):189. doi: 10.1186/s12933-021-01366-8.
35. Cherney DZI, Perkins BA, Soleymanlou N, Maione M, Lai V, Lee A et al. Renal hemodynamic effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibition in patients with type 1 diabetes mellitus. *Circulation* 2014; 129(5):587–97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005081.
36. Sloan LA. Review of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for the treatment of type 2 diabetes mellitus in patients with chronic kidney disease and their renal effects. *J Diabetes* 2019; 11(12):938–48. doi: 10.1111/1753-0407.12969.
37. Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, Nagai Y, Akamine T, Yokota T et al. SGLT2 Inhibitors as a Therapeutic Option for Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci* 2017; 18(5). doi: 10.3390/ijms18051083.
38. Kawanami D, Matoba K, Sango K, Utsunomiya K. Incretin-Based Therapies for Diabetic Complications: Basic Mechanisms and Clinical Evidence. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8). doi: 10.3390/ijms17081223.
39. Zhang H, Zhang X, Hu C, Lu W. Exenatide reduces urinary transforming growth factor- β 1 and type IV collagen excretion in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Kidney Blood Press Res* 2012; 35(6):483–8. doi: 10.1159/000337929.
40. Kim D-L, Lee S-E, Kim NH. Renal Protection of Mineralocorticoid Receptor Antagonist, Finerenone, in Diabetic Kidney Disease. *Endocrinol Metab (Seoul)* 2023; 38(1):43–55. doi: 10.3803/EnM.2022.1629.
41. KDIGO 2022 Clinical Practice Guideline for Diabetes Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int* 2022; 102(5S):S1-S127. doi: 10.1016/j.kint.2022.06.008.
42. Chaudhuri A, Ghanim H, Arora P. Improving the residual risk of renal and cardiovascular outcomes in diabetic kidney disease: A review of pathophysiology, mechanisms, and evidence from recent trials. *Diabetes Obes Metab* 2022; 24(3):365–76. doi: 10.1111/dom.14601.
43. Brown NJ. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2013; 9(8):459–69. doi: 10.1038/nrneph.2013.110.
44. Solis-Herrera C, Triplitt C. Non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists in patients with chronic kidney disease and type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2023. doi: 10.1111/dom.15327.
45. Food and Drug Administration (FDA). FDA approves drug to reduce risk of serious kidney and heart complications in adults with chronic kidney disease associated with type 2 diabetes; 2021 [Stand: 28.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/fda-approves-drug-reduce-risk-serious-kidney-and-heart-complications-adults-chronic-kidney-disease>.

46. European Medicines Agency (EMA). Kerendia | European Medicines Agency; 2023 [Stand: 28.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kerendia>.
47. Boer IH de, Khunti K, Sadusky T, Tuttle KR, Neumiller JJ, Rhee CM et al. Diabetes Management in Chronic Kidney Disease: A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Diabetes Care* 2022; 45(12):3075–90. doi: 10.2337/dci22-0027.
48. Bakris GL, Agarwal R, Anker SD, Pitt B, Ruilope LM, Rossing P et al. Effect of Finerenone on Chronic Kidney Disease Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* 2020; 383(23):2219–29. doi: 10.1056/NEJMoa2025845.
49. Agarwal R, Filippatos G, Pitt B, Anker SD, Rossing P, Joseph A et al. Cardiovascular and kidney outcomes with finerenone in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: the FIDELITY pooled analysis. *Eur Heart J* 2022; 43(6):474–84. doi: 10.1093/eurheartj/ehab777.
50. Farquhar MG, Wissig SL, Palade G. E. Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J Exp Med* 1961; 113(1):47–66. doi: 10.1084/jem.113.1.47.
51. Arkill KP, Qvortrup K, Starborg T, Mantell JM, Knupp C, Michel CC et al. Resolution of the three dimensional structure of components of the glomerular filtration barrier. *BMC Nephrol* 2014; 15:24. doi: 10.1186/1471-2369-15-24.
52. Rennke HG, Cotran RS, Venkatachalam MA. Role of molecular charge in glomerular permeability. Tracer studies with cationized ferritins. *J Cell Biol* 1975; 67(3):638–46. doi: 10.1083/jcb.67.3.638.
53. Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM. Permselectivity of the glomerular capillary wall: III. Restricted transport of polyanions. *Kidney Int* 1975; 8(4):212–8. doi: 10.1038/ki.1975.104.
54. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, Mathieson PW. Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(11):2885–93. doi: 10.1681/ASN.2007010119.
55. Kanwar YS, Farquhar MG. Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(3):1303–7. doi: 10.1073/pnas.76.3.1303.
56. Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83(1):253–307. doi: 10.1152/physrev.00020.2002.
57. Ichimura K, Kurihara H, Sakai T. Actin filament organization of foot processes in vertebrate glomerular podocytes. *Cell Tissue Res* 2007; 329(3):541–57. doi: 10.1007/s00441-007-0440-4.
58. Ichimura K, Miyazaki N, Sadayama S, Murata K, Koike M, Nakamura K-I et al. Three-dimensional architecture of podocytes revealed by block-face scanning electron microscopy. *Sci Rep* 2015; 5:8993. doi: 10.1038/srep08993.

59. Korhonen M, Yläne J, Laitinen L, Virtanen I. The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J Cell Biol* 1990; 111(3):1245–54. doi: 10.1083/jcb.111.3.1245.
60. Adler S. Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *Am J Pathol* 1992; 141(3):571–8.
61. Adler S, Chen X. Anti-Fx1A antibody recognizes a beta 1-integrin on glomerular epithelial cells and inhibits adhesion and growth. *Am J Physiol* 1992; 262(5 Pt 2):F770-6. doi: 10.1152/ajprenal.1992.262.5.F770.
62. Sever S, Schiffer M. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int* 2018; 93(6):1298–307. doi: 10.1016/j.kint.2017.12.028.
63. Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, Planus E, Block MR. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 17):3037–49. doi: 10.1242/jcs.052704.
64. Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; 69(12):2131–47. doi: 10.1038/sj.ki.5000410.
65. Kriz W, Shirato I, Nagata M, LeHir M, Lemley KV. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013; 304(4):F333-47. doi: 10.1152/ajprenal.00478.2012.
66. Oh J, Reiser J, Mundel P. Dynamic (re)organization of the podocyte actin cytoskeleton in the nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004; 19(2):130–7. doi: 10.1007/s00467-003-1367-y.
67. Shirato I, Sakai T, Kimura K, Tomino Y, Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *Am J Pathol* 1996; 148(4):1283–96.
68. Smoyer WE, Mundel P. Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med (Berl)* 1998; 76(3-4):172–83. doi: 10.1007/s001090050206.
69. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974; 60(2):423–33. doi: 10.1083/jcb.60.2.423.
70. Wartiovaara J, Ofverstedt L-G, Khoshnoodi J, Zhang J, Mäkelä E, Sandin S et al. Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest* 2004; 114(10):1475–83. doi: 10.1172/JCI22562.
71. Edwards A, Daniels BS, Deen WM. Ultrastructural model for size selectivity in glomerular filtration. *Am J Physiol* 1999; 276(6):F892-902. doi: 10.1152/ajprenal.1999.276.6.F892.
72. Graham RC, Karnovsky MJ. Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *J Exp Med* 1966; 124(6):1123–34. doi: 10.1084/jem.124.6.1123.

73. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006; 354(13):1387–401. doi: 10.1056/NEJMra052131.
74. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10(11):2440–5. doi: 10.1681/ASN.V10112440.
75. Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attié T et al. Podocin Localizes in the Kidney to the Slit Diaphragm Area. *Am J Pathol* 2002; 160(1):131–9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64357-X.
76. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24(4):349–54. doi: 10.1038/74166.
77. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001; 21(14):4829–36. doi: 10.1128/MCB.21.14.4829-4836.2001.
78. Gerke P, Sellin L, Kretz O, Petraschka D, Zentgraf H, Benzing T et al. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(6):1693–702. doi: 10.1681/ASN.2004060439.
79. Shih N-Y, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH, Shaw AS. CD2AP Localizes to the Slit Diaphragm and Binds to Nephrin via a Novel C-Terminal Domain. *Am J Pathol* 2001; 159(6):2303–8. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63080-5.
80. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990; 111(3):1255–63. doi: 10.1083/jcb.111.3.1255.
81. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(6):1382–91. doi: 10.1097/01.asn.0000130167.30769.55.
82. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 2001; 276(45):41543–6. doi: 10.1074/jbc.C100452200.
83. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108(11):1621–9. doi: 10.1172/JCI12849.
84. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestilä M, Jalanko H et al. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(14):7962–7. doi: 10.1073/pnas.96.14.7962.
85. 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. *Molecular Cell* 1998; 1(4):575–82. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80057-X.

86. Gerke P, Huber TB, Sellin L, Benzing T, Walz G. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(4):918–26. doi: 10.1097/01.asn.0000057853.05686.89.
87. Barletta G-M, 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. doi: 10.1074/jbc.M301279200.
88. Verma R, Wharram B, Kovari I, Kunkel R, Nihalani D, Wary KK et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003; 278(23):20716–23. doi: 10.1074/jbc.M301689200.
89. Huber TB, Hartleben B, Kim J, Schmidts M, Schermer B, Keil A et al. Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 2003; 23(14):4917–28. doi: 10.1128/MCB.23.14.4917-4928.2003.
90. 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. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00097.x.
91. 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. doi: 10.1172/JCI27414.
92. 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. doi: 10.1038/nature04662.
93. 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. doi: 10.1074/jbc.M112.439463.
94. Yuan H, Takeuchi E, Salant DJ. Podocyte slit-diaphragm protein nephrin is linked to the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282(4):F585-91. doi: 10.1152/ajprenal.00290.2001.
95. Farquhar MG, Palade GE. FUNCTIONAL EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF A THIRD CELL TYPE IN THE RENAL GLOMERULUS : Phagocytosis of Filtration Residues by a Distinctive "Third" Cell. *J Cell Biol* 1962; 13(1):55–87. doi: 10.1083/jcb.13.1.55.
96. Kurihara H, Sakai T. Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary. *Anat Sci Int* 2017; 92(2):173–86. doi: 10.1007/s12565-016-0334-1.
97. Ausiello DA, Kreisberg JI, Roy C, Karnovsky MJ. Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after stimulation with angiotensin II and arginine vasopressin. *J Clin Invest* 1980; 65(3):754–60. doi: 10.1172/JCI109723.

98. Sakai T, Kriz W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. *Anat Embryol (Berl)* 1987; 176(3):373–86. doi: 10.1007/BF00310191.
99. Kriz W, Elger M, Lemley K, Sakai T. Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation. *Kidney Int Suppl* 1990; 30:S2-9.
100. Schlöndorff D, Banas B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(6):1179–87. doi: 10.1681/ASN.2008050549.
101. Hewitson TD, Becker GJ. Interstitial myofibroblasts in IgA glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 1995; 15(2):111–7. doi: 10.1159/000168813.
102. Thomas HY, Ford Versypt AN. Pathophysiology of mesangial expansion in diabetic nephropathy: mesangial structure, glomerular biomechanics, and biochemical signaling and regulation. *J Biol Eng* 2022; 16(1):19. doi: 10.1186/s13036-022-00299-4.
103. Patel K, Harding P, Haney LB, Glass WF. Regulation of the mesangial cell myofibroblast phenotype by actin polymerization. *J Cell Physiol* 2003; 195(3):435–45. doi: 10.1002/jcp.10267.
104. Johnson RJ, Floege J, Yoshimura A, Iida H, Couser WG, Alpers CE. The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? *J Am Soc Nephrol* 1992; 2(10 Suppl):S190-7. doi: 10.1681/ASN.V210s190.
105. Steffes MW, Osterby R, Chavers B, Mauer SM. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 1989; 38(9):1077–81. doi: 10.2337/diab.38.9.1077.
106. Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The Drosophila Mst Ortholog, hippo, Restricts Growth and Cell Proliferation and Promotes Apoptosis. *Cell* 2003; 114(4):457–67. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00557-9.
107. Wei X, Shimizu T, Lai Z-C. Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in Drosophila. *EMBO J* 2007; 26(7):1772–81. doi: 10.1038/sj.emboj.7601630.
108. Wu S, Huang J, Dong J, Pan D. hippo Encodes a Ste-20 Family Protein Kinase that Restricts Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Conjunction with salvador and warts. *Cell* 2003; 114(4):445–56. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00549-X.
109. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol* 2003; 5(10):914–20. doi: 10.1038/ncb1050.
110. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development* 1995; 121(4):1053–63. doi: 10.1242/dev.121.4.1053.
111. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase

- and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev* 1995; 9(5):534–46. doi: 10.1101/gad.9.5.534.
112. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 2007; 130(6):1120–33. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.019.
 113. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 2007; 21(21):2747–61. doi: 10.1101/gad.1602907.
 114. Lei Q-Y, Zhang H, Zhao B, Zha Z-Y, Bai F, Pei X-H et al. TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol Cell Biol* 2008; 28(7):2426–36. doi: 10.1128/MCB.01874-07.
 115. Song H, Mak KK, Topol L, Yun K, Hu J, Garrett L et al. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(4):1431–6. doi: 10.1073/pnas.0911409107.
 116. Heallen T, Zhang M, Wang J, Bonilla-Claudio M, Klysik E, Johnson RL et al. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science* 2011; 332(6028):458–61. doi: 10.1126/science.1199010.
 117. Azzolin L, Panciera T, Soligo S, Enzo E, Bicciato S, Dupont S et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 2014; 158(1):157–70. doi: 10.1016/j.cell.2014.06.013.
 118. Mikeladze-Dvali T, Wernet MF, Pistillo D, Mazzoni EO, Teleman AA, Chen Y-W et al. The growth regulators warts/lats and melted interact in a bistable loop to specify opposite fates in *Drosophila* R8 photoreceptors. *Cell* 2005; 122(5):775–87. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.026.
 119. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, Yanger K, Pepe-Mooney B, Gurung B et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* 2014; 157(6):1324–38. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.060.
 120. Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell* 2014; 30(2):137–50. doi: 10.1016/j.devcel.2014.06.003.
 121. Wang P, Mao B, Luo W, Wei B, Jiang W, Liu D et al. The alteration of Hippo/YAP signaling in the development of hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(5):435. doi: 10.1007/s00395-014-0435-8.
 122. Wu W, Ziemann M, Huynh K, She G, Pang Z-D, Zhang Y et al. Activation of Hippo signaling pathway mediates mitochondria dysfunction and dilated cardiomyopathy in mice. *Theranostics* 2021; 11(18):8993–9008. doi: 10.7150/thno.62302.
 123. Martin K, Pritchett J, Llewellyn J, Mullan AF, Athwal VS, Dobie R et al. PAK proteins and YAP-1 signalling downstream of integrin beta-1 in myofibroblasts promote liver fibrosis. *Nature communications* 2016; 7:12502. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27535340/>.

124. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinković A, Vrbanac V et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308(4):L344-57. doi: 10.1152/ajplung.00300.2014.
125. Mehra R, Vats P, Cieslik M, Cao X, Su F, Shukla S et al. Biallelic Alteration and Dysregulation of the Hippo Pathway in Mucinous Tubular and Spindle Cell Carcinoma of the Kidney. *Cancer Discov* 2016; 6(11):1258–66. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-0267.
126. Schütte U, Bisht S, Heukamp LC, Keschull M, Florin A, Haarmann J et al. Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Translational Oncology* 2014; 7(2):309–21. doi: 10.1016/j.tranon.2014.02.005.
127. Happé H, van der Wal AM, Leonhard WN, Kunnen SJ, Breuning MH, Heer E de et al. Altered Hippo signalling in polycystic kidney disease. *The Journal of Pathology* 2011; 224(1):133–42. doi: 10.1002/path.2856.
128. Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, He X, Sidiqi AM, Tolosa MF et al. YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF- β -Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(10):3117–28. doi: 10.1681/ASN.2015050499.
129. Chen J, Harris RC. Interaction of the EGF Receptor and the Hippo Pathway in the Diabetic Kidney. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27(6):1689–700. doi: 10.1681/ASN.2015040415.
130. Qian X, He L, Hao M, Li Y, Li X, Liu Y et al. YAP mediates the interaction between the Hippo and PI3K/Akt pathways in mesangial cell proliferation in diabetic nephropathy. *Acta Diabetol* 2021; 58(1):47–62. doi: 10.1007/s00592-020-01582-w.
131. Bae SJ, Ni L, Osinski A, Tomchick DR, Brautigam CA, Luo X. SAV1 promotes Hippo kinase activation through antagonizing the PP2A phosphatase STRIPAK. *Elife* 2017; 6. doi: 10.7554/eLife.30278.
132. Tapon N, Harvey KF, Bell DW, Wahrer DC, Schiripo TA, Haber DA et al. Salvador Promotes Both Cell Cycle Exit and Apoptosis in *Drosophila* and Is Mutated in Human Cancer Cell Lines. *Cell* 2002; 110(4):467–78. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00824-3.
133. Lai Z-C, Wei X, Shimizu T, Ramos E, Rohrbaugh M, Nikolaidis N et al. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell* 2005; 120(5):675–85. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.036.
134. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* 2005; 122(3):421–34. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.007.
135. Chan EHY, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Silljé HHW. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* 2005; 24(12):2076–86. doi: 10.1038/sj.onc.1208445.

136. Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Dev Cell* 2011; 21(5):888–95. doi: 10.1016/j.devcel.2011.08.028.
137. Ni L, Li S, Yu J, Min J, Brautigam CA, Tomchick DR et al. Structural basis for autoactivation of human Mst2 kinase and its regulation by RASSF5. *Structure* 2013; 21(10):1757–68. doi: 10.1016/j.str.2013.07.008.
138. Zhao B, Li L, Tumaneng K, Wang C-Y, Guan K-L. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes Dev* 2010; 24(1):72–85. doi: 10.1101/gad.1843810.
139. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 2014; 94(4):1287–312. doi: 10.1152/physrev.00005.2014.
140. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008; 22(14):1962–71. doi: 10.1101/gad.1664408.
141. Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B et al. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol* 2015; 17(9):1218–27. doi: 10.1038/ncb3216.
142. Yu J, Zheng Y, Dong J, Klusza S, Deng W-M, Pan D. Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev Cell* 2010; 18(2):288–99. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.012.
143. Genevet A, Wehr MC, Brain R, Thompson BJ, Tapon N. Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Dev Cell* 2010; 18(2):300–8. doi: 10.1016/j.devcel.2009.12.011.
144. Kim N-G, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(29):11930–5. doi: 10.1073/pnas.1103345108.
145. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D et al. Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* 2011; 144(5):782–95. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.031.
146. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giullitti S, Michielin F, Elvassore N et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 2013; 154(5):1047–59. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.042.
147. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giullitti S, Cordenonsi M et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011; 474(7350):179–83. doi: 10.1038/nature10137.
148. Yu F-X, Zhao B, Panupinthu N, Jewell JL, Lian I, Wang LH et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 2012; 150(4):780–91. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.037.

149. Hong AW, Meng Z, Yuan H-X, Plouffe SW, Moon S, Kim W et al. Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP. *EMBO Rep* 2017; 18(1):72–86. doi: 10.15252/embr.201642681.
150. Mo J-S, Meng Z, Kim YC, Park HW, Hansen CG, Kim S et al. Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat Cell Biol* 2015; 17(4):500–10. doi: 10.1038/ncb3111.
151. Chen J, Wang X, He Q, Bulus N, Fogo AB, Zhang M-Z et al. YAP Activation in Renal Proximal Tubule Cells Drives Diabetic Renal Interstitial Fibrogenesis. *Diabetes* 2020; 69(11):2446–57. Verfügbar unter: <https://pub-med.ncbi.nlm.nih.gov/32843569/>.
152. Ma R, Ren J-M, Li P, Zhou Y-J, Zhou M-K, Hu Z et al. Activated YAP causes renal damage of type 2 diabetic nephropathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2019; 23(2):755–63. doi: 10.26355/eurev_201901_16890.
153. Peng F, Wu D, Gao B, Ingram AJ, Zhang B, Chorneyko K et al. RhoA/Rho-kinase contribute to the pathogenesis of diabetic renal disease. *Diabetes* 2008; 57(6):1683–92. doi: 10.2337/db07-1149.
154. Gojo A, Utsunomiya K, Taniguchi K, Yokota T, Ishizawa S, Kanazawa Y et al. The Rho-kinase inhibitor, fasudil, attenuates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 568(1-3):242–7. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.04.011.
155. Kolavennu V, Zeng L, Peng H, Wang Y, Danesh FR. Targeting of RhoA/ROCK signaling ameliorates progression of diabetic nephropathy independent of glucose control. *Diabetes* 2008; 57(3):714–23. doi: 10.2337/db07-1241.
156. García Z, Kumar A, Marqués M, Cortés I, Carrera AC. Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *EMBO J* 2006; 25(4):655–61. doi: 10.1038/sj.emboj.7600967.
157. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(7):489–501. doi: 10.1038/nrc839.
158. Komers R, Oyama TT, Beard DR, Tikellis C, Xu B, Lotspeich DF et al. Rho kinase inhibition protects kidneys from diabetic nephropathy without reducing blood pressure. *Kidney Int* 2011; 79(4):432–42. doi: 10.1038/ki.2010.428.
159. Zhou L, Liu F, Huang XR, Liu F, Chen H, Chung ACK et al. Amelioration of albuminuria in ROCK1 knockout mice with streptozotocin-induced diabetic kidney disease. *Am J Nephrol* 2011; 34(5):468–75. doi: 10.1159/000332040.
160. 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. doi: 10.1007/s100380300015.
161. Conboy J, Kan YW, Shohet SB, Mohandas N. Molecular cloning of protein 4.1, a major structural element of the human erythrocyte membrane skeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(24):9512–6. doi: 10.1073/pnas.83.24.9512.

162. 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. doi: 10.1006/geno.1998.5265.
163. Walensky LD, Blackshaw S, Liao D, Watkins CC, Weier H-UG, Parra M et al. A Novel Neuron-Enriched Homolog of the Erythrocyte Membrane Cytoskeletal Protein 4.1. *J. Neurosci.* 1999; 19(15):6457–67. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-15-06457.1999.
164. Parra M, Gascard P, Walensky LD, Gimm JA, Blackshaw S, Chan N et al. Molecular and functional characterization of protein 4.1B, a novel member of the protein 4.1 family with high level, focal expression in brain. *J Biol Chem* 2000; 275(5):3247–55. doi: 10.1074/jbc.275.5.3247.
165. Baines AJ, Lu H-C, Bennett PM. The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1838(2):605–19. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.030.
166. Takakuwa Y, Tchernia G, Rossi M, Benabadji M, Mohandas N. Restoration of normal membrane stability to unstable protein 4.1-deficient erythrocyte membranes by incorporation of purified protein 4.1. *J Clin Invest* 1986; 78(1):80–5. doi: 10.1172/JCI112577.
167. Correas I, Leto TL, Speicher DW, Marchesi VT. Identification of the functional site of erythrocyte protein 4.1 involved in spectrin-actin associations. *J Biol Chem* 1986; 261(7):3310–5.
168. Tchernia G, Mohandas N, Shohet SB. Deficiency of skeletal membrane protein band 4.1 in homozygous hereditary elliptocytosis. Implications for erythrocyte membrane stability. *J Clin Invest* 1981; 68(2):454–60. doi: 10.1172/jci110275.
169. Tang TK, Qin Z, Leto T, Marchesi VT, Benz EJ. Heterogeneity of mRNA and protein products arising from the protein 4.1 gene in erythroid and nonerythroid tissues. *J Cell Biol* 1990; 110(3):617–24. doi: 10.1083/jcb.110.3.617.
170. Schischmanoff PO, Yaswen P, Parra MK, Lee G, Chasis JA, Mohandas N et al. Cell shape-dependent regulation of protein 4.1 alternative pre-mRNA splicing in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 1997; 272(15):10254–9. doi: 10.1074/jbc.272.15.10254.
171. Conboy JG, Chan JY, Chasis JA, Kan YW, Mohandas N. Tissue- and development-specific alternative RNA splicing regulates expression of multiple isoforms of erythroid membrane protein 4.1. *J Biol Chem* 1991; 266(13):8273–80.
172. Calinisan V, Gravem D, Chen RP-H, Brittin S, Mohandas N, Lecomte M-C et al. New insights into potential functions for the protein 4.1 superfamily of proteins in kidney epithelium. *Front Biosci* 2006; 11:1646–66. doi: 10.2741/1911.
173. 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. doi: 10.1016/s0955-0674(99)00080-0.

174. 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 in Biochemical Sciences* 1998; 23(8):281–2. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01237-7.
175. 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. doi: 10.1186/1471-2164-7-85.
176. Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Snyder M, Marchesi VT, Benz EJ. A nonerythroid isoform of protein 4.1R interacts with the nuclear mitotic apparatus (NuMA) protein. *J Cell Biol* 1999; 145(1):29–43. doi: 10.1083/jcb.145.1.29.
177. Hou CL, Tang Cj, 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.
178. Mattagajasingh SN, Huang SC, Hartenstein JS, Benz EJ. 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. doi: 10.1074/jbc.M004578200.
179. 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. doi: 10.1021/bi0256330.
180. Ramez M, Blot-Chabaud M, Cluzeaud F, Chanan S, Patterson M, Walensky LD et al. Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron. *Kidney Int* 2003; 63(4):1321–37. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00870.x.
181. National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. FRMD3 FERM domain containing 3 [Homo sapiens (human)]; 2025 [Stand: 08.06.2025]. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/257019>.
182. Gene: FRMD3 (ENSG00000172159) - Summary - Homo_sapiens; 2025 [Stand: 23.05.2025]. Verfügbar unter: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000172159;r=9:83242990-83538546.
183. Dyer SC, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barba M, Barnes I, Barrera-Enriquez VP et al. Ensembl 2025. *Nucleic Acids Res* 2025; 53(D1):D948-D957. doi: 10.1093/nar/gkae1071.
184. 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. doi: 10.2337/db08-1514.
185. Buffon MP, Carpena MP, Sortica DA, Santer A, Carlessi R, Souza BM de et al. rs1888747 polymorphism in the FRMD3 gene, gene and protein expression: role in diabetic kidney disease. *Diabetol Metab Syndr* 2016; 8:3. doi: 10.1186/s13098-015-0121-5.

186. 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. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.06.038.
187. Ohlsson S. Die Rolle des Proteins 4.1O für die Funktion des Podozyten [Dissertation]: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2018.
188. Rieckmann S. Charakterisierung von Protein 4.1O als Expressionsprodukt eines Kandidatengens für diabetische Nephropathie unter Berücksichtigung seiner posttranslationalen Modifikationen sowie des Interaktionsverhaltens mit podozytären Proteinen [Dissertation]: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2025.
189. Bajraktarevic A. FRMD3/Protein 4.1O ist ein neuer durch MAP-Kinasen regulierter Nephrin-Adaptor an F-Aktin und ist mit Diabetes mellitus assoziiert [Dissertation]: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2024.
190. UniProt. A2A2Y4 · FRMD3_HUMAN: FERM domain-containing protein 3; 2025 [Stand: 25.05.2025]. Verfügbar unter: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/A2A2Y4/entry>.
191. The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2025. *Nucleic Acids Res* 2025; 53(D1):D609–D617. Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/nar/article/53/D1/D609/7902999?login=false>.
192. SMART: Sequence analysis results for FRMD3_HUMAN (A2A2YA4); 2025 [Stand: 10.06.2025]. Verfügbar unter: https://smart.embl-heidelberg.de/smart/show_motifs.pl?ID=FRMD3_HUMAN.
193. Canani LH, Gerchman F, Gross JL. Familial clustering of diabetic nephropathy in Brazilian type 2 diabetic patients. *Diabetes* 1999; 48(4):909–13. doi: 10.2337/diabetes.48.4.909.
194. Quinn M, Angelico MC, Warram JH, Krolewski AS. Familial factors determine the development of diabetic nephropathy in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39(8):940–5. doi: 10.1007/BF00403913.
195. Li M, Pezzolesi MG. Advances in understanding the genetic basis of diabetic kidney disease. *Acta Diabetol* 2018; 55(11):1093–104. doi: 10.1007/s00592-018-1193-0.
196. Pezzolesi MG, Jeong J, Smiles AM, Skupien J, Mychaleckyj JC, Rich SS et al. Family-based association analysis confirms the role of the chromosome 9q21.32 locus in the susceptibility of diabetic nephropathy. *PLoS One* 2013; 8(3):e60301. doi: 10.1371/journal.pone.0060301.
197. Freedman BI, Langefeld CD, Lu L, Divers J, Comeau ME, Kopp JB et al. Differential effects of MYH9 and APOL1 risk variants on FRMD3 Association with Diabetic ESRD in African Americans. *PLoS Genet* 2011; 7(6):e1002150. doi: 10.1371/journal.pgen.1002150.
198. Maeda S, Araki S, Babazono T, Toyoda M, Umezono T, Kawai K et al. Replication study for the association between four Loci identified by a genome-wide

- association study on European American subjects with type 1 diabetes and susceptibility to diabetic nephropathy in Japanese subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 2010; 59(8):2075–9. doi: 10.2337/db10-0067.
199. Martini S, Nair V, Patel SR, Eichinger F, Nelson RG, Weil EJ et al. From single nucleotide polymorphism to transcriptional mechanism: a model for FRMD3 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2013; 62(7):2605–12. doi: 10.2337/db12-1416.
 200. 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. doi: 10.1186/s13098-015-0114-4.
 201. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020.
 202. Cell Signaling Technology. Phospho-YAP (Ser397) (D1E7Y) Rabbit mAb; 2021 [Stand: 09.06.2025]. Verfügbar unter: <https://www.cellsignal.de/products/primary-antibodies/phospho-yap-ser397-d1e7y-rabbit-mab/13619?Ns=product.sortId%7C0&N=4294964832+4294959750+4294956287&Nrpp=60&No=%7Boffset%7D&fromPage=plp>.
 203. Eckert WA, Kartenbeck J. *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1997. (Springer eBook Collection).
 204. Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, Oliver N, Roestenberg P, Ito Y et al. Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008; 31(6):1177–82. doi: 10.2337/dc07-2469.
 205. Ito Y, Aten J, Bende RJ, Oemar BS, Rabelink TJ, Weening JJ et al. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibrosis. *Kidney Int* 1998; 53(4):853–61. doi: 10.1111/j.1523-1755.1998.00820.x.
 206. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; 274(9):5830–4. doi: 10.1074/jbc.274.9.5830.
 207. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular Cell* 2003; 11(1):11–23. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00776-1.
 208. Levy D, Adamovich Y, Reuven N, Shaul Y. Yap1 phosphorylation by c-Abl is a critical step in selective activation of proapoptotic genes in response to DNA damage. *Molecular Cell* 2008; 29(3):350–61. doi: 10.1016/j.molcel.2007.12.022.
 209. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Motomura K, Alim A, Tanaka I et al. Activation of Yes-Associated Protein in Low-Grade Meningiomas Is Regulated by Merlin, Cell Density, and Extracellular Matrix Stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol* 2015; 74(7):704–9. doi: 10.1097/NEN.0000000000000211.

210. Haase D, Meister M, Muley T, Hess J, Teurich S, Schnabel P et al. FRMD3, a novel putative tumour suppressor in NSCLC. *Oncogene* 2007; 26(30):4464–8. doi: 10.1038/sj.onc.1210225.
211. Ibar C, Irvine KD. Integration of Hippo-YAP Signaling with Metabolism. *Dev Cell* 2020; 54(2):256–67. doi: 10.1016/j.devcel.2020.06.025.
212. Hong AW, Meng Z, Plouffe SW, Lin Z, Zhang M, Guan K-L. Critical roles of phosphoinositides and NF2 in Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2020; 34(7-8):511–25. doi: 10.1101/gad.333435.119.
213. Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, Chiang JL, Boer IH de, Goldstein-Fuchs J et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care* 2014; 37(10):2864–83. doi: 10.2337/dc14-1296.
214. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M, Nolo R, Hyun E, Tao C et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; 8(1):27–36. doi: 10.1038/ncb1339.
215. Gusella JF, Ramesh V, MacCollin M, Jacoby LB. Merlin: the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1423(2):M29-36. doi: 10.1016/s0304-419x(99)00005-0.
216. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell* 2013; 154(6):1342–55. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.025.
217. Xiao L, Chen Y, Ji M, Dong J. KIBRA regulates Hippo signaling activity via interactions with large tumor suppressor kinases. *J Biol Chem* 2011; 286(10):7788–96. doi: 10.1074/jbc.M110.173468.
218. Lasota J, Wozniak A, Kopczynski J, Dansonka-Mieszkowska A, Wasag B, Mitsuhashi T et al. Loss of heterozygosity on chromosome 22q in gastrointestinal stromal tumors (GISTs): a study on 50 cases. *Lab Invest* 2005; 85(2):237–47. doi: 10.1038/labinvest.3700218.
219. Kino T, Takeshima H, Nakao M, Nishi T, Yamamoto K, Kimura T et al. Identification of the cis-acting region in the NF2 gene promoter as a potential target for mutation and methylation-dependent silencing in schwannoma. *Genes Cells* 2001; 6(5):441–54. doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00432.x.
220. Trofatter JA, MacCollin MM, Rutter JL, Murrell JR, Duyao MP, Parry DM et al. A novel moesin-, ezrin-, radixin-like gene is a candidate for the neurofibromatosis 2 tumor suppressor. *Cell* 1993; 72(5):791–800. doi: 10.1016/0092-8674(93)90406-G.
221. Gutmann DH, Giordano MJ, Fishback AS, Guha A. Loss of merlin expression in sporadic meningiomas, ependymomas and schwannomas. *Neurology* 1997; 49(1):267–70. doi: 10.1212/WNL.49.1.267.
222. Shao W, Li J, Piao Q, Yao X, Li M, Wang S et al. FRMD3 inhibits the growth and metastasis of breast cancer through the ubiquitination-mediated degradation

- of vimentin and subsequent impairment of focal adhesion. *Cell Death Dis* 2023; 14(1):13. doi: 10.1038/s41419-023-05552-2.
223. Wei Y, Chen Z, Zhang R, Wu B, Le Lin, Zhu Q et al. Blood circulating exosomes carrying microRNA-423-5p regulates cell progression in prostate cancer via targeting FRMD3. *J Cancer* 2022; 13(9):2970–81. doi: 10.7150/jca.71706.
224. Letunic I, Khedkar S, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 2021; 49(D1):D458-D460. doi: 10.1093/nar/gkaa937.
225. Curto M, McClatchey AI. Nf2/Merlin: a coordinator of receptor signalling and intercellular contact. *Br J Cancer* 2008; 98(2):256–62. doi: 10.1038/sj.bjc.6604002.
226. Scott C, Phillips GW, Baines AJ. Properties of the C-terminal domain of 4.1 proteins. *Eur J Biochem* 2001; 268(13):3709–17. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02276.x.
227. Maximov A, Tang TS, Bezprozvanny I. Association of the type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor with 4.1N protein in neurons. *Mol Cell Neurosci* 2003; 22(2):271–83. doi: 10.1016/s1044-7431(02)00027-1.
228. McCarty JH, Cook AA, Hynes RO. An interaction between $\alpha\beta_8$ integrin and Band 4.1B via a highly conserved region of the Band 4.1 C-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(38):13479–83. doi: 10.1073/pnas.0506068102.
229. Beekman JM, Bakema JE, van der Poel CE, van der Linden JA, van de Winkel JGJ, Leusen JHW. Protein 4.1G binds to a unique motif within the Fc gamma RI cytoplasmic tail. *Mol Immunol* 2008; 45(7):2069–75. doi: 10.1016/j.molimm.2007.10.024.
230. Cheng CL, Molday RS. Interaction of 4.1G and cGMP-gated channels in rod photoreceptor outer segments. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 24):5725–34. doi: 10.1242/jcs.137679.
231. Kanno T, Tsuchiya A, Tanaka A, Nishizaki T. The linoleic acid derivative DCP-LA increases membrane surface localization of the α_7 ACh receptor in a protein 4.1N-dependent manner. *Biochem J* 2013; 450(2):303–9. doi: 10.1042/BJ20121348.
232. Binda AV, Kabbani N, Lin R, Levenson R. D2 and D3 dopamine receptor cell surface localization mediated by interaction with protein 4.1N. *Mol Pharmacol* 2002; 62(3):507–13. doi: 10.1124/mol.62.3.507.
233. Shen L, Liang F, Walensky LD, Haganir RL. Regulation of AMPA receptor GluR1 subunit surface expression by a 4.1N-linked actin cytoskeletal association. *J. Neurosci.* 2000; 20(21):7932–40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.20-21-07932.2000.
234. Zhang S, Mizutani A, Hisatsune C, Higo T, Bannai H, Nakayama T et al. Protein 4.1N is required for translocation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type

- 1 to the basolateral membrane domain in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* 2003; 278(6):4048–56. doi: 10.1074/jbc.M209960200.
235. Coleman SK, Cai C, Mottershead DG, Haapalahti J-P, Keinänen K. Surface expression of GluR-D AMPA receptor is dependent on an interaction between its C-terminal domain and a 4.1 protein. *J. Neurosci.* 2003; 23(3):798–806. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-00798.2003.
236. Lu D, Yan H, Othman T, Turner CP, Woolf T, Rivkees SA. Cytoskeletal protein 4.1G binds to the third intracellular loop of the A1 adenosine receptor and inhibits receptor action. *Biochem J* 2004; 377(Pt 1):51–9. doi: 10.1042/BJ20030952.
237. Ralston KJ, Hird SL, Zhang X, Scott JL, Jin B, Thorne RF et al. The LFA-1-associated molecule PTA-1 (CD226) on T cells forms a dynamic molecular complex with protein 4.1G and human discs large. *J Biol Chem* 2004; 279(32):33816–28. doi: 10.1074/jbc.M401040200.
238. Rose M, Dütting E, Enz R. Band 4.1 proteins are expressed in the retina and interact with both isoforms of the metabotropic glutamate receptor type 8. *J Neurochem* 2008; 105(6):2375–87. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05331.x.
239. Yang Q, Liu J, Wang Z. 4.1N-Mediated Interactions and Functions in Nerve System and Cancer. *Front Mol Biosci* 2021; 8:711302. doi: 10.3389/fmolb.2021.711302.
240. Xue F, An C, Chen L, Liu G, Ren F, Guo X et al. 4.1B suppresses cancer cell proliferation by binding to EGFR P13 region of intracellular juxtamembrane segment. *Cell Commun Signal* 2019; 17(1):115. doi: 10.1186/s12964-019-0431-6.
241. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002; 420(6916):629–35. doi: 10.1038/nature01148.
242. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(1):32–9. doi: 10.1016/s0165-6147(00)01596-0.
243. Danesh FR, Sadeghi MM, Amro N, Philips C, Zeng L, Lin S et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(12):8301–5. doi: 10.1073/pnas.122228799.
244. Aaltonen P, Luimula P, Aström E, Palmén T, Grönholm T, Palojoki E et al. Changes in the expression of nephrin gene and protein in experimental diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2001; 81(9):1185–90. doi: 10.1038/labinvest.3780332.
245. Bonnet F, Cooper ME, Kawachi H, Allen TJ, Boner G, Cao Z. Irbesartan normalises the deficiency in glomerular nephrin expression in a model of diabetes and hypertension. *Diabetologia* 2001; 44(7):874–7. doi: 10.1007/s001250100546.
246. Langham RG, Kelly DJ, Cox AJ, Thomson NM, Holthöfer H, Zaoui P et al. Proteinuria and the expression of the podocyte slit diaphragm protein, nephrin, in diabetic nephropathy: effects of angiotensin converting enzyme inhibition. *Diabetologia* 2002; 45(11):1572–6. doi: 10.1007/s00125-002-0946-y.

247. Tossidou I, Teng B, Menne J, Shushakova N, Park J-K, Becker JU et al. Podocytic PKC- α is regulated in murine and human diabetes and mediates nephrin endocytosis. *PLoS One* 2010; 5(4):e10185. doi: 10.1371/journal.pone.0010185.
248. Tung C-W, Hsu Y-C, Shih Y-H, Chang P-J, Lin C-L. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2018; 23 Suppl 4:32–7. doi: 10.1111/nep.13451.
249. Lin C-L, Lee P-H, Hsu Y-C, Lei C-C, Ko J-Y, Chuang P-C et al. MicroRNA-29a promotion of nephrin acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25(8):1698–709. doi: 10.1681/ASN.2013050527.
250. van der Geer P. Analysis of protein-protein interactions by coimmunoprecipitation. *Methods Enzymol* 2014; 541:35–47. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00004-5.
251. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS, Chugh SS. Nephrin and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003; 112(2):209–21. doi: 10.1172/JCI18242.
252. Quack I, Rump LC, Gerke P, Walther I, Vinke T, Vonend O et al. β -Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(38):14110–5. doi: 10.1073/pnas.0602587103.
253. Kusunoki H, Kohno T. Solution structure and glycoporphin C binding studies of the protein 4.1R FERM α -lobe domain. *Proteins* 2009; 76(1):255–60. doi: 10.1002/prot.22405.
254. Nunomura W, Takakuwa Y, Tokimitsu R, Krauss SW, Kawashima M, Mohandas N. Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca^{2+} and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction. *J Biol Chem* 1997; 272(48):30322–8. doi: 10.1074/jbc.272.48.30322.
255. Quack I, Woznowski M, Potthoff SA, Palmer R, Königshausen E, Sivritas S et al. PKC α mediates β -arrestin2-dependent nephrin endocytosis in hyperglycemia. *J Biol Chem* 2011; 286(15):12959–70. doi: 10.1074/jbc.M110.204024.
256. 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. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00711.x.
257. Yang S, Guo X, Debnath G, Mohandas N, An X. Protein 4.1R links E-cadherin/ β -catenin complex to the cytoskeleton through its direct interaction with β -catenin and modulates adherens junction integrity. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1788(7):1458–65. doi: 10.1016/j.bbame.2009.03.022.
258. Khoshnoodi J, Sigmundsson K, Öfverstedt L-G, Skoglund U, Öbrink B, Wartiovaara J et al. Nephrin Promotes Cell-Cell Adhesion through Homophilic Interactions. *Am J Pathol* 2003; 163(6):2337–46. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63590-0.

259. Marfatia SM, Lue RA, Branton D, Chishti AH. In vitro binding studies suggest a membrane-associated complex between erythroid p55, protein 4.1, and glycophorin C. *J Biol Chem* 1994; 269(12):8631–4.
260. Marfatia SM, Leu RA, Branton D, Chishti AH. Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 1995; 270(2):715–9. doi: 10.1074/jbc.270.2.715.
261. Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, Walther Z, Chishti AH, Anderson JM et al. Human CASK/LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 1998; 142(1):129–38. doi: 10.1083/jcb.142.1.129.
262. Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG. Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actinin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(28):9814–9. doi: 10.1073/pnas.0504166102.
263. Doublier 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 glycosylated albumin and angiotensin II. *Diabetes* 2003; 52(4):1023–30. doi: 10.2337/diabetes.52.4.1023.
264. Gene: Frmd3 (ENSMUSG00000049122) - Summary - *Mus_musculus*; 2025 [Stand: 23.05.2025]. Verfügbar unter: https://www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000049122;r=4:73931679-74120451.

6 Anhang

2. How to Use this Product

High-Copy-Number Plasmids

- 1 Centrifuge bacterial cells from 30 to 150 ml *E. coli* culture grown in LB medium for 5 to 10 minutes at 3,000 to 5,000 × *g* at +2 to +8°C.
 - Discard the supernatant.
 - Carefully resuspend the pellet in 12 ml Suspension Buffer plus RNase and mix well.

- 2 Add 12 ml Lysis Buffer to the suspension and mix gently by inverting the tube 6 to 8 times.
 - Incubate 2 to 3 minutes at +15 to +25°C.

⚠ To avoid shearing genomic DNA, do not vortex the suspension in Lysis Buffer. To prevent release of chromosomal DNA from the cell debris, do not incubate for more than 5 minutes.

- 3 Add 12 ml chilled Neutralization Buffer to the suspension.
 - Immediately mix the suspension gently by inverting the tube 6 to 8 times until a homogeneous suspension is formed.
 - Incubate the tube 5 minutes on ice.

i The solution becomes cloudy and a flocculent precipitate forms.

- 4 Clear the lysate by either centrifugation or by filtration according to the following table.

Centrifugation	Filtration
Centrifuge at high speed for >45 minutes at >12,000 × <i>g</i> at +2 to +8°C.	Place a folded filter into a funnel that has been inserted into a 50 ml plastic tube.
Immediately and carefully, remove the supernatant from the white precipitate and proceed to Step 5.	Moisten the filter with a few drops of Equilibration Buffer or double-distilled water.
	Load the lysate onto the wet, folded filter and collect the flow through.

⚠ The SDS precipitates with cellular debris when Neutralization Buffer is added. This white precipitate should not be loaded onto the column since it will clog the column. If the solution obtained after Step 4 is not clear, remove the remaining precipitate by passing the solution over a folded filter.

- 5 Mount the sealing ring to the column (Fig. 1) to fix the column in the collection tube.
 - Insert one column into one collection tube.
 - Equilibrate the column with 6 ml Equilibration Buffer.
 - Allow the column to empty by gravity flow.
 - Discard the flow through.

- 6 Load the cleared lysate from Step 4 onto the equilibrated column.
 - Allow the column to empty by gravity flow.
 - Discard the flow through.

- 7 Wash the column with 16 ml Wash Buffer.
 - Allow the column to empty by gravity flow.
 - Discard the flow through.

- 8 Repeat Step 7.
 - Discard flow through and collection tube.

- 9 Insert the column into a new collection tube capable of withstanding high-speed centrifugation (≥15,000 × *g*).
 - Elute the plasmid with 15 ml prewarmed Elution Buffer (+50°C).
 - Allow the column to empty by gravity flow.
 - The collected flow through contains the plasmid.

2. How to Use this Product

- 10 Precipitate the eluted plasmid DNA with 11 ml isopropanol (equilibrated to +15 to +25°C).
 - Centrifuge immediately for 30 minutes at $\geq 15,000 \times g$ at +2 to +8°C.
 - Carefully discard the supernatant.

 - 11 Wash the plasmid DNA with 4 ml chilled (+2 to +8°C) 70% ethanol.
 - Centrifuge for 10 minutes at $> 15,000 \times g$ at +2 to +8°C.
 - Carefully remove ethanol from the tube using a pipette tip.
 - Air dry the plasmid DNA pellet for 10 minutes.

 - 12 Carefully dissolve the plasmid DNA pellet in 100 to 500 μ l TE buffer or sterile double-distilled water.
-

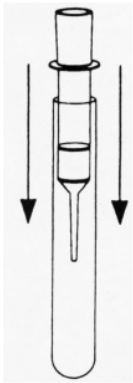


Fig. 1: Mounting the sealing ring to the column.

Sample Storage

If you plan to continue with your experiments, use the purified plasmid DNA immediately. If you want to analyze plasmid DNA at another time, store DNA at +2 to +8°C or -15 to -25°C.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf dem Weg zu dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben.

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

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. med. Eva Königshausen. Vielen Dank für die engagierte und zuverlässige Anleitung, für den unkomplizierten Austausch und die liebe Zusammenarbeit. Danke für deine ständige Erreichbarkeit und die konstante Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Ebenso danke ich Frau Blanka Duvnjak und Frau Nicola Kuhr für ihre ausgezeichnete technische Unterstützung, praktische Anleitung im Labor und die sehr angenehme Zusammenarbeit.

Ivonne Hegmann danke ich für die Durchsicht dieser Arbeit, die hilfreichen Korrekturen und die moralische Unterstützung.

Mein Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich in all den Jahren mit Geduld, Zuspruch und Verständnis begleitet haben. Besonders hervorheben möchte ich meine Mutter, Britta Matten, die in all den Jahren immer meine größte Unterstützerin und Fürsprecherin war. Danke, dass du mir in all den Jahren immer zur Seite gestanden hast und ich immer auf dich zählen kann.