

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

**Charakterisierung von Proteinen der glomerulären Schlitzmembran und
der glomerulären Basalmembran mittels Expansionsmikroskopie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christina Theresa Schmitz

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

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

Meinen Eltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Königshausen, E., Schmitz, C.T., Rump, L.C., Sellin, L., (2021), Imaging of Podocytic Proteins Nephrin, Actin, and Podocin with Expansion Microscopy. *Journal of visualized Experiments (JovE)*.

I. Zusammenfassung

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurde das FRMD3-Gen als Kandidatengen für diabetische Nephropathie identifiziert. Die diabetische Nephropathie erfährt dank der stetig steigenden Prävalenz an Diabetikern eine zunehmende Relevanz. Das FRMD3-Gen kodiert für das Strukturprotein 4.1O. Bisher wurde es in zahlreichen Zell- und Gewebetypen nachgewiesen. In der Arbeitsgruppe konnten bereits mehrere Splicevarianten identifiziert werden. Die Splicevarianten 201, 204, 207 sowie die Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin werden hier in COS7-Zellen transfiziert, überexprimiert und charakterisiert. Durch die Kolokalisation der Protein 4.1O Splicevarianten mit F-Aktin kann hier ebenfalls auf eine strukturelevante Funktion der Splicevarianten geschlossen werden, wie es bereits für andere Proteine der 4.1-Proteinfamilie beschrieben wurde. Die Kolokalisation der Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin bestätigt deren Funktion und Interaktion entlang der Schlitzmembran. Die Charakterisierung erfolgt hier mit einer neu etablierten Methode der Expansionsmikroskopie (ExM), welche das Diffraktionslimit des Lichtes durch physische Expansion der Probe in einem schwellbaren Hydrogel umgeht. Bei der Etablierung dieser neuen Methode wurden multiple Probleme und Schwachstellen identifiziert und gelöst.

II. Summary

In a genome wide association study the FRMD3 gene was identified as a candidate gene for diabetic nephropathy. Due to the increasing prevalence of diabetes, diabetic nephropathy becomes increasingly relevant. The FRMD3-gene encodes the structural protein 4.1O. Protein 4.1O has been detected and described in numerous cell- and tissue types. Several splice variants have already been described in our research group. In this study, the splice variants 201, 204, 207 as well as the slit diaphragm proteins nephrin and podocin are transfected and overexpressed in COS7-cells. The colocalization of the Protein 4.1O splice variants with F-actin suggests a structural function of Protein 4.1O, as already described for other proteins of the protein 4.1-family. The colocalization of the slit diaphragm protein nephrin and podocin confirms their function and interaction at the slit diaphragm. Characterization is performed using a newly established method called Expansion Microscopy (ExM), which circumvents the diffraction limit of light by physically expanding

the sample using a swellable hydrogel. During the process of establishing this new method, multiple challenges and pitfalls are identified and resolved.

III. Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamide
Arp2/3	Cortactin und Actin Related Protein 2/3 Complex
APS	Ammoniumpersulfat
A.d.	Aqua destillata
AcX	Acryloyl-X
BSA	Bovines Serum Albumin
BIS	N'-N'-Ethylenbisacrylamide
CaCl	Calcium Chlorid
CAPZ	Actin Filament Capping Protein
CD2AP	CD2-assoziertes Protein
Cdc42	Cell Division Cycle 42
CTD	C-terminale Domäne
Da	Dalton
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DKD	diabetische Nephropathie
DMAA	N'-N'-Dimethylacrylamide
DMEM	Dulbeccos Minimum Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK2	Extracellular-signal regulated Kinase 2
ERM-Protein	Ezrin-Radixin-Moesin-Protein
EtBr	Ethidiumbromid
ExM	Expansionsmikroskopie
E. Coli	Escherichia Coli
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FAT	Protocadherin FAT
FBS/FCS	Fetales Bovines Serum/fetal calf serum
FERM-Domäne	4.1-Protein-, Ezrin-, Radixin-, Moesin- Domäne

FRMD3	FERM Domain Containing 3
GA	Glutaraldehyde
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLEPP1	Designated Glomerular Epithelial
Protein 1	
HEBS	HEPES buffered Saline
iExM	iterative Expansionsmikroskopie
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IQGAP	IQ Motif Containing GTPase Activating Protein
kDA	Kilodalton
M	Molar
mM	Mikromolar
MA-NHS	N-(Methacryloxy)succinimide
MAP	Magnified Analysis of Proteome
MEM	Minimum essential Medium
ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natrium Chlorid
NBL4-Protein	Novel Band 4.1-like 4-Protein
ng	Nanogramm
NIFS	Ninefold Swelling
NO	Stickstoffmonoxid
N-WASp	neuronales Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
PALM	Photoactivated Localization Microscopy
PBS	Phosphate buffered Saline
PFA	Paraformaldehyde
ProExM	Protein Retention Expansion Microscopy
ProK	Proteinase K
PTBH-Protein	Proteintyrosinphosphatase-Protein

Rac1	Ras Related C3 Botulinum Toxin
	Substrate 1
RAS	Renin-Angiotensin-System
RhoA	Ras Homolog Family Member A
SA	Natrium Acrylat
SABD	Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne
SIM	Structured Illumination Microscopy
SOFI	Superresolution Optical Fluctuation Imaging
STED	Stimulated Emission Depletion
STORM	Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRITON	Trivalent Anchoring
LE	Low Endotoxin
LysC	Proteinase LysC
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLE	Very Low Endotoxin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
WASp	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
ZO-1	Zonula occludens 1
4-HT	4-Hydroxy-2,2,6,6- tetramethylpiperidinyloxy
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

IV. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die diabetische Nephropathie und ihre klinische Relevanz	1
1.1.1	FRMD3 – Kandidatengen bei diabetischer Nephropathie	1
1.2	Der glomeruläre Filter und die glomeruläre Schlitzmembran im allgemeinen Aufbau	1
1.3	Der Podozyt.....	2
1.3.1	Allgemeiner Aufbau	2
1.3.2	Das Aktinzytoskelett des Podozyten	2
1.3.3	Die podozytäre Schlitzmembran - <i>Signalling</i> und Funktion	3
1.3.4	Veränderungen bei diabetischer Nephropathie	5
1.4	Proteine der glomerulären Schlitzmembran.....	5
1.4.1	Nephrin	5
1.4.2	Proteinfamilie 4.1 und Protein 4.1O	6
1.4.2.1	Aufbau und Struktur	6
1.4.2.2	Bisherige Erkenntnisse über die Funktion von Protein 4.1 und 4.1O	7
1.4.3	Podocin	9
1.5	Super-Resolution Imaging	10
1.6	Begründung und Evolution der Expansionsmikroskopie	11
1.6.1	Funktionsweise der Expansionsmikroskopie	12
1.6.1.1	Sample Preparation bis Expansion Microscopy.....	12
2	ZIELSETZUNG	12
3	MATERIAL-UND METHODENTEIL	13
3.1	Material	13
3.1.1	Verbrauchsmaterialien und Hersteller	13
3.1.2	Geräte und Hersteller	14
3.1.3	Transformation	15
3.1.4	Mini- und Maxi-Kultur.....	15
3.1.4.1	Antibiotika und Stammlösungen für LB-Agarplatten	15
3.1.5	Maxi-Präparation mithilfe eines Fertigsystems	16
3.1.6	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	16

3.1.7	DNA-Elektrophorese	16
3.1.8	Zellkultur	16
3.1.8.1	Zellkultur	16
3.1.9	Transfektion und Lipofektion.....	18
3.1.9.1	Reagenzien	18
3.1.10	Immunfluoreszenz.....	18
3.1.10.1	Primärantikörper.....	19
3.1.10.2	Sekundärantikörper.....	20
3.1.10.3	Aktinfärbung.....	20
3.1.11	Expansionsmikroskopie.....	21
3.1.11.1	Puffer und Lösungen	22
3.1.12	Auswertung, Bildbearbeitung und Erstellen von Abbildungen	23
3.1.12.1	Software	23
3.2	Methoden	23
3.2.1	Transformation	23
3.2.2	Mini-Kultur.....	24
3.2.3	Maxi-Kultur	24
3.2.4	Maxi-Preparation	24
3.2.5	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	25
3.2.6	DNA-Elektrophorese	25
3.2.7	Zellkultur	25
3.2.7.1	Splitting und Versorgung der Zellen	25
3.2.7.2	Aussäen einer 6-/12-Well Platte:	26
3.2.7.3	Transfektion mit HEK293T-Zellen	26
3.2.7.4	Lipofektion mit COS7-Zellen	26
3.2.8	Immunfluoreszenz	27
3.2.9	Expansionsmikroskopie	28
3.2.9.1	Anchoring	28
3.2.9.2	Gelation	28
3.2.9.3	Digestion/Homogenisation	29
3.2.9.4	Expansion	30
3.2.9.5	Microscopy	30
3.2.10	Auswertung, Bildbearbeitung und Erstellen von Abbildungen	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Methodische Ergebnisse	32
4.1.1	Pitfalls und deren Lösung.....	32

4.1.1.1	Die Aktinfärbung mit Phalloidin ist ungeeignet für die Expansionsmikroskopie.....	32
4.1.1.2	Unzureichender Verdau behindert die Expansion	35
4.1.1.3	Unterschiedliche Bestimmung des Expansionsfaktors führt zu unterschiedlichen Ergebnissen	36
4.2	Inhaltliche Ergebnisse	38
4.2.1	Protein 4.10 Splicevarianten 207, 204, und 201 zeigen ein verschiedenes Expressionsmuster und kolokalisieren mit F-Aktin	38
4.2.2	Nephrin, Podocin und F-Aktin kolokalisieren.....	41
5	DISKUSSION.....	49
5.1	Methodische Diskussion	49
5.1.1	Signalverlust wird durch die Wahl der Fluorophore und das <i>Anchoring</i> beeinflusst. Die Färbung mit trifunktionalen Linkermolekülen ist der einfachen Immunfluoreszenzfärbung überlegen.	49
5.1.2	Die Aktinfärbung mit Phalloidin ist ungeeignet für die Expansionsmikroskopie	51
5.1.3	Unzureichender Verdau behindert die Expansion	52
5.1.4	Unterschiedliche Bestimmung des Expansionsfaktors führt zu unterschiedlichen Ergebnissen..	52
5.1.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	53
5.2	Inhaltliche Diskussion	54
5.2.1	Die Protein 4.10 Splicevarianten 207, 204, und 201 zeigen ein verschiedenes intrazelluläres Expressionsmuster und kolokalisieren mit F-Aktin	54
5.2.2	Nephrin, Podocin und F-Aktin kolokalisieren.....	54
5.2.3	Limitationen und Ausblick	55
6	ZUSAMMENFASSUNG	56
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	57
8	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	60

1 Einleitung

1.1 Die diabetische Nephropathie und ihre klinische Relevanz

Die weltweit häufigste Ursache des Nierenversagens unter Erwachsenen ist die diabetische Nephropathie (DKD), welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist (Qi et al., 2017; Thipsawat, 2021). Die fortbestehende Hyperglykämie bei Diabetikern führt zu mikroangiopathischen Veränderungen, u.a. zur Retinopathie, Neuropathie, und Nephropathie. Dabei ist die DKD eine der schwerwiegendsten und häufigsten Komplikationen bei Diabetikern (Samsu, 2021). Schätzungen zufolge beträgt 2030 die Anzahl an Diabetikern rund 439 Millionen Menschen weltweit (Thipsawat, 2021). Mit steigender Prävalenz an Diabetikern wird auch eine Steigerung an Patienten mit DKD erwartet (Samsu, 2021). 40% der Typ-2 Diabetiker entwickeln nach 10-jährigem Krankheitsverlauf eine DKD (Thipsawat, 2021). Klinisch äußert sie sich schon in frühen Stadien mit einer Mikroalbuminurie, wobei renale Schädigungen schon vor dem Auftreten einer (Mikro)Albuminurie existieren. Ein weiteres klinisches Kriterium der DKD ist ein progressiver Verlust der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Qi et al., 2017; Thipsawat, 2021).

1.1.1 FRMD3 – Kandidatengen bei diabetischer Nephropathie

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte das FRMD3-Gen, welches für das Protein 4.1O kodiert, als ein Kandidatengen für die DKD identifiziert werden. Dabei wurden verschiedene *single nucleotid polymorphism* (SNP) entdeckt, welche unterschiedlich stark mit einer DKD assoziiert sind und sich zwischen den untersuchten ethnischen Gruppen unterscheiden. Es gibt eine signifikante Assoziation zwischen den SNPs im FRMD3 Gen und der Ausbildung eines Nierenversagens auf dem Boden einer DKD (Buffon et al., 2015).

1.2 Der glomeruläre Filter und die glomeruläre Schlitzmembran im allgemeinen Aufbau

Der glomeruläre Filter befindet sich im Glomerulum, einem Kapillargefäßknäuel, welches durch ein afferentes Gefäß gespiesen wird, und durch ein efferentes Gefäß wieder verlassen wird. Die Bowman-Kapsel umhüllt das Glomerulum. Zwischen den Kapillaren und der Bowman-Kapsel liegt der Bowman-Raum, in den der Primärharn filtriert wird und zum

Tubulussystem überführt. Der glomeruläre Filter ist dreischichtig aufgebaut: Er besteht von innen nach außen aus fenestriertem glomerulärem Gefäßendothel, der negativ geladenen glomerulären Basalmembran, und der glomerulären Schlitzmembran. Die Schlitzmembran wird gebildet aus den interdigitierenden Fußfortsätzen der Podozyten, welche über Zell-Zell-Kontakte die Schlitzmembran bilden und über diese miteinander interagieren. Durch diese Anordnung bilden sie ein mechanisches Gitternetzwerk (Garg, 2018). Der gebildete Primärharn fließt über den Bowman-Raum weiter in den proximalen Tubulus. Kriterien der Filtration sind die elektrische Ladung, sowie die Molekülgröße. Plasmaproteine wie Albumin (69 kDa, negativ geladen) sind große Moleküle und passieren den glomerulären Filter in der Regel nicht. Die Filtration im Glomerulum erfolgt entlang eines osmotischen und eines hydrostatischen Gradienten.

1.3 Der Podozyt

1.3.1 Allgemeiner Aufbau

Der Podozyt besitzt einen Zellkörper, primäre und sekundäre Fortsätze, sowie den Fußfortsatz. Die Fußfortsätze sind über Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, welche die Schlitzmembran bilden, und haften über fokale Adhäsionskomplexe an der glomerulären Basalmembran (Garg, 2018). Der Fußfortsatz verfügt über ein dichtes kortikales Aktinnetzwerk. Der Zellkörper, sowie die primären und sekundären Fortsätze werden hauptsächlich durch Mikrotubuli und Intermediärfilamente stabilisiert (Pavenstadt et al., 2003). Podozyten sind nicht regenerations-, oder teilungsfähig (Kriz et al., 2013).

1.3.2 Das Aktinzytoskelett des Podozyten

Das Zytoskelett besteht aus zentralen Aktinbündeln und einem kortikalen Aktinnetzwerk (Huber & Benzing, 2005). Es ist für die mechanische Stabilität und Anpassungsfähigkeit des Fußfortsatzes unabdingbar. Zudem ist es an der Signaltransduktion des Podozyten und am vesikulären Transport von Proteinen innerhalb der Zelle beteiligt (Garg, 2018; Yu et al., 2018). Über ein Rearrangement der Aktinfilamente kann der Podozyt auf mechanische Beanspruchung reagieren, welche von den Kapillarwänden des Glomerulums auf ihn übertragen wird (Pavenstadt et al., 2003). Das kortikale Aktinzytoskelett bindet einerseits über $\alpha 3 \beta 1$ -Integrin und α -Dystroglykan an die glomeruläre Basalmembran (Barutta et al.,

2022), andererseits an den Proteinkomplex der Schlitzmembran, wie u.a. Nephtrin, Podocin, Neph 1-3 (Garg, 2018; Huber & Benzing, 2005; Patrakka & Tryggvason, 2007; Pavenstadt et al., 2003) sowie an Adaptermoleküle, wie CD2-assoziiertes Protein (CD2AP) oder Zonula Occludens-1 (ZO-1) und an aktinmodifizierende Proteine wie das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (Wasp), *Actin Filament Capping Protein* (CAPZ), Cortactin und *Actin Related Protein 2/3 Complex* (Arp2/3) (Faul et al., 2007; Huber & Benzing, 2005). Die Aktinpolymerisation wird über mehrere Kaskaden reguliert. Am besten untersucht ist der Einfluss von durch src-Kinasen phosphoryliertes Nephtrin, welches über den Nephtrin-Nck2-Komplex, über neurales Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (N-Wasp) und die Aktivierung von Arp2/3 die Aktinpolymerisation fördert (Faul et al., 2007; Jones et al., 2006). Eine weitere Kaskade erfolgt über den Nephtrin-CD2AP-Komplex, die Aktivierung von Synaptopodin und α -Actinin, welches das Bündeln der Aktinfasern beeinflusst (Faul et al., 2007). Außerdem wird die Aktinpolymerisation über GTPasen (G-Proteine) der Rho Familie (*Cell Division Cycle 42* (Cdc42), *Ras Homolog Family Member A* (RhoA), *Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1* (Rac1)) beeinflusst (Barutta et al., 2022; Pavenstadt et al., 2003). Das Zytoskelett ist der Ausgangspunkt für podozytäres *Effacement*: Bei podozytärem Stress und podozytärer Schädigung (durch z.B. genetische, autoimmune, infektiöse, toxische, metabolische, hämodynamische Ursachen) verlieren die Fußfortsätze ihre interdigitierende Form. Sie retrahieren und verbreitern sich. Zu Beginn sind diese Veränderung noch reversibel. Bei Persistenz der Schädigung retrahieren sich die Fußfortsätze zunehmend und irreversibel. Der Podozyt haftet ohne seine Fußfortsätze nur noch mit dem Zellkörper an der glomerulären Basalmembran (Barutta et al., 2022; Pavenstadt et al., 2003). Durch diese morphologische Veränderung geht die Barriere- und Filterfunktion verloren, es kommt zur Proteinurie. Podozyten sind nicht regenerations- oder teilungsfähig (Kriz et al., 2013). Podozyten sind u.a. auch am Ab- und Aufbau von Matrixproteinen der glomerulären Basalmembran beteiligt. Bei einem Verlust von Podozyten wird dieser Prozess dysreguliert und es kommt zu einer Verdickung und Sklerosierung der glomerulären Basalmembran (Barutta et al., 2022).

1.3.3 Die podozytäre Schlitzmembran - *Signalling* und Funktion

Die glomeruläre Schlitzmembran entsteht durch die Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Podozytenfußfortsätzen und ist ein dynamischer Multiproteinkomplex (s.

Abb. 1). Relevant ist die Schlitzmembran einerseits als Barriere und Filter, andererseits ist sie als Multiproteinkomplex an Prozessen des Podozyten beteiligt, welche das Zellüberleben, die Regulierung und Organisation des Aktinzytoskeletts, sowie die Zellpolarität regulieren (Huber & Benzing, 2005). Wichtige Bestandteile der Schlitzmembran sind u.a. die Transmembranproteine Nephrin, Podocin, Nephrin und das Protocadherin „FAT“, welche über Bindungen mit den extrazellulären Anteilen von Schlitzmembranproteinen benachbarter Fußfortsätze die Schlitzmembran bilden. Über den transmembranären und zytoplasmatischen Anteil kommunizieren sie mit Adapterproteinen, dem Aktinzytoskelett und Signalmolekülen (Barutta et al., 2022; Huber & Benzing, 2005). Mit der Zeit werden immer mehr relevante Proteine der Schlitzmembran identifiziert.

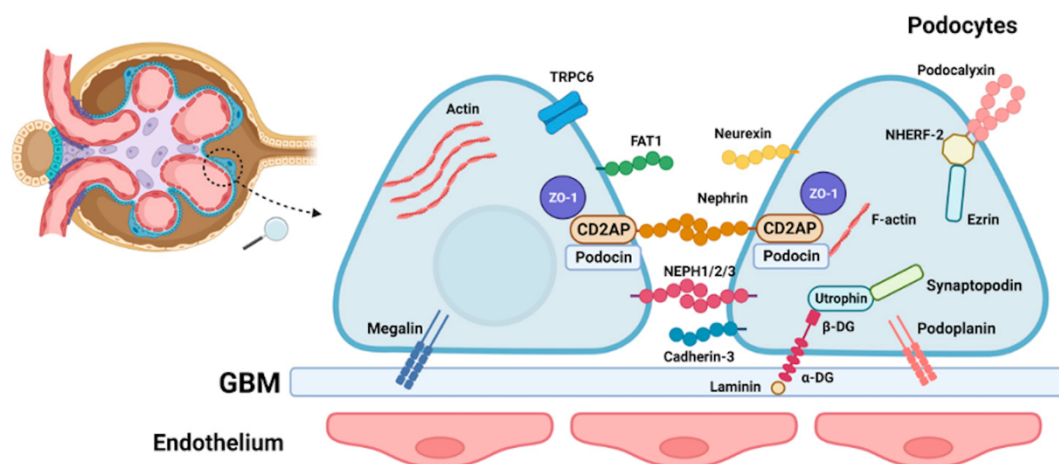


Abb. 1: **Schematischer Aufbau der glomerulären Basalmembran und der glomerulären Schlitzmembran.** Dem negativ geladenen, fenestrierten Endothel liegt die glomeruläre Basalmembran (GBM) auf. Die Podozytenfußfortsätze bilden mit den Transmembranproteinen die glomeruläre Schlitzmembran, hierzu gehören Nephrin, NEPH1/2, Podocin, Cadherin-3, Podoplanin. Laminin und Dystroglykan verbinden das Aktinzytoskelett des Podozyten mit der GBM. Weitere Proteine sind Utrophin, Synaptopodin für die Organisation des Zytoskeletts, NHERF-2 interagiert mit Nephrin und Podocin, FAT1 für Zelladhesion und Signalprotein, Zonula Occludens 1 Protein als Zellkontaktprotein. Aktin bildet das Zytoskelett des Podozyten. TRPC6 ist ein Ionenkanal. Übernommen aus: (Vaz de Castro et al., 2023) *Kidney Dial.* **2023**, 3(4), 346-372, published 12/2023, *Open Access* von mdpi.com

1.3.4 Veränderungen bei diabetischer Nephropathie

Am Glomerulum kommt es unter hyperglykämischen Bedingungen über vermehrte Sekretion vasoaktiver Substanzen wie *Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1), Glukagon, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und Stickstoffmonoxid (NO) und über die erhöhte Glukose-Natrium-Absorption im Tubulussystem zu einer Dilatation des Vas afferens mit dem Resultat einer Hyperfiltration. Die Hyperfiltration verstärkt die auf die Podozyten wirkenden Scherkräfte, welche eine Ablösung des Podozyten begünstigen (Barutta et al., 2022). Durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-System (RAS) und endotheliale Dysfunktion kommt es zudem zu einer Konstriktion im Vas efferens mit glomerulärer Hypertension. Die Hypertension erhöht die mechanischen Kräfte, welche auf die Fußfortsätze wirken. In den Podozyten induzieren sie Anpassungen der Zellmorphologie und des Aktinzytoskeletts. Es kommt auf molekularer Ebene u.a. zu einer Herunterregulierung von Nephrin und $\alpha 3$ -Integrin (Barutta et al., 2022). Weitere Faktoren führen bei glomerulärer Schädigung zu einer Ischämie, oxidativem Stress und Inflammation (Lin et al., 2018). In Nierenbiopsaten bei Patienten mit DKD sind die am häufigsten sichtbaren glomerulären Läsionen diffuse mesangiale Expansion und Verdickung der glomerulären Basalmembran. In 25 % der Patienten geht die diffuse mesangiale Expansion in eine noduläre glomeruläre Sklerose über, einer nodulären Ansammlung mesangialer Matrix, auch bekannt als „Kimmelstiel-Wilson“- Niere. Weitere, extraglomeruläre Veränderungen sind tubuläre Atrophie, interstitielle Entzündung, und tubulointerstitielle Fibrose (Qi et al., 2017).

1.4 Proteine der glomerulären Schlitzmembran

1.4.1 Nephrin

Nephrin ist eines der wichtigsten Proteine der glomerulären Schlitzmembran (Welsh & Saleem, 2010) und wurde 1998 erstmals beschrieben (Kestilä et al., 1998). Es ist ein 185-200 kDa großes, im Podozyten vorkommendes Protein der Immunglobulinfamilie. Es besitzt als Transmembranprotein acht extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Module, eine Fibronectin Typ III Domäne und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil (Patrakka & Tryggvason, 2007; Yu et al., 2018). Nephrin bindet mit dem intrazellulären Anteil über Adapter- und Signalmoleküle wie CD2AP und Nck1/2 (Jones et al., 2006; Patrakka &

Tryggvason, 2007) an das kortikale Aktinnetzwerk des Podozyten und hat Einfluss auf die intrazelluläre Signalgebung. Wie bereits dargestellt, ist Nephrin mit dem *podocyte effacement* assoziiert. Eine verminderte oder gestörte Nephrin Signalgebung kann durch eine verminderte Nephrin Phosphorylierung, vermehrte Nephrin Endozytose, genetisch bedingtem Funktionsverlust, oder Herunterregulierung bedingt sein. Ein Verlust der Nephrin Signalgebung wird beobachtet bei vielen Glomerulopathien, u.a. auch bei der DKD (Yu et al., 2018). Mutationen im für Nephrin kodierenden Gen NPHS1 führen zu einer schweren Proteinurie, dem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (Yu et al., 2018).

1.4.2 Proteinfamilie 4.1 und Protein 4.1O

1.4.2.1 Aufbau und Struktur

Protein 4.1O gehört zur Proteinfamilie der Bande 4.1 Proteine. Protein 4.1 wurde erstmal als Stabilisator des Spektrin-/Aktin Zytoskeletts in humanen Erythrozyten (Protein 4.1R) nachgewiesen (Hoover & Bryant, 2000). Mittlerweile sind eine Vielzahl an gewebe- und organspezifischen Subtypen, wie bspw. 4.1R in Erythrozyten, 4.1G (*general type*), 4.1N in Neuronen (*neuron type*), 4.1B im Gehirn (*brain type*), und 4.1O im Ovar (*ovary type*) bekannt (Diakowski et al., 2006; Ni et al., 2003). Protein 4.1O wurde im Rahmen einer Sequenzanalyse humaner cDNA Datenbanken erstmals beschrieben und im adulten Ovar, in fetalem Skelettmuskel, fetalem Thymus, und fetalem Gehirn nachgewiesen (Ni et al., 2003). Ramez et al. zeigten 2003 eine Expression der Protein 4.1 Varianten 4.1R, 4.1N, 4.1G und 4.1B in verschiedenen Kompartimenten der Niere. Damals konnte Protein 4.1 noch nicht im Podozyten nachgewiesen werden (Ramez et al., 2003).

Das 4.1O-Gen (FRMD3) besteht aus 14 Exonen und 13 Intronen und liegt auf dem Chromosom 9q21-9q22. Bisher wurden die Splicevarianten 201, 202, 204 und 207 identifiziert, welche verschiedene Größen aufweisen (s. Abb. 3). Die Splicevariante 207 misst 2312 Basenpaare und kodiert für ein Protein von 553 Aminosäuren (Ni et al., 2003). Die Proteine der 4.1 Familie gehören wiederum zur Familie der 4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM)-Proteine: Zu dieser Proteinfamilie gehören inzwischen 40 verschiedene Proteine, die sich in fünf Untergruppen einteilen lassen: 1. Die 4.1 Proteine, 2. Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)- Proteine, 3. Talin-related Proteine, 4. Proteintyrosinphosphatase

(PTBH)- Proteine und 5. (Novel Band 4.1-like 4) (NBL4)-Proteine (Diakowski et al., 2006). Allen Proteinen der 4.1-Superfamilie ist ein bestimmter Aufbau gemeinsam: Alle verfügen über eine N-terminale FERM-Domäne, eine Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne (SABD), und eine C-terminale Domäne (CTD) (s. Abb. 2). Die 30 kDa N-terminale FERM-Domäne besitzt eine N-(A), alpha-(B), und C-Bindestelle (C), über diese sie an zytoplasmatische Anteile von Transmembranproteinen binden kann. Die Spliceregionen bilden das N-terminale *Headpiece* (U1-Region), die U2- und U3-Region. Die *FERM-adjacent domain* (FA) ist eine Phosphorylierungsstelle (Baines et al., 2014). Die 8-10 kDa Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne bindet Spektrin und Aktin und fördert die Stabilisierung der Zellmembran. Sie kann über Serin- und Tyrosinreste phosphoryliert werden. Die 22-24 kDa C-terminale Domäne interagiert mit Proteinen der *tight-junctions* und des Translationsapparates (Diakowski et al., 2006).

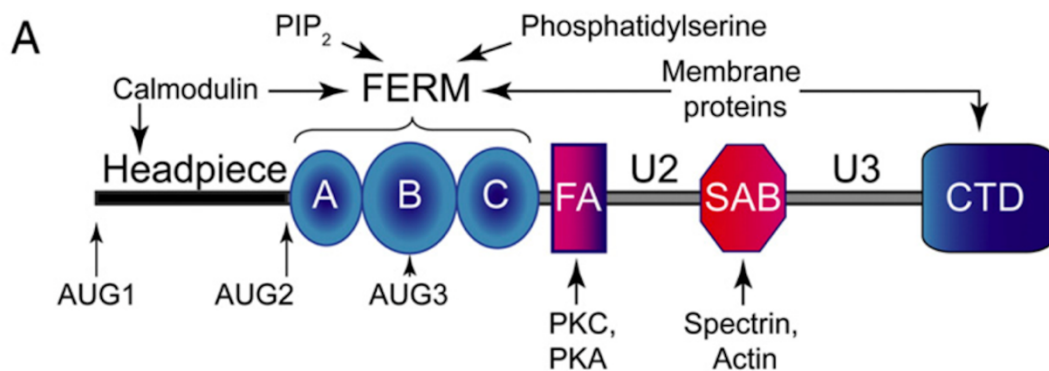


Abb. 2: **Genereller Aufbau Protein 4.1.** N-terminale, charakteristische FERM-Domäne mit drei Bindestellen, FERM-adjacent Domain (FA) als Phosphorylierungsstelle, Spektrin-Aktin-Bindungsstelle (SAB), C-terminale Domäne (CTD). Spliceregionen Headpiece (U1), U2 und U3. Übernommen aus: (Baines et al., 2014). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, *Elsevier*.

1.4.2.2 Bisherige Erkenntnisse über die Funktion von Protein 4.1 und 4.10

Bisher am besten beschrieben ist das Protein 4.1R im humanen Erythrozyten. Dort stabilisiert es durch die Bindung an das Aktin- und Spektrinzytoskelett die Zellmembran und ist für die mechanischen Eigenschaften und Erhaltung der bikonkaven Form des Erythrozyten unabdingbar. Des Weiteren interagiert es mit den Transmembranproteinen Glycophorin C, Band 3 und p55, welche ebenfalls die Zellstabilität beeinflussen (Diakowski

et al., 2006). Protein 4.1O gilt als Adapterprotein zwischen der Zellmembran und dem Zytoskelett (Hoover & Bryant, 2000). Protein 4.1O konnte in gesunden humanen Glomeruli nachgewiesen werden. Die Expression von Protein 4.1O ist erhöht in Nierenbiopsaten von Patienten mit DKD (Königshausen et al., 2022), (in Kooperation mit Prof. Dr. T. Wiech, UKE Hamburg-Eppendorf) sowie in Zellkulturen mit überaus glukosehaltigem Nährmedium (Bajraktarevic, 2024). Es wurden bereits mehrere Splicevarianten identifiziert (s. Abb. 3). In vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe konnte in Zellkulturen nachgewiesen werden, dass Protein 4.1O mit Nephrin, Neph1, *IQ Motif Containing GTPase Activating Protein* (IQGAP) und *Designated Glomerular Epithelial Protein 1* (GLEPP1) interagiert (Ohlsson, 2018). Auch konnte eine Expression im Mausglomerulum, sowie eine Kolo-kalisation von Protein 4.1O mit Nephrin und filamentösem (F)-Aktin bewiesen werden (Bajraktarevic, 2024). Die Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin ist abhängig vom Phosphorylierungszustand von Protein 4.1O und Nephrin, außerdem konnte eine reduzierte Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin bei p38- und ERK2-Inhibitor nachgewiesen werden (Bajraktarevic, 2024). Die funktionelle Relevanz von Protein 4.1O konnte in bislang unpublizierten Daten eines tierexperimentellen Ansatz an Zebrafischen gezeigt werden: Zebrafischlarven wurden gegen das FRMD3-Ortholog (*moe*) gerichtete morpholinos injiziert (*moe* Knockdown). Die *moe* Knockdown Zebrafischlarven zeigen einen nephrotischen Phänotyp mit Ödemen, Verlust der Schlitzmembran und vollständigem podozytären *Effacement* mit pathologischer glomerulärer Permeabilität. Nach Reexpression der Nephrin bindenden Domäne von humanem Protein 4.1O (AA 506-553) waren diese Veränderungen teilweise reversibel ((Königshausen et al., 2017), in Kooperation mit M. Schiffer (Erlangen)).

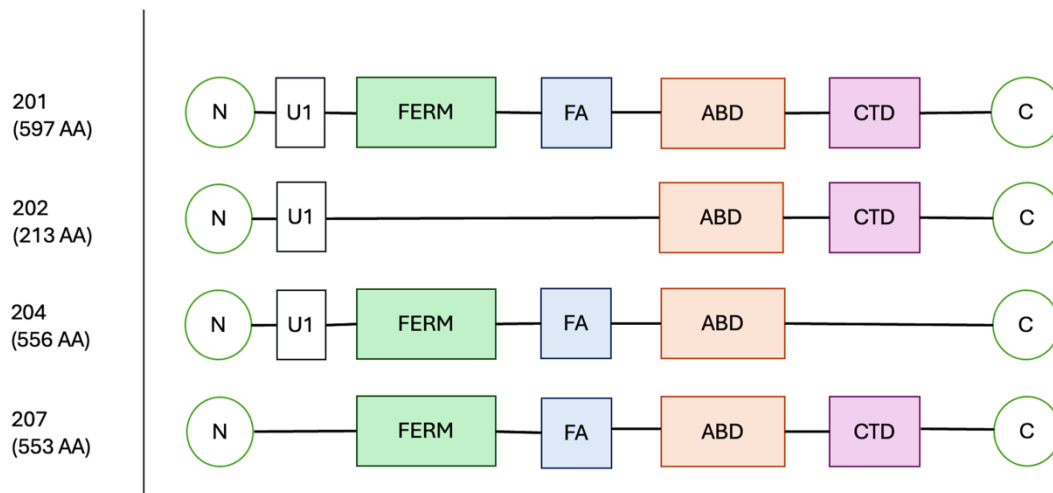


Abb. 3: **Schematische Darstellung der Protein 4.10 Splicevarianten 201, 202, 204, und 207.** Unpublizierte Daten und modifiziert nach Abbildung von Herrn Prof. Sellin, Heinrich Heine Universität, 2025.

1.4.3 Podocin

Podocin ist ein Protein der Stomatin Proteinfamilie und wird vom NPHS2 Gen kodiert. Podocin wurde bisher ausschließlich im Podozyten nachgewiesen (Boute et al., 2000). Es ist haarnadelförmig aufgebaut mit einer zytosolisch liegenden C- und N-terminalen Domäne und jeweils einer transmembranären Domäne (Huber & Benzing, 2005; Yu et al., 2018). Podocin ist ein Protein der glomerulären Schlitzmembran und interagiert u.a. mit dem intrazellulären Anteil von phosphoryliertem Nephrin und Nephr1. Die Interaktion von Podocin mit Nephr1 ist essenziell für die Rekrutierung von Nephrin zu sog. *Lipid rafts*, welche den Nephrin-Signalweg verstärken und aufrechterhalten (Huber et al., 2001; Yu et al., 2018). Zudem ist Podocin am intrazellulären Transport von Nephrin an die Membran beteiligt (Huber et al., 2003). Eine Mutation im NPHS2-Gen konnte bei Patienten mit autosomal-rezessivem, steroid-resistentem nephrotischen Syndrom nachgewiesen werden. Die Prohibin-homologe Domäne (DHB) des Podocin ist an der Aktivierung des TRCP6, einem unselektiven Kationenkanal beteiligt, welcher bei mechanischem Reiz aktiviert wird und zu einem intrazellulären Kalzium-Einstrom führt (Yu et al., 2018). Eine Aktivierung des Kalzium-Signalweges führt zu einer vermehrten Apoptose und Ablösung von Podozyten (Ilatovskaya & Staruschenko, 2015; Yu et al., 2018).

Kramer-Zucker et al. bewiesen an Zebrafischen die Relevanz der Strukturproteine Nephrin, Podocin und „*mosaic eyes*“, einem Band 4.1/FERM-Domäne Gen, für die glomeruläre

Schlitzmembran: Die Abwesenheit dieser Proteine führte zu einer fehlerhaften Ausbildung der Schlitzmembran und einem Funktionsverlust des glomerulären Filters in homozygoten Knockdown Zebrafischen (Kramer-Zucker et al., 2005).

1.5 Super-Resolution Imaging

Mit konventionellen Mikroskopen wird eine Auflösung von maximal 200 nm erreicht, limitiert durch die Wellenlänge des Lichtes (400 - 700 nm). Zur Darstellung von Strukturen kleiner als 200 nm muss auf alternative, hochauflösende Methoden zurückgegriffen werden. Aktuell gibt es eine Vielzahl an Methoden, welche man wie folgt gruppieren kann: Einzelmolekül-Lokalisierungsmethoden wie die *Photoactivated Localization Microscopy* (PALM) und *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (STORM) verwenden photoaktivierbare fluoreszierende Proteine oder organische Farbstoffe, welche durch Laserimpulse an- und abgeschaltet werden können. Nach einer stochastischen Auswertung entsteht ein hochaufgelöstes Bild (Betzig et al., 2006; Rust et al., 2006). Fluoreszenz-Fluktuationsbasierte Methoden wie die *Superresolution Optical Fluctuation Imaging* (SOFI) analysieren stochastische Helligkeitsschwankungen fluoreszierender Moleküle und rekonstruieren anhand dieser Daten ein hochaufgelöstes Bild (Dertinger et al., 2009). Illuminationsbasierte Methoden wie die *Structured Illumination Microscopy* (SIM) und *Stimulated Emission Depletion* (STED) nutzen spezielle Beleuchtungen der Proben. Bei der SIM werden Lichtmuster wie beispielsweise „Lichtgitter“ verwendet, welche mit jeder Aufnahme leicht verschoben werden (Gustafsson, 2000). Bei der STED werden zwei Laserpulse benutzt, mit denen zuerst Fluoreszenz angeregt wird und anschließend ein Teil der angeregten Fluoreszenz in der Peripherie wieder unterdrückt wird (Hell & Wichmann, 1994). Für die Implementierung der STED Mikroskopie erfolgte 2014 die Vergabe des Nobelpreises für Chemie an Stefan Hell. Die Elektronenmikroskopie nutzt Elektronenstrahlen anstelle von optischem Licht und erreicht damit eine molekulare Auflösung (Stahlberg & Walz, 2008). Die Expansionsmikroskopie (ExM) schafft es zwar nicht das Diffraktionslimit des Lichtes zu umgehen, trotzdem kann durch eine physikalische Vergrößerung der Probe eine Auflösung von unter 200 nm erreicht werden.

1.6 Begründung und Evolution der Expansionsmikroskopie

Die Expansionsmikroskopie wurde 2015 durch Boyden, Chen und Tillberg begründet (Chen et al., 2015): Alle bisher bekannten Formen des *Nano Scale Imaging* waren mit hohem Aufwand und Kosten verbunden, und damit nicht ubiquitär verfügbar. Die Expansionsmikroskopie schafft eine Möglichkeit, Aufnahmen mit einer Auflösung von ca. 70 nm an einem konventionellen Mikroskop zu erreichen. Zudem soll sie ubiquitär verfügbar, kostengünstig, und nicht an speziell ausgebildetes Personal gebunden sein. Prinzipiell wird bei der Expansionsmikroskopie nicht die Auflösung des Mikroskops verbessert, sondern die Probe selbst durch einen Expansionsprozess vergrößert. Chen et al. demonstrierten ihre Methode sowohl an Zellen (HEK 293) als auch an fixiertem Gewebe (Maus Hippocampus). Sie verglichen die gängige Methode einer hochauflösten Aufnahme (speziell „SR-SIM“) mit einer ExM-Expansionsaufnahme, angefertigt an einem konfokalen Mikroskop. Dabei zeigte sich, dass beide Methoden qualitativ und quantitativ vergleichbar sind. Chen et al. erreichten eine lineare Vergrößerung um den Faktor 4,5x entsprechend einer Auflösung bis 60-80 nm (Chen et al., 2015). Mit der „X10 ExM“ ist eine Vergrößerung um den Faktor 10 erreichbar, entsprechend einer Auflösung bis 25 nm (Truckenbrodt et al., 2019). Alle bisher bekannten Protokolle haben einen ähnlichen *Workflow: Sample Preparation, Staining, Anchoring, Gelation, Digestion/Homogenisation, Expansion, und Microscopy* (Chen et al., 2015). Bisher haben Verbesserungen der hochauflösenden Bildgebung zu einem Wissenszuwachs geführt, gerade im Bereich hochdetaillierter Strukturen wie dem Glomerulum und glomerulärer Strukturen (Garg, 2018). In der Diagnostik von Nierenbiopsaten und zur Evaluierung von ultrastrukturellen Veränderungen der Podozytenfußfortsätze kommt bisher die Elektronenmikroskopie zum Einsatz. Mit dem Einsatz der Expansionsmikroskopie (*Expansion Pathology, ExPath*) an Nierenbiopsaten kann hier der Podozytenfußfortsatz erfolgreich dargestellt werden. Die Untersuchung von Nierenbiopsaten mit ultrastrukturellen, glomerulären Veränderungen (wie Fokal segmentale glomeruläre Sklerose und Minimal Change Nephropathie) kann durch die ExM vergünstigt, vereinfacht und beschleunigt werden. Es werden jedoch weitere Studien nötig sein, um einen einheitlichen Standard zu etablieren (Bucur & Zhao, 2018).

1.6.1 Funktionsweise der Expansionsmikroskopie

1.6.1.1 *Sample Preparation bis Expansion Microscopy*

Für die hier verwendete Expansionsmikroskopie mit Zellen werden diese in 6-Well-Schalen auf Glasplättchen ausgesät und transfiziert. Anschließend wird die Probe nach einem üblichen Immunfluoreszenzprotokoll fixiert, permeabilisiert, und blockiert (*Staining*). Es wurden sequentiell mehrere Proteine gefärbt. Dazu wurden konventionell erhältliche Antikörper verwendet. Die Färbung gegen Aktin erfolgte mit dem ExM-kompatiblen Phalloidin „Aktin ExM“. Nach der Färbung der Zielproteine werden *Pre-Expansion* Aufnahmen aufgenommen, um einerseits das Färbeergebnis zu prüfen und andererseits markante Zellen und Zellstrukturen ausfindig zu machen, die sich nach der Expansion gut wiederfinden lassen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Linker Acryloyl-X (AcX). Die AcX-Moleküle stellen eine feste Verbindung her zwischen der Probe und dem Hydrogel. Bei der Aktinfärbung mit „Aktin-ExM“ erfolgte die Färbung und das *Anchoring* simultan. Für die *Gelation* wird ein Hydrogel hergestellt, welches auf die Probe gegeben wird. Das Gel besteht aus den Monomeren Acrylamide (AA) und Natrium Acrylat (SA) welche sich zu einer Polymerkette verbinden. Dazu kommt N-, N-Methylenbisacrylamid (BIS) als Cross-Linker, welches die Polymerketten zu einem Netzwerk verbindet. Tetramethylethyldiamid (TEMED) funktioniert als Katalysator, Ammoniumpersulfat (APS) als Initiator und 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (4-HT) als Inhibitor. Alle Komponenten verbinden sich zu einem Gelnetzwerk. An dieses Netzwerk binden die durch das AcX markierten Proteine und Antikörper. Die Gele werden anschließend mit Proteinase K (ProK) verdaut (*Digestion/Homogenisation*), damit bei der Expansion der Gele keine Risse entstehen. Die Expansion erfolgt etappenweise durch die Zugabe von ddH₂O auf die Gelproben. Zur näherungsweisen Bestimmung des Expansionsfaktor wird die Größe des Gels vor und nach der Expansion verglichen. Für die genaue Bestimmung des Expansionsfaktors erfolgt die Auswertung mit dem Mikroskop.

2 Zielsetzung

Es erfolgt eine Unterteilung in einen „methodischen“ und einen „inhaltlichen“ Teil, welche jeweils unterschiedliche Ziele verfolgen. Den Schwerpunkt dieser Arbeit stellt der methodische Teil dar. Die relativ neue und gut zugängliche Methode der

Expansionsmikroskopie soll etabliert werden. Dabei sollen mögliche Fehlerquellen ausgemacht und mit Hilfe der aktuellen Literatur adressiert und gelöst werden. Das Ziel ist methodisch einen übersichtlichen, reproduzierbaren Ablauf zu schaffen, der auch in Zukunft Anwendung findet und auch von unerfahrenen Personen durchgeführt werden kann. Des Weiteren soll methodisch eine komplexe Dreifachfärbung der Proteine Podocin, Nephrin und Aktin erreicht werden. Inhaltlich soll Protein 4.1O weiter charakterisiert werden. Dazu werden die in der Arbeitsgruppe bereits gewonnenen Erkenntnisse zusammengeführt (Bajraktarevic, 2024; Ohlsson, 2018): Die Interaktion von Protein 4.1O mit G-Aktin wurde bereits in Interaktionsstudien nachgewiesen, genauso wie die Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin und mit Nep1 (Ohlsson, 2018). Mittels Immunfluoreszenz wurde bereits eine Kolo-kalisation von Protein 4.1O und F-Aktin in 4.1O-überexprimierten Zellen bildlich dargestellt (Bajraktarevic, 2024). In dieser Arbeit sollen die Expressionsmuster der verschiedenen Splicevarianten 207, 204 und 201 dargestellt und analysiert werden. Ebenso soll deren Interaktion mit F-Aktin untersucht werden. Mithilfe der o.g. Dreifachfärbung soll die Expression und Kolo-kalisation der Schlitzmembranproteine Nephrin und Podocin mit F-Aktin untersucht und charakterisiert werden.

Folgende methodische und inhaltliche Fragestellungen leiten sich daraus konkret ab:

1. Welche Form der Aktinfärbung ist geeignet für die ExM?
2. Wie wirkt sich ein unzureichender Verdau auf die Ergebnisse der ExM aus?
3. Wie unterscheidet sich der Expansionfaktor in Abhängigkeit der Bestimmungsmethode?
4. Wie ist das subzelluläre Verteilungsmuster der unterschiedlichen Protein 4.1O Splicevarianten?
5. Kolo-kalisieren alle Protein 4.1O Splicevarianten mit F-Aktin?
6. Kolo-kalisieren die Schlitzmembranproteine Podocin, Nephrin und Aktin in der ExM?

3 Material-und Methodenteil

3.1 Material

3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Corning® 10 cm Kulturschalen	Corning GmbH, Corning, NY, USA
6 Well Kulturplatten	Corning GmbH, Corning, NY, USA
6 Well Kulturplatten mit Glasboden	Cellvis, Mountain View, CA, USA
12 Well Kulturplatten	Corning GmbH, Corning, NY, USA
1,5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf SE, Hamburg, DE
2 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf SE, Hamburg, DE
5 ml Eppendorf Tubes	Eppendorf SE, Hamburg, DE
15 ml FALCON™	Corning GmbH, Corning, NY, USA
50 ml FALCON™	Corning GmbH, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen, versch. Größen	StarLab GmbH, Hamburg, DE
Filterspitzen versch. Größen	StarLab GmbH, Hamburg, DE
UVette®	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Diamantstift	VWR, Darmstadt, DE
Marderhaarpinsel	Aulitzky-Leonhardy GmbH, Nürnberg, DE

3.1.2 Geräte und Hersteller

Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Pipettierhilfe	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Sterilbank Herasafe™	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschrank HeraCell™ 150	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Photometer	Eppendorf SE, Hamburg, DE
Magnetrührer „IKA® ret basic“	IKA-Werke, Staufen, DE

Ultrazentrifuge „Optima MAX-XP“	Beckmann Coulter Life Sciences, Krefeld, DE
---------------------------------	---

Vortex Mischer „ZX3“	Velp Scientifica, Usmate, ITA
----------------------	-------------------------------

Präzisionswaage „572“	Kern & Sohne, Balingen, DE
-----------------------	----------------------------

3.1.3 Transformation

E. Coli MC 1061 mit P3	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
------------------------	---

E. Coli MC 1060 ohne P3	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
-------------------------	---

3.1.4 Mini- und Maxi-Kultur

LB Broth Base	Invitrogen, Waltham, MA, USA
---------------	------------------------------

“Lennox L Broth Base”

LB Broth with Agar (Lennox)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
-----------------------------	-----------------------------------

LB Medium mit Ampicillin	0,1 mg/ml Ampicillin in LB-Medium
--------------------------	-----------------------------------

LB Medium mit Ampicillin/Tetracyclin	0,025 mg/ml Ampicillin und 0,0075 mg/ml Tetracyclin in LB-Medium
--------------------------------------	--

LB-Medium mit Kanamycin	0,05 mg/ml Kanamycin in LB-Medium
-------------------------	-----------------------------------

3.1.4.1 Antibiotika und Stammlösungen für LB-Agarplatten

Ampicillin Stammlösung	10 mg/ml in A.d.
------------------------	------------------

Tetracyclin Stammlösung	1 mg/ml 1:1 in A.d. und Ethanol
-------------------------	---------------------------------

Kanamycin Stammlösung	0,5 mg/ml in A.d.
-----------------------	-------------------

3.1.5 Maxi-Präparation mithilfe eines Fertigsystems

Maxi Prep Kit	Qiagen, Hilden, DE
---------------	--------------------

3.1.6 Verdau mit Restriktionsenzymen

Mlu I	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Not I	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Lambda-Marker	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
100-Basenpaar-Marker	New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Orange G	Merck, Darmstadt, DE

3.1.7 DNA-Elektrophorese

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
1% Agarose Gel	1g Agarose 100 ml 1x TAE-Puffer 4 Tropfen EtBr 0,0025%

3.1.8 Zellkultur

3.1.8.1 Zellkultur

VLE Dulbecco's MEM w 3.7 g/L NaHCO ₃ , w 4.5 g/L D-Glucose, w stable glutamine, w Na-Pyruvate, Very Low Endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
VLE Dulbecco's MEM w 3,7 g/L NaHCO ₃ , w 1,0 g/L D-Glucose, w stable Glutamine, Low Endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca ²⁺	Biochrom GmbH, Berlin, DE
PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺ , Low Endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Dulbecco's MEM Medium with 4,5 g/l Glucose, stable Glutamine, Sodium pyruvate, 3,7 g/L NaHCO ₃	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Dulbecco's MEM Medium with 1,0 g/l Glucose	PAN Biotech, Aidenbach, DE
DPBS, w/o Calcium, w/o Magnesium	PAN Biotech, Aidenbach, DE
D-Mannitol	ICN Biomedicals, Irvine, CA, USA
Opti-MEM™ 1x Reduced Serum Medium	Gibco, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamine 2000™ Transfection Reagent	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

Fetales Kälber Serum (FCS)

Biochrom GmbH, Berlin, DE

3.1.9 Transfektion und Lipofektion

3.1.9.1 Reagenzien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure (HEPES)-buffered saline (HEBS)

steril filtriert, Lagerung bei -20 °C

0,35 M NaCl

0,06M HEPES

1,48 mM Na₂HPO₄

pH 7,05-7,12

Calciumchlorid (CaCl) 0,25 M

steril filtiert, Lagerung bei -20 °C

3.1.10 Immunfluoreszenz

4 % Paraformaldehyde (PFA) in PBS

Affymetrix Inc. Cleveland, OH, USA

4 % Paraformaldehyde (PFA) in PBS

Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA

10% Triton X-100

5 ml Triton-X-100 auf 50 ml A.d.

Bovines Serum Albumin, lyophilisiert,
proteasefrei

ESTER Technopole, Limoges, FRA

PBS Puffer

136,89 mM NaCl

2,60 mM KCl

4,28 mM Na₂HPO₄

1,46 mM KH₂PO₄

ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Obektträger UniMark®	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, DE
Runde Deckgläser (12 mm Durchmesser)	VWR International GmbH, Radnor, PA, USA
Deckgläser 24 x 32 mm (#1.0)	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, DE
“Menzel” Deckgläser 24 x 24 mm (#1.5)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
<i>3.1.10.1 Primärantikörper</i>	
Anti-FRMD3 (D-16) goat Polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA
Anti-Nephrin, guinea-pig	Acris GmbH, Heidelberg, DE
Anti-Nephrin	ORIGENE, Rockville, MD, USA
Anti-Podocin Antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Anti-V5-Antibody	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.10.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor™ 488 chicken anti-goat IgG	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 488 goat anti-guinea pig IgG	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-guinea pig IgG (H+L), CF 633, highly cross-adsorbed Antibody produced In Donkey	Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA
Alexa Fluor™ 555 goat anti-mouse IgG	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 555 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 633 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

3.1.10.3 Aktinfärbung

Texas Red™ X-phalloid	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor™ 594 phalloidin	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Phalloidin Atto 647N	Sigma Aldrich, St. Louis, MI, USA

Alexa Fluor™ 546 Phalloidin	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Actin ExM 546	Chrometra, Leuven, BE
mRuby2-LifeAct7	Addgene, Watertown, MA, USA
mRuby2-Actin-7	Addgene, Watertown, MA, USA
mRuby2-Actin-18	Addgene, Watertown, MA, USA

3.1.11 Expansionsmikroskopie

Natrium Bikarbonat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Acryloyl-X, SE	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA Stock: 10 mg/ml in DMSO, -20°C
Natrium Acrylat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
N,N`-Methylenbisacrylamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Acrylamid > 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, DE
N´-N´-N´-N´- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth AG, Arlesheim, CH
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA

Guanidinhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Methacrylsäure-N-hydroxysuccinimid-Ester (MANHS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Parafilm, Laboratory Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	0,5M, pH 8,0
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	1M, pH 8,0
Proteinase K, Molecular Biology Grade	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.1.11.1 Puffer und Lösungen

Anchoring Buffer	NaHCO ₃	150 mM
	Acryloyl-X (AcX)	0,1 mg/ml
Monomer Solution 100 ml	Natrium Acrylat	8,6 g/100 ml
	Acrylamid	2,5 g/100 ml
	N'-N'-Methylenbisacrylamid	0,15 g/100 ml
	Natriumchlorid	11,7 g/100 ml
	PBS pH 7,4 (10x)	10,6 ml/100 ml
	A.d.	auffüllen
Gelling Solution 200 µl/Slide	Monomer Solution	190 µl/200 µl
	TEMED	4 µl (0,1 mg/ml)
	APS	4 µl (0,1 mg/ml)
	A.d.	2 µl/200 µl

Digestion Buffer	TRIS	1M
	EDTA	0,5M
	Guanidin HCl	8M
	Triton X-100	0,005%
	Proteinase K	400 U/ml
	A.d. zum auffüllen	

3.1.12 Auswertung, Bildbearbeitung und Erstellen von Abbildungen

3.1.12.1 Software

Visi View	Visitron Systems GmbH, Puchheim, DE
ImageJ, Version 1.54g	Wayne Rasband, National Institute of Health, MD, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Transformation

Zur Transformation wurden chemisch kompetente E. Coli MC 1061 mit P3, und MC 1061 ohne P3 aufgetaut. MC 1061 mit P3 besitzt Resistenzen gegen Ampicillin und Tetrazyklin, MC 1061 ohne P3 besitzt Resistenzen gegen Ampicillin. Von den verwendeten Plasmiden wurden jeweils 100 ng in ein Mikroreaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden 50 µl des passenden Bakteriums gegeben und vorsichtig vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte für 5 Minuten eine Inkubation auf dem Thermomixer bei 37 °C, und danach eine kurze Inkubation auf Eis. Die transformierten Bakterien wurden anschließend auf LB-Agar Platten mit den entsprechenden Resistenzen ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne, über Nacht gewachsene Kolonien, wurden am nächsten Tag „gepickt“ und in Mini-Kulturen transferiert.

3.2.2 Mini-Kultur

Entsprechend der Resistenz des Plasmids wurde das LB-Medium gewählt und in 15 ml Falcons vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurden einzelne Kolonien gepickt. Die Spitze wurde mit im LB-Medium versenkt. Bei 37°C schütteln die Minikulturen bei 220 U/min mindestens acht Stunden bis eine Trübung zu erkennen ist.

3.2.3 Maxi-Kultur

Je Maxi-Kultur werden 200 ml LB-Medium der richtigen Resistenz benötigt. Je 200-400 µl der Mini-Kultur wurden in die Maxi-Kultur überführt. Die Maxi-Kulturen schütteln bei 37°C über Nacht bei 220 U/min.

3.2.4 Maxi-Preparation

Die Isolierung der nun vervielfältigten Plasmid-DNA erfolgt mithilfe des „Maxiprep-Kit“ von Qiagen. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt. Dazu wurde zuerst das Bakteriengemisch der Maxi-Kultur zentrifugiert (2971 g, mindestens 15 Minuten, 4°C). Nach vorsichtigem Abgießen des Überstand wurde das Pellet in 10 ml gekühltem P1-Puffer resuspendiert und in ein 50-ml Falcon überführt. Anschließend wurden 10 ml P2-Puffer hinzugefügt und durch Hin- und Herschwenken vermischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Eine blaue Verfärbung implizierte hier eine erfolgreiche Vermischung. Nach Hinzugabe von 10 ml P3-Puffer und Mischen durch Hin- und Herschwenken sollte sich die Mischung wieder entfärbt haben. Danach erfolgte die Inkubation auf Eis für 20 Minuten und anschließend eine erneute Zentrifugation (2971 g, 1 Stunde, 4°C). Der Überstand wurde in ein 50 ml Falcon überführt und über ein Säulensystem mit Puffern gewaschen (2x 30 ml QC-Puffer) und eluiert (1x 15 ml QF-Puffer). Das Eluat wurde mit 10,5 ml 100%-igem Isopropanol vermischt und erneut zentrifugiert (2971 g, 1 Stunde, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet mit 5 ml 70%-igem Ethanol vermischt. Nach einer erneuten Zentrifugation (2971 g, 20-30 Minuten, 4°C) wurde wieder der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Morgen wurde das getrocknete Pellet in 200 µl *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) H₂O vorsichtig aufgelöst. Die Endkonzentration des Plasmid wurde mit dem Photometer bestimmt und je nach Bedarf verdünnt.

3.2.5 Verdau mit Restriktionsenzymen

Zur Prüfung der vervielfältigten Plasmide und zum Abgleich der Basenpaare wurde ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Dazu wurden in einem Mikroreaktionsgefäß je 1-1,5 µg Plasmid-DNA, 1 µl des passenden Restriktionsenzym und 2 µl eines 10x-Puffer gemischt, und mit HPLC H₂O auf 20 µl aufgefüllt. Es erfolgte anschließend eine Inkubation für eine Stunde auf dem Thermomixer bei 37 °C. Danach wurden 5 µl Orange G zur Detektion hinzugegeben.

3.2.6 DNA-Elektrophorese

Bei der DNA-Elektrophorese werden die durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 1% Agarosegele verwendet: 100 ml einfacher Tris-Acetat-EDTA (TAE)- Puffer wurden mit 1 g Agarose versetzt und so lange erhitzt, bis die Agarose geschmolzen war. Der Lösung wurden anschließend 4 Tropfen 0,025%-iger Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer überführt und in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Die Elektrophoresekammer wurde mit einfachem TAE-Puffer und EtBr gefüllt. Die DNA-Proben wurden in die Taschen des Elektrophoresegels geladen. Ebenso ein Lambda-Marker und 100 Basenpaar-Marker. Die Kammer wurde verschlossen und eine Spannung von 90 Volt angelegt. Nach ca. 30-45 Minuten, abhängig von der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße, waren die DNA-Fragmente aufgeteilt.

3.2.7 Zellkultur

3.2.7.1 Splitting und Versorgung der Zellen

Die Zellen wurden bei 37 °C im Inkubator bebrütet. Alle 48 Stunden wurden die Zellen gesplittet und mit neuem *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) Medium (4,5 g/L D-Glucose, 10% FCS) versorgt. Hierzu wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 5 ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) gespült. Um die Zellen abzulösen wurde 1 ml Trypsin hinzugegeben. Für fünf Minuten wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach kurzer Überprüfung am Mikroskop, ob sich alle Zellen gelöst haben, wurden die Zellen durch vorsichtiges pipettieren im Trypsin vereinzelt. Weiterhin adhärente Zellen wurden durch seitliches Beklopfen der Schale gelöst. Anschließend wurde bemessen am Split-

Verhältnis in der Regel 5-10 ml neues DMEM Medium hinzugegeben, und die Zellen darin nochmals vereinzelt. In der Regel wurde ein Splitverhältnis von 1:6-1:8 gewählt. Je 1 ml des Zellgemisches wurde in je eine neue 10 cm-Schale überführt, in welche bereits 8-10 ml DMEM Medium vorgelegt wurden. Zuletzt wurden die Zellen durch gleichmäßige Bewegungen der Schalen in dieser verteilt und erneut für 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Dieses Schema wurde für HEK293T- und COS7-Zellen gleichermaßen verwendet.

3.2.7.2 Aussäen einer 6-/12-Well Platte:

Zuerst wurde das Well vorbereitet: Dazu wurde in jedes Well ein rundes Glasplättchen (12 mm Durchmesser, #1,5) gelegt, auf dem die Zellen wachsen sollen. Die Wells wurden entsprechend der verwendeten Plasmide beschriftet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben gesplittet. Zum Aussäen wurde ein höheres Split-Verhältnis gewählt, damit die Zellen nicht zu nah aneinander liegen. Aufgrund des kleineren Durchmessers eines Wells wurde der Zellteil in einem Falcon mit DMEM Medium (4,5 g/l Glucose, 10 % FCS) um den Faktor 1:14 (12-Well), bzw. 1:5, oder 1:6 (6-Well) nochmals verdünnt. Je 1 ml des Zellgemisch wurde in jedes Well gegeben. Innerhalb der nächsten 12-15 Stunden wurden die Zellen transfiziert.

3.2.7.3 Transfektion mit HEK293T-Zellen

Pro Well wurden 1 µg DNA in 100 µl Calciumphosphatgemisch (50 µl CaCl + 50 µl 2x HEBS) transfiziert. Die DNA wurde in Mikroreaktionsgefäße vorgelegt. Zuerst wurden 50 µl CaCl hinzugegeben, anschließend 50 µl 2x HEBS langsam unter Verwendung des Vortex dazugetröpfelt. Danach wurde das Gemisch (100 µl/Well) auf die Zellen gegeben und bei 37°C für 24 Stunden inkubiert. 6-8 Stunden nach der Transfektion wurde das DMEM Medium gewechselt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und pro Well 1 ml frisches Medium vorsichtig hinzugegeben.

3.2.7.4 Lipofektion mit COS7-Zellen

Pro Well wurden 1,0 µg DNA eines Plasmids transfiziert. Bei einer Transfektion von zwei Plasmiden zugleich wurden insgesamt nicht mehr als 1,5 µg DNA/Well transfiziert.

Es wurden in Mikroreaktionsgefäßen zwei Ansätze erstellt, diese wurden Ansatz A und Ansatz B genannt. Ansatz A enthält für jedes Well 1 µg DNA und 100 µl Opti-MEM Medium.

Ansatz B enthält für jedes Well 2 µl Lipofectamin und 100 µl Opti-MEM Medium. Das Verhältnis von DNA-Menge zu Lipofectamine betrug 1:2. Ansatz B kann für mehrere Wells gepoolt werden. Die DNA wurde in Ansatz A vorgelegt und die entsprechende Menge des Opti-MEM Medium hinzugegeben. Lipofectamin wurde vorgelegt und die entsprechende Menge des Opti-MEM Medium hinzugegeben. Ansatz A und B wurden für fünf Minuten separat bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden Ansatz A und B zusammengeführt und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Pro Well wurden 200 µl des Gemisch vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C für 48 Stunden. Es erfolgte anders als bei der Calciumphosphattransfektion kein Mediumwechsel nach 6-8 Stunden. Die Transfektionseffizienz ist von vielen verschiedenen Faktoren abhängig und für jedes transfizierte Protein unterschiedlich. Bei der Transfektion mehrerer Plasmide konkurrieren diese um die Aufnahme in die Zelle. Aufgrund dessen wurden stabil mit Nephrin transfizierte COS7-Zellen verwendet, um höhere Proteinmengen von z.B. Protein 4.1O transfizieren zu können.

3.2.8 Immunfluoreszenz

Die zuvor ausgesäten Zellen wurden für die Immunfluoreszenz verwendet. Zuerst wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob nach der Transfektion genug adhärenente Zellen in jedem Well vorhanden sind. Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Fixiert wurde mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gespült, um PFA Restbestände zu entfernen. Permeabelisiert wurde mit 0,5 % Triton X-100 für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurde zweimal mit PBS gespült. Geblockt wurde mit 5% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Die verwendeten Antikörper wurden in Mikroreaktionsgefäßen im gewünschten Verhältnis in 1% BSA in PBS gemischt, pro Well wurden 200 µl verwendet. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Primärantikörper wurde abpipettiert und die Zellen dreimal mit PBS gespült, anschließend wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde abpipettiert und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Phalloidin wurde analog zu den Antikörpern im gewünschten Verhältnis in 1% BSA in PBS gemischt. Die Aktinfärbung mit Phalloidin

erfolgte für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Phalloidin wurde abpipettiert und die Zellen dreimal mit PBS gespült. Die Glasplättchen wurden aus den Wells auf den Objektträger transferiert, hierzu wurde der Objektträger mit einem Bleistift entsprechend beschriftet und mittig mit einem Tropfen Eindeckmittel versehen. Die Glasplättchen wurden mit Hilfe einer Kanüle vorsichtig angehoben und unter Zuhilfenahme einer Pinzette aus den Wells gehoben und auf den Objektträger in das Eindeckmittel gelegt. Anschließend wurden sie flach liegend über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet. Aufbewahrt wurden die Objektträger lichtgeschützt bei 4 °C.

3.2.9 Expansionsmikroskopie

Die Zellen wurden in 6 Well Schalen auf 12 mm runde Glasplättchen (#1,5) ausgesät. Transfektion und Immunfluoreszenz mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgten wie bereits beschrieben.

3.2.9.1 Anchoring

Acryloyl-X (AcX) wurde aufgetaut und 1:100 (Endkonzentration 0,1 mg/ml) im Anchoring Buffer (150 mM NaHCO₃, pH 8,5) verdünnt. Pro Well wurden 250 µl *Anchoring Buffer* verwendet und die Zellen damit mindestens 2-3 Stunden, alternativ über Nacht bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gespült. Die Aktinfärbung erfolgte anschließend mit Actin-ExM (5 µl Actin ExM + 195 µl BSA 1 %/Well, 1:40) für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Actin ExM wurde abpipettiert und die Zellen nach der Aktinfärbung einmal mit PBS gewaschen. Es wurde direkt mit der *Gelation* fortgefahren.

3.2.9.2 Gelation

Zur Vorbereitung der Gelkammer wurden Eindeckgläser in #1.0 und #1.5 Dicke mit einem Diamantstift in gleichmäßige Streifen geschnitten. Diese Streifen bilden die seitliche Begrenzung der Gelkammer, die als ein Viereck auf dem Objektträger aufgebaut wird. In der Mitte des Vierecks soll am Ende das runde Glasplättchen mit den Zellen gelegt werden. Das Viereck wurde aus zwei Schichten übereinanderliegender Glasstreifen aufgebaut, welche durch einen Wassertropfen hydrostatisch zusammengehalten werden, wobei die

#1.5 dicken Glasstreifen die untere Schicht, die dünneren Glasstreifen die obere Schicht bilden (s. Abb. 4). Das runde Glasplättchen wird in die Mitte der Kammer gelegt.

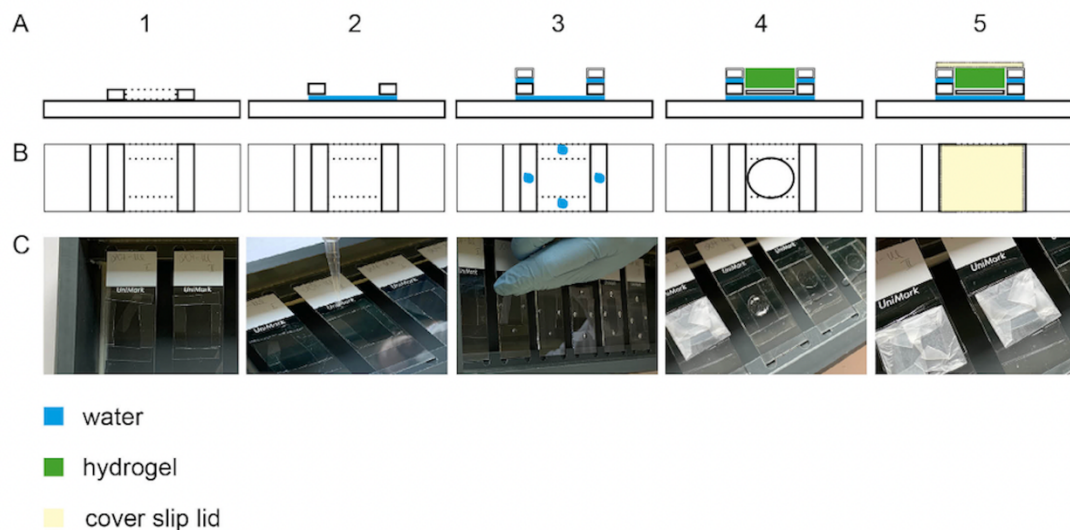


Abb. 4: **Aufbau der Gelkammer.** Übernommen aus: (Konigshausen et al., 2021). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.

Die *Monomer Solution* wurde währenddessen auf Eis gestellt. Der *Monomer Solution* wurden TEMED und APS hinzugefügt (beide jew. 0,1 mg/ml Endkonzentration). Pro Well wurden 200 μ l *Gelling Solution* (190 μ l Monomer Solution, 4 μ l TEMED, 4 μ l APS, 2 μ l A.d.) vorsichtig in die Kammer gegeben. Die Gelkammer wird mit einem in Parafilm eingewickeltem Eindeckglas vorsichtig verschlossen. Die Gele polymerisieren lichtgeschützt bei 37 °C für mindestens eine Stunde. Mit Hilfe einer Rasierklinge wurden der Deckel und die seitlichen Begrenzungen der Gelkammer, sowie der Gelüberstand an den Seiten entfernt. Das Gel wurde vorsichtig in mehrere kleine Teile zertrennt und vom Objektträger mittels PBS und einem Feinhaarpinsel in eine 6-Well Platte überführt. Es wurden übersichtliche *Pre-Expansion* Bilder mit dem Fluoreszenzmikroskop erstellt.

3.2.9.3 Digestion/Homogenisation

Dem *Digestion Buffer* wurde in einem Mikroreaktionsgefäß Proteinase K hinzugefügt (400 Units/ml). Pro Well wurden 500 μ l auf das Gel gegeben und anschließend über Nacht bei

Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Alternativ war eine Inkubation bei 37 °C für ca. 30 Minuten möglich.

3.2.9.4 Expansion

Die Expansion erfolgt mit doppelt destilliertem (dd) H₂O lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Alle 15-30 Minuten wurde das hinzugegebene ddH₂O ausgetauscht und durch Frisches ersetzt. Im Idealfall vergrößern sich die Gele um den Faktor 4,5 (s. Abb. 5).

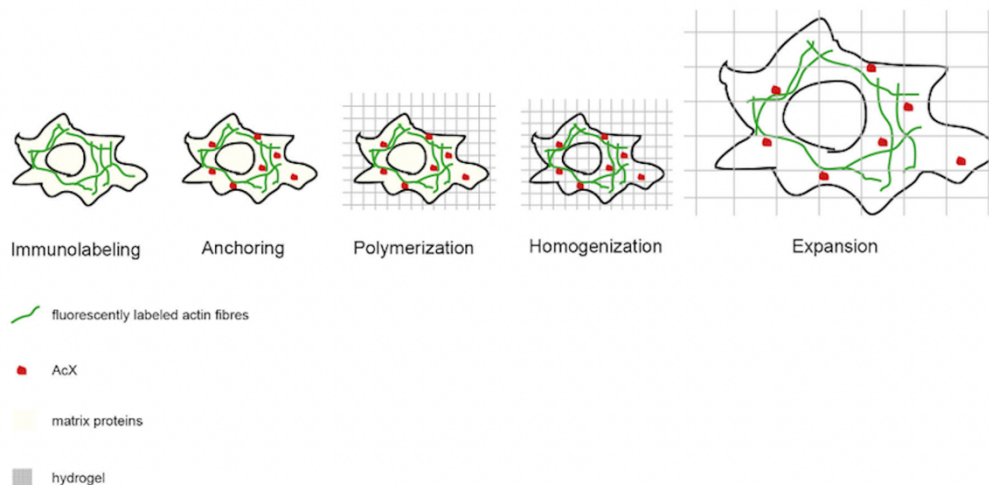


Abb. 5: **Funktionsweise der Expansionsmikroskopie**, übernommen aus: (Königshausen et al., 2021). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.

3.2.9.5 Microscopy

Die Aufnahmen erfolgten mit einem Leica Mikroskop „AXIO Observer Z1“. Die Belichtungszeiten richteten sich nach der vorhandenen Signalintensität der Färbung und lag zwischen 1 ms – 1000 ms. Es wurde versucht, markante Strukturen der *Pre-Expansion* Bilder wiederzufinden. Die Auswertung erfolgte mit VisiView und ImageJ.

3.2.10 Auswertung, Bildbearbeitung und Erstellen von Abbildungen

Die Bildauswertung und Bildbearbeitung erfolgte mit ImageJ, Softwareversion 1.54g (Schneider et al., 2012). Das Erstellen von Abbildungen erfolgte mit FigureJ, einem Plugin für ImageJ (Mutterer & Zinck, 2013). Es wurden *Pseudocolor Images* erstellt und für die Aktindarstellung in „rot“, für Protein 4.10 oder Nephren in „grün“ eingefärbt. Bei der Dreifachfärbung wurde Aktin in „blau“, Nephren in „rot“, Podocin in „grün“ eingefärbt. Für

die Analyse der Kolokalisation wurden die Farbkanäle übereinandergelegt. Bei einer Kolokalisation ergeben rot und grün zusammen gelb. Blau und rot ergeben zusammen magenta. Blau und grün ergeben zusammen türkis. Rot, grün und blau ergeben zusammen weiß. Es wurden keine statistischen Verfahren verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Methodische Ergebnisse

4.1.1 Pitfalls und deren Lösung

In der hier verwendeten Versuchsreihe wurde ein „proExM“ Protokoll an Cos7 Zellen mit sequentieller Immunfluoreszenzfärbung der Zielproteine Nephrin, Podocin, der verschiedenen Splicevarianten von Protein 4.1O (207, 204, 201) und Aktin durchgeführt. Hiermit soll an bereits durchgeführte Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe angeschlossen werden. Ziel dieser Versuchsreihe ist es, diese neuartige Methode zu etablieren. Zusätzlich sollen inhaltlich die Expressionsmuster von Protein 4.1O, Nephrin und Podocin visualisiert und deren Kolo-kalisation mit F-Aktin, insbesondere im Bereich der Zellperipherie untersucht werden.

4.1.1.1 Die Aktinfärbung mit Phalloidin ist ungeeignet für die Expansionsmikroskopie

Die Aktinfärbung mittels fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin zeigte für das Fluorophor „TexasRed“ nach dem Verdau einen nahezu vollständigen Signalverlust, obwohl eine erfolgreiche Färbung nach der Immunfluoreszenz und dem *Anchoring* nachgewiesen wurde. Parallel dazu zeigte die simultan durchgeführte Färbung von Protein 4.1O und Nephrin mit dem Fluorophor Alexa-488 ein ausreichendes Signal nach dem Verdau. Das Fluorophor „Texas Red“ hat sich auch in anderen Versuchen als nicht ExM-kompatibel gezeigt (Wen et al., 2020). Die Auswahl alternativer Fluorophore wie Phalloidin Atto 647N und Phalloidin Alexa 594, deren Fluorophore mit der Expansionsmikroskopie kompatibel waren (Tillberg et al., 2016), zeigten trotzdem einen nahezu vollständigen Signalverlust nach dem Verdau. Abbildung 6 zeigt exemplarisch im Vergleich die Fluoreszenzsignale von Alexa 488 und Phalloidin Atto 647N, im *Workflow* der ExM vor und nach dem Verdau. Bei fehlendem Signal der Aktinfärbung nach dem Verdau wurde auf die Expansion der Proben verzichtet. Auch die Verwendung höherer Antikörperkonzentration von Phalloidin Atto 647N (1:50 statt 1:200) erreichte keine ausreichende Signalretention. Der Signalverlust der Aktinfärbung war somit nicht mit der Wahl ungeeigneter Fluorophore begründet. Anders als die Färbung von Protein 4.1O oder Nephrin erfolgt die Aktinfärbung nicht mit Primär- und Sekundärantikörper sondern mit Phalloidin, einem Zytostatikum aus dem Knollenblätterpilz, welches mit einem Fluorophor gekoppelt ist. Nach ausführlicher

Literaturrecherche ist die kleine Molekülgröße des Phalloidin der Grund für eine unzureichende Bindung an AcX und unzureichende Vernetzung mit dem Hydrogel (Wen et al., 2020). Das unzureichend vernetzte Phalloidin geht während des Verdaus (*Digestion/Homogenisation*) und der Expansion beim Aufquellen des Gels verloren. Dies erklärt die Beobachtung des Signalverlustes beginnend nach dem Verdau.

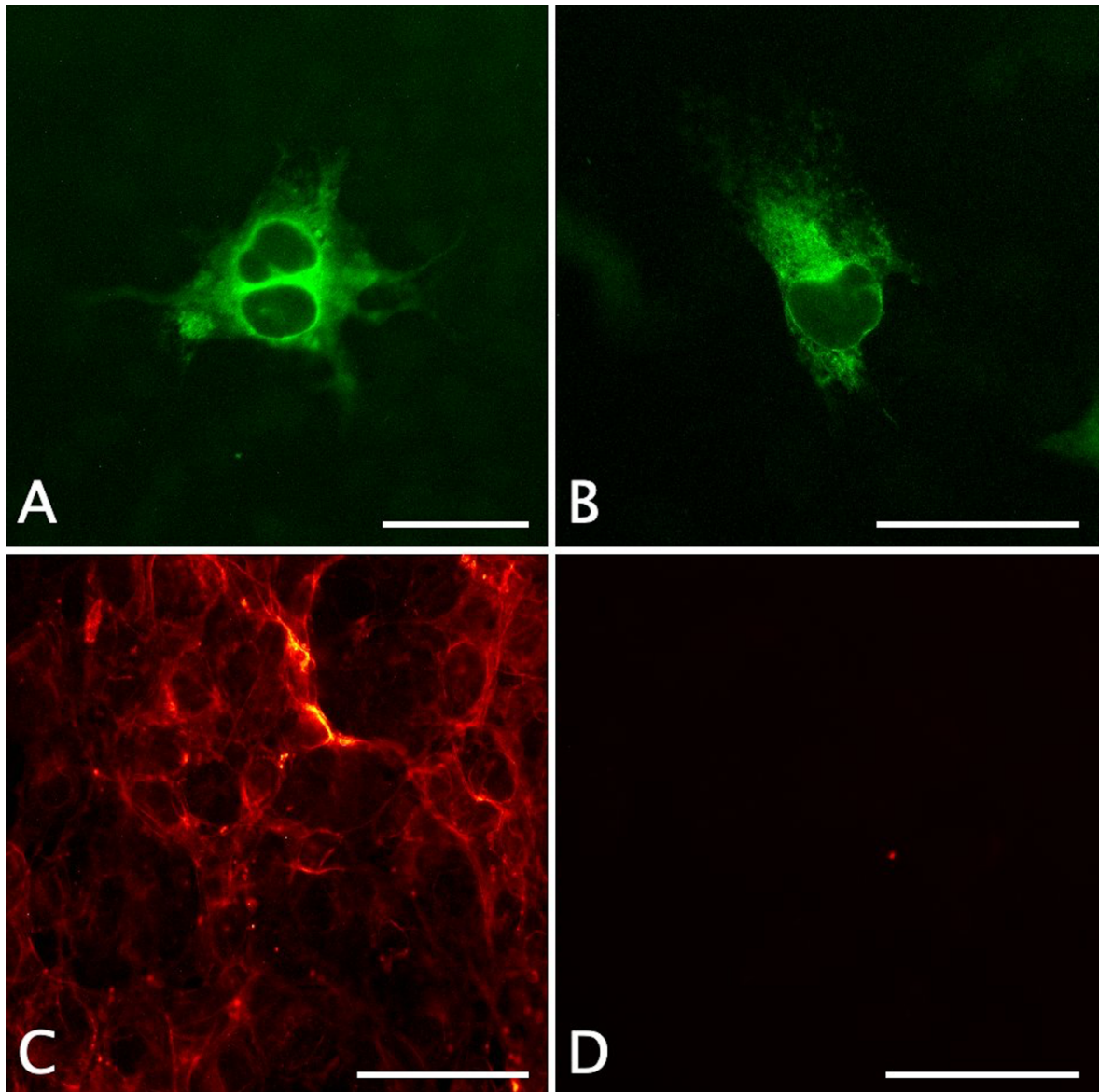


Abb. 6: **Workflow der ExM.** A) Färbung mit Alexa 488 vor (A) und nach (B) dem Verdau. Färbung mit Phalloidin Atto 647N vor (C) und nach (D) dem Verdau. Alle Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 100 μm .

Eine erste Alternative stellte das rote Fluoreszenzprotein „mRuby“ dar, welches bereits ein breites Anwendungsspektrum in der Zellbildgebung besitzt (Kredel et al., 2009).

Fluoreszenzproteine haben sich schon in anderen Arbeiten als ExM-kompatibel gezeigt (Tillberg et al., 2016). Hier wurde für die Aktindarstellung das rotfluoreszierende Protein „mRuby 2 LifeAct-7“ verwendet.

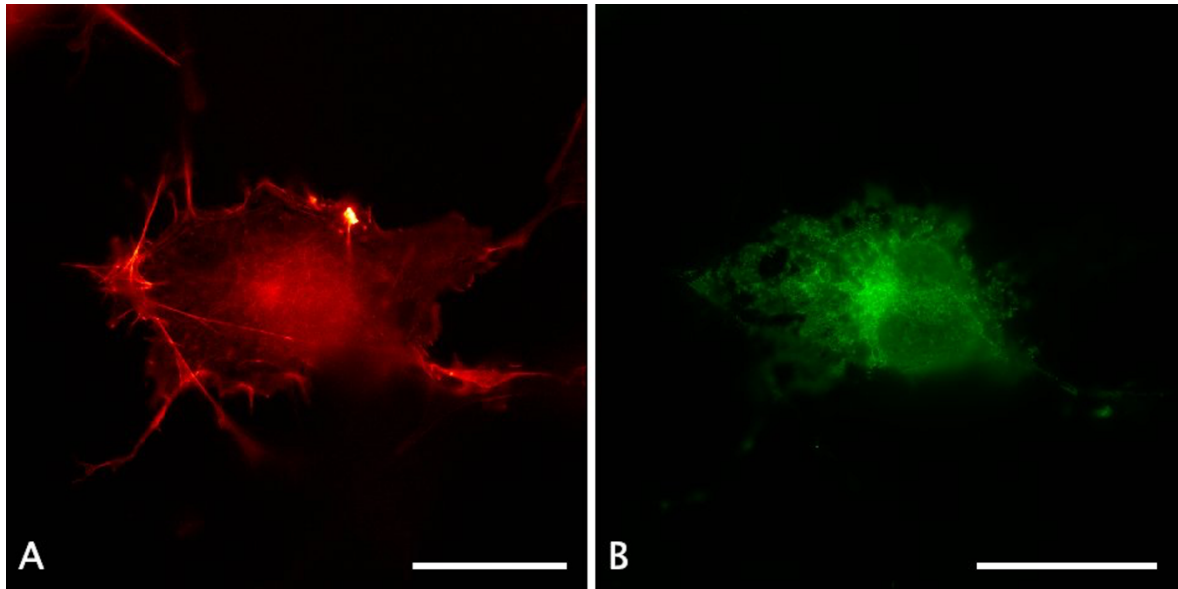


Abb. 7: **Aktinfärbung** mit mRuby-2-LifeAct-7 (A) und Färbung mit Alexa 488 (B). Beide Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 100 μm .

„mRuby 2-Lifeact-7“ wurde zu Beginn des Experiments im gleichen Schritt mit den Zielproteinen transfiziert (Abbildung 7: Nephtrin 1 μg , mRuby2-LifeAct7 0,5 μg). Die Transfektion eines zusätzlichen Proteins ging zu Lasten der Transfektionseffizienz der anderen Proteine Protein 4.1O und Nephtrin. Die Anpassung der Proteinmengen der zu transfizierenden Proteine Protein 4.1O auf 1,5 μg und mRuby2-LifeAct7 auf 0,25 μg gab zwar ein zufriedenstellendes Färbeergebnis, jedoch unverändert bei wenig zur Auswertung verfügbaren Zellen. Dadurch war eine aussagekräftige Triplefärbung auch nach Variierung der Proteinmenge nicht möglich.

Die Aktinfärbung gelang mit der Verwendung von „Actin-ExM 546“ (Chrometra Scientific, Abbildung 8): „Actin-ExM“ ist ein trivalentes Linkermolekül mit einer Phalloidingruppe, einer AcX-Gruppe, und dem Fluorophor 546. „Actin-ExM“ ist speziell für die ExM entwickelt und wurde fortan für die Aktindarstellung verwendet.

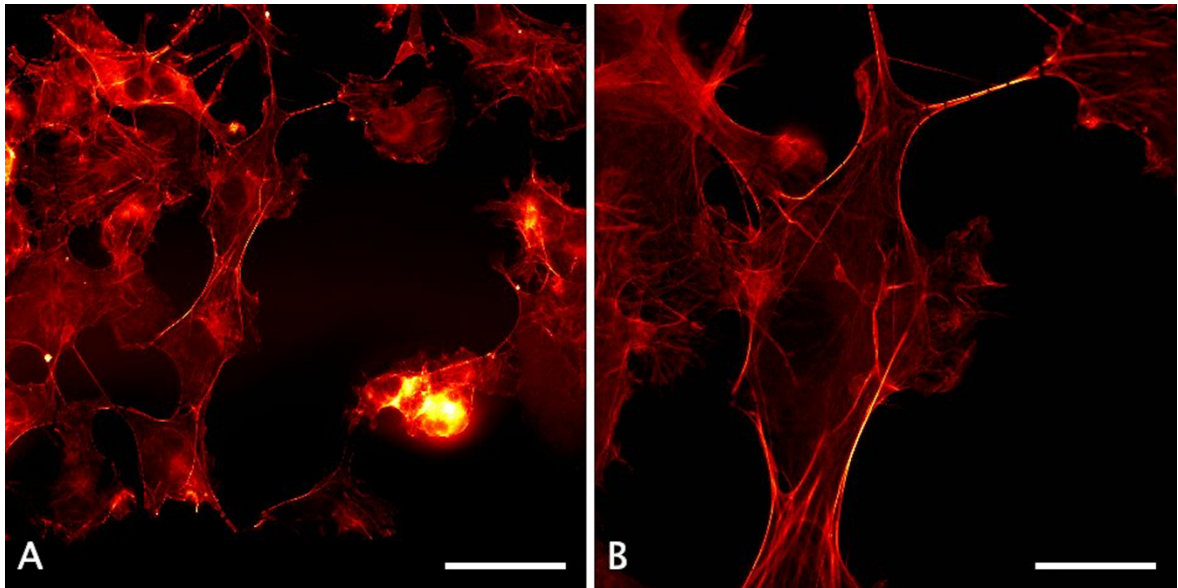


Abb. 8: **Actin ExM Färbung** A) nach dem Verdau und B) nach der Expansion mit Signalretention. Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar in A) 100 μm . Scalebar in B) 38,5 μm (Expansionsfaktor 2,6). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).

4.1.1.2 Unzureichender Verdau behindert die Expansion

Der Verdau hat zum Ziel die Probe vor der Expansion zu homogenisieren. Dabei soll er effizient genug sein, zelluläre Proteine zu homogenisieren, die immunfluoreszierenden Antikörper aber nicht zu sehr zu degradieren. Ist der Verdau nicht effizient genug, kommt es während der Expansion zu Rupturen der Zellproteine. Dadurch wird die isotrope Expansion des Gels behindert und es kommt zur fehlerhaften Darstellung von Distanzen und Strukturen im expandierten Zustand. Dies macht sich vor allem bei Strukturen wie dem Aktinzytoskelett bemerkbar. Abbildung 9 zeigt Rupturen im Aktinzytoskelett (s. Pfeilmarkierungen) nach unzureichendem Verdau.

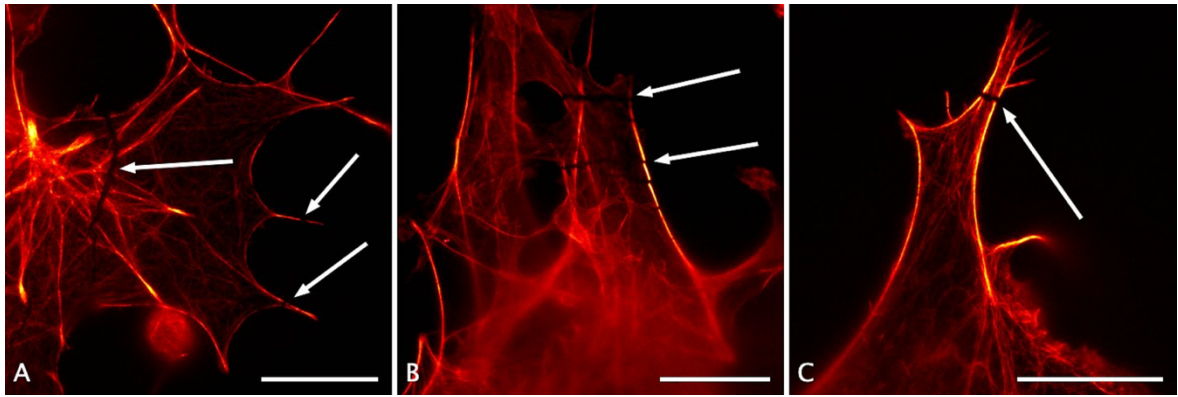


Abb. 9: **Aktin Ruptur durch unzureichenden Verdau**, alle Postexpansion, Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 15,2 μm (Expansionsfaktor 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).

4.1.1.3 *Unterschiedliche Bestimmung des Expansionsfaktors führt zu unterschiedlichen Ergebnissen*

Zur Bestimmung des Expansionsfaktors sind zwei verschiedene Methoden an Proben der gleichen Versuchsreihe angewandt worden, die hier verglichen werden. Methode 1 vergleicht Aufnahmen derselben Struktur vor und nach der Expansion. Anhand von vergleichbaren Messungen markanter Strukturen wurde über die Distanzzunahme der Expansionsfaktor errechnet. Exemplarisch zeigt Abbildung 10 den Vergleich vor (A) und nach Expansion (B). Die Distanz in (A) misst 132 μm und die gleiche Distanz in (B) misst nach der Expansion 345 μm . Daraus ergibt sich ein Expansionsfaktor von 2,6. Nicht alle markante Strukturen können nach der Expansion aufgrund der nun vergrößerten Probengröße, der zunehmenden Unübersichtlichkeit und dem zunehmenden Signalverlust wiedergefunden werden.

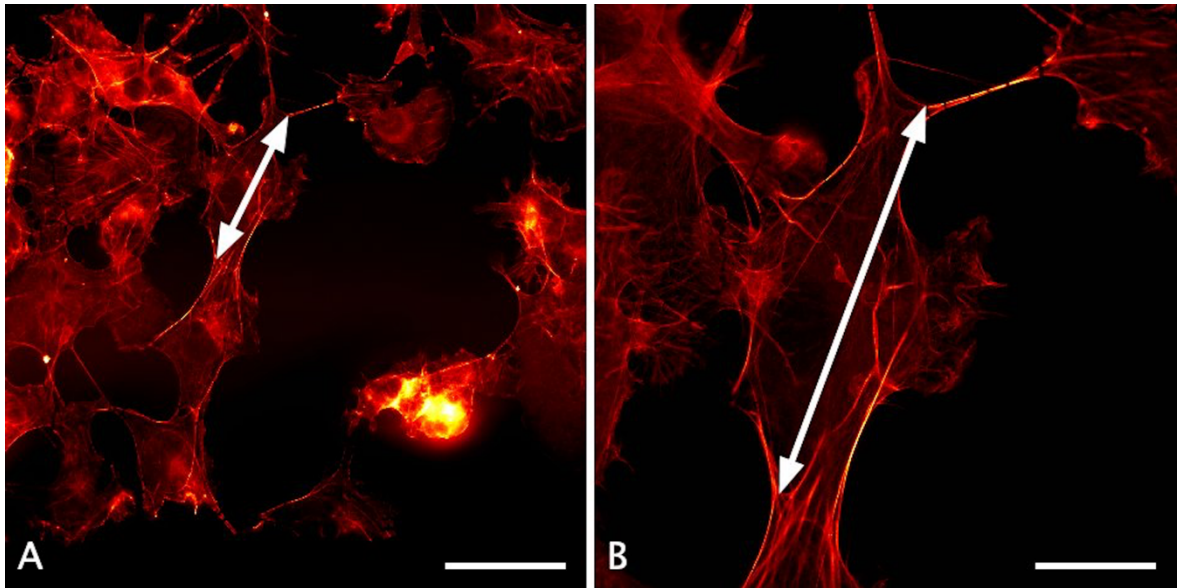


Abb. 10: **Bestimmung des Expansionsfaktor** durch Wiederfinden markanter Strukturen vor (A) und nach der Expansion (B). Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar in A) 100 μm in B) 38,5 μm (Expansionsfaktor 2,6). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).

Methode 2 vergleicht die Zellkerngröße vor und nach der Expansion. Diese Methode kann verwendet werden, sollten nach der Expansion markante Strukturen nicht wieder aufgefunden werden. Zur Vereinfachung wird hier mit einer mittleren Zellkerngröße von 10 μm gerechnet. Abbildung 11 zeigt exemplarisch eine Messung an einem nicht expandierten Immunfluoreszenzbild (A) und einem Expansionsbild (B) mit einem 63er-Vergrößerungsobjektiv. Bei einer mittleren Zellkerngröße von 10 μm und einer gemessenen Zellkerngröße im Expansionsbild (B) von 33 μm errechnet sich ein Expansionsfaktor von 3,3. Dies war die maximal erreichte Expansion in dieser Versuchsreihe.

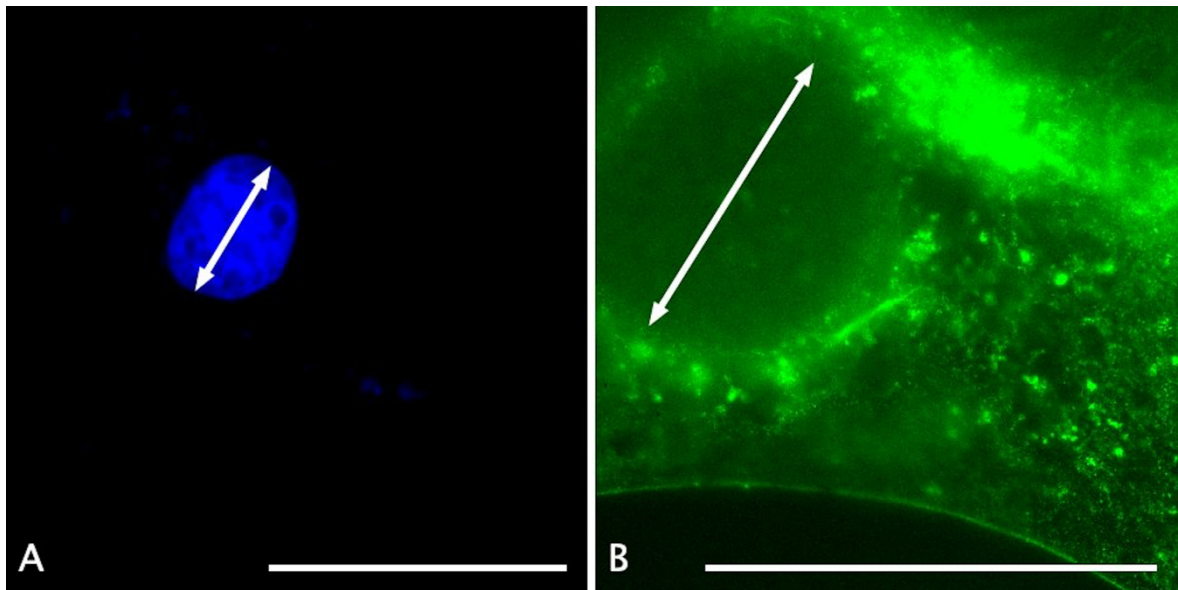


Abb. 11: **Methode 2: Bestimmung des Expansionsfaktors** A) Zellkerngröße vor Expansion 10 μm , B) nach der Expansion 33 μm . Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar A) 20 μm , Scalebar B) 15,2 μm (Expansionsfaktor 3,3).

Die verschiedenen Methoden kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Das ist dadurch begründet, dass bei Methode 1 das Referenzbild vor der Expansion nach dem Verdau aquiriert wurde. Durch die Zugabe des *Digestion Buffers* fand dort bereits eine erste Vorexpanion statt. Dieser Faktor spielt bei Methode 2 keine Rolle.

4.2 Inhaltliche Ergebnisse

Neben den methodischen Untersuchungen wurde eine Analyse der Proteine 4.10, Nephrin und Podocin durchgeführt. Dazu wurden in COS7-Zellen Protein 4.10, Nephrin und Podocin mittels Lipofektion transfiziert und überexprimiert. Anschließend wurden sie fluoreszenzgefärbt und mit AcX verlinkt. Endogenes Aktin wurde mit Actin-ExM 546 gefärbt und verlinkt. Zuletzt erfolgte der Verdau und die Expansion.

4.2.1 Protein 4.10 Splicevarianten 207, 204, und 201 zeigen ein verschiedenes Expressionsmuster und kolokalisieren mit F-Aktin

Die Abbildungen 12-14 zeigen eine Zweifachfärbung der Splicevarianten von Protein 4.10 207, 204, 201 und F-Aktin. Hierzu wurden repräsentative Zellen aus mehreren

Versuchsreihen herausgesucht und wie folgt veranschaulicht. Ein hohes 4.10 Signal zeigt sich im endoplasmatischen Retikulum perinukleär. In der Zellperipherie ist Protein 4.10 207 entlang der Aktinfasern und dem subkortikalen Aktinnetzwerk, aber auch innerhalb der zellulären Matrix gleichmäßig und netzartig angeordnet. Kolokalisation lässt sich anhand gelber Farbpixel nachweisen und zeigt sich im submembranösen Aktinplecht (s. Pfeilmarkierung) und entlang der kortikalen Aktinfasern (s. Pfeilmarkierung).

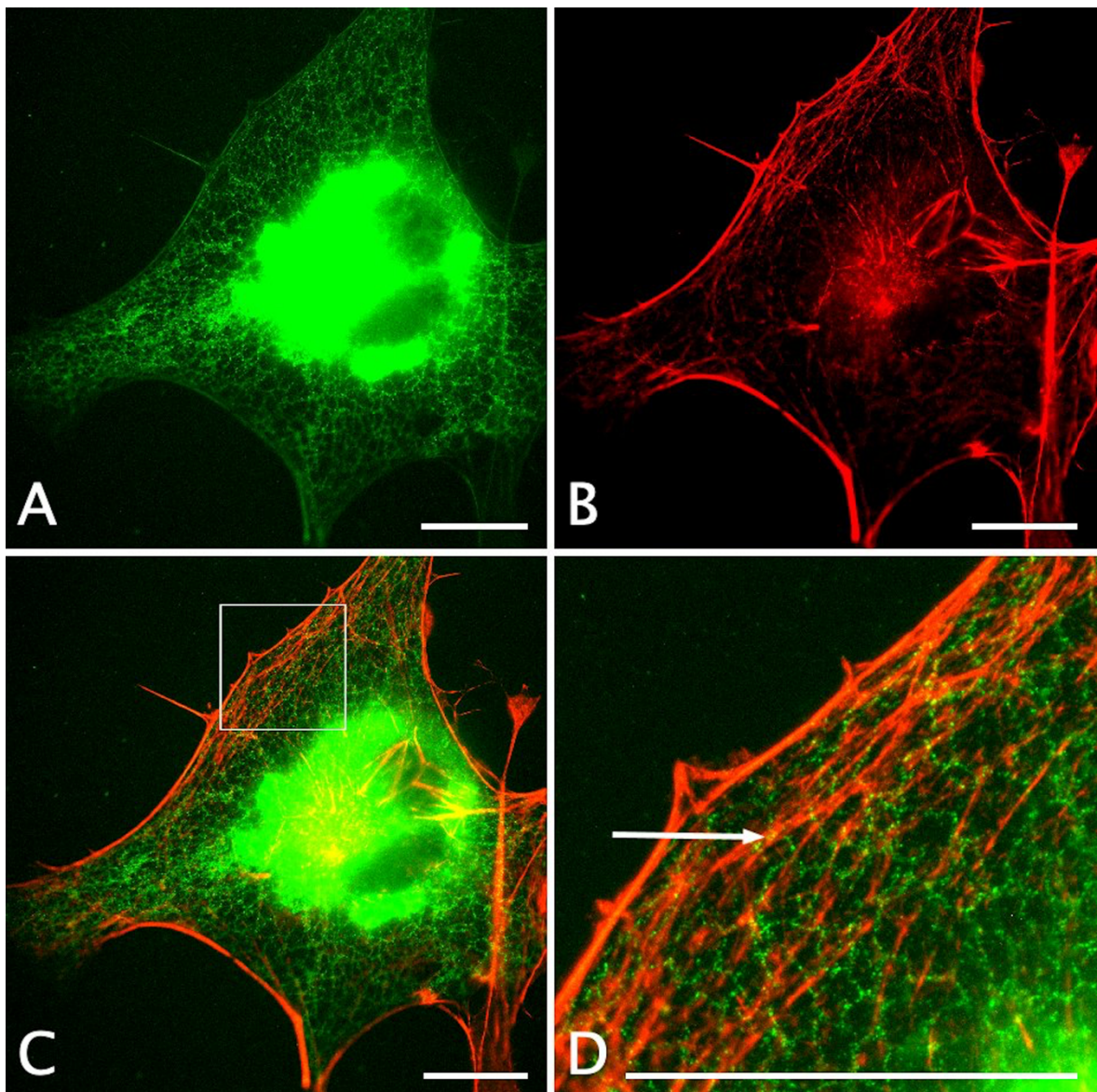


Abb. 12: **Kolokalisation von Protein 4.10 207 und Aktin.** Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 63x, Scalebar 11 μm (Expansionsfaktor 1,8).

Die Splicevarianten 204 und 201 (Abbildung 13 und 14) zeigen eine eher homogene, punktförmige Verteilung innerhalb des Zellkörpers und der Zellperipherie. Die gelben Pixel zeigen eine Kolo­kalisation zwischen Protein 4.1O und F-Aktin. Beide kolo­kalisieren im Bereich der kortikalen Aktinfasern an den Zellausläufern und den zentralen Aktinfasern (s. Pfeilmarkierungen).

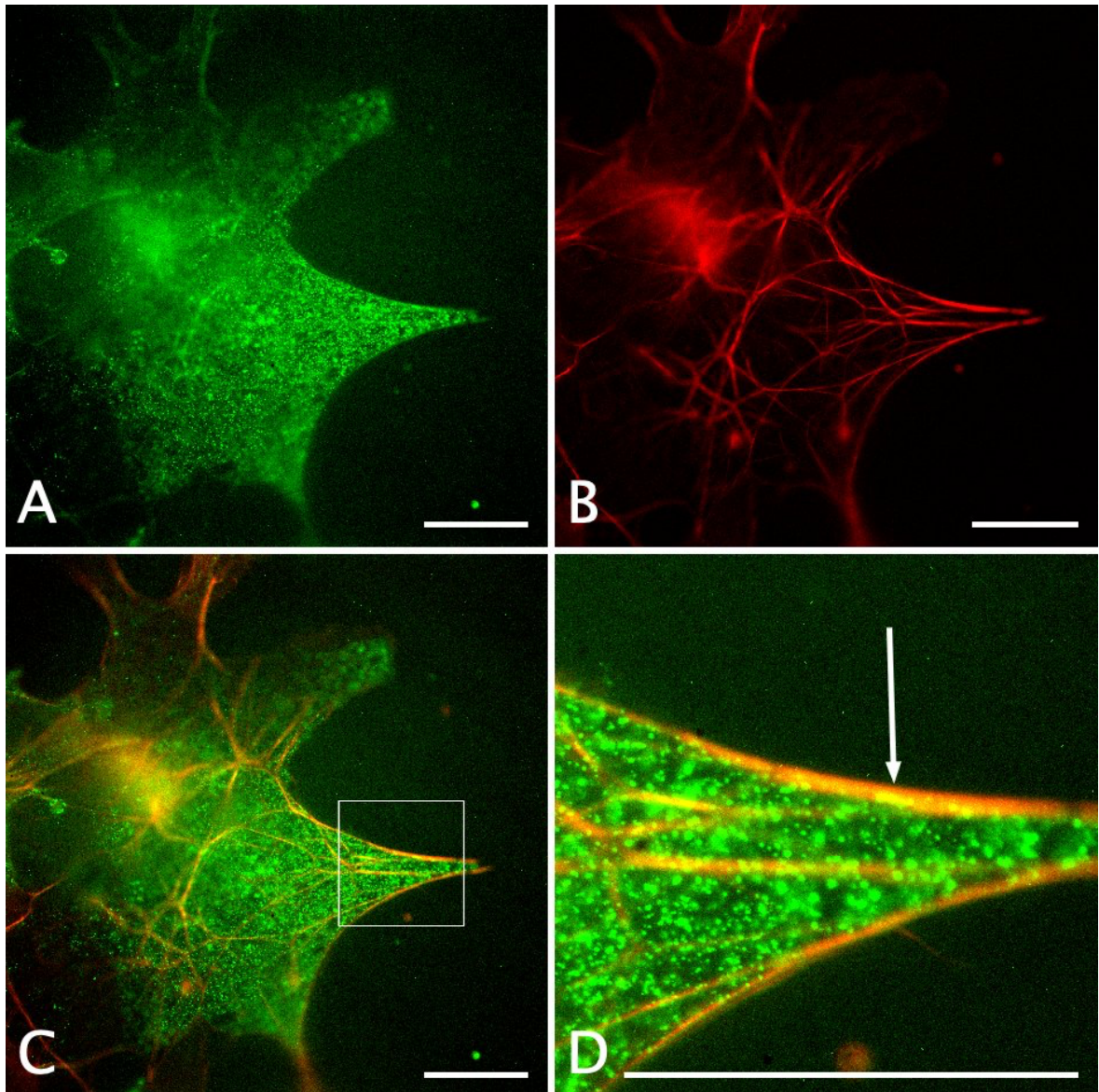


Abb. 13: **Kolo­kalisation Protein 4.1O 204 und Aktin.** Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 23 μm (Expansionsfaktor 2,2).

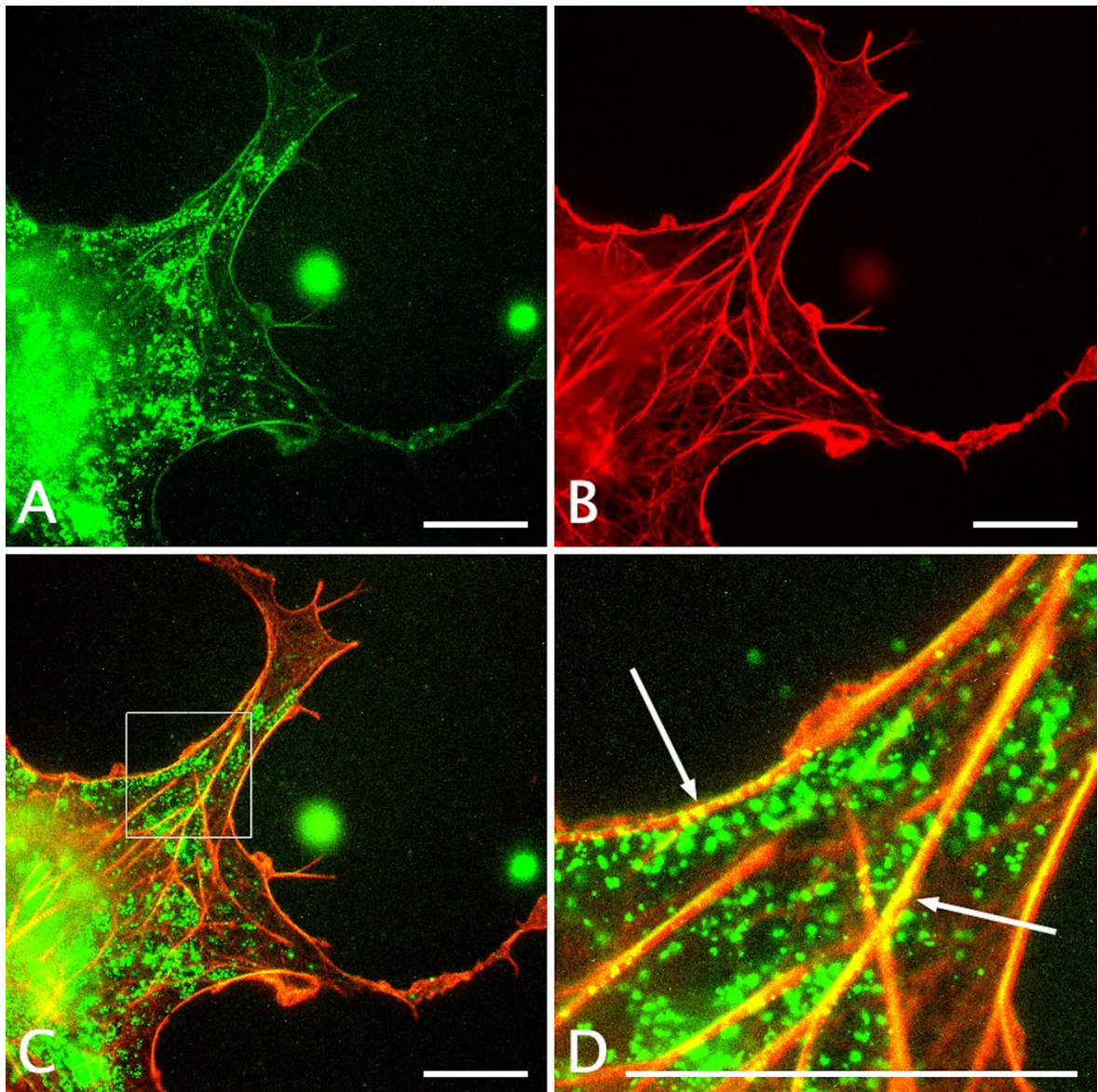


Abb. 14: **Kolokalisation Protein 4.1O 201 und Aktin.** Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 11 μm (Expansionsfaktor 1,8).

4.2.2 Nephrin, Podocin und F-Aktin kolokalisieren

Abbildung 15 zeigt eine Triplefärbung der Proteine Nephrin, Podocin, und Aktin. Podocin und Nephrin verteilen sich diffus in der zellulären Matrix und auch submembranös. Aktin bildet zentrale Fasern und kortikale Fasern aus.

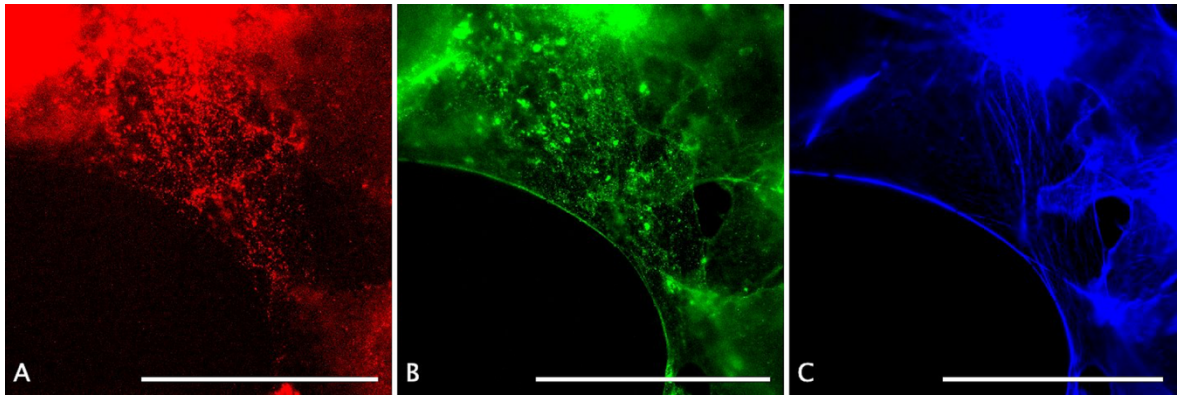


Abb. 15: **Triplefärbung** der Proteine A) Nephrin B) Podocin und C) Aktin. Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 15,2 μm (Expansionsfaktor 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).

Im Übereinanderlegen der Färbungen für Aktin (blau) und Nephrin (rot) stellt sich die Kolokalisation von Aktin und Nephrin magentafarben dar (s. Abb. 16). Diese zeigt sich membranös, submembranös sowie entlang zentraler Aktinfasern im Zytoplasma (s. Pfeilmarkierungen).

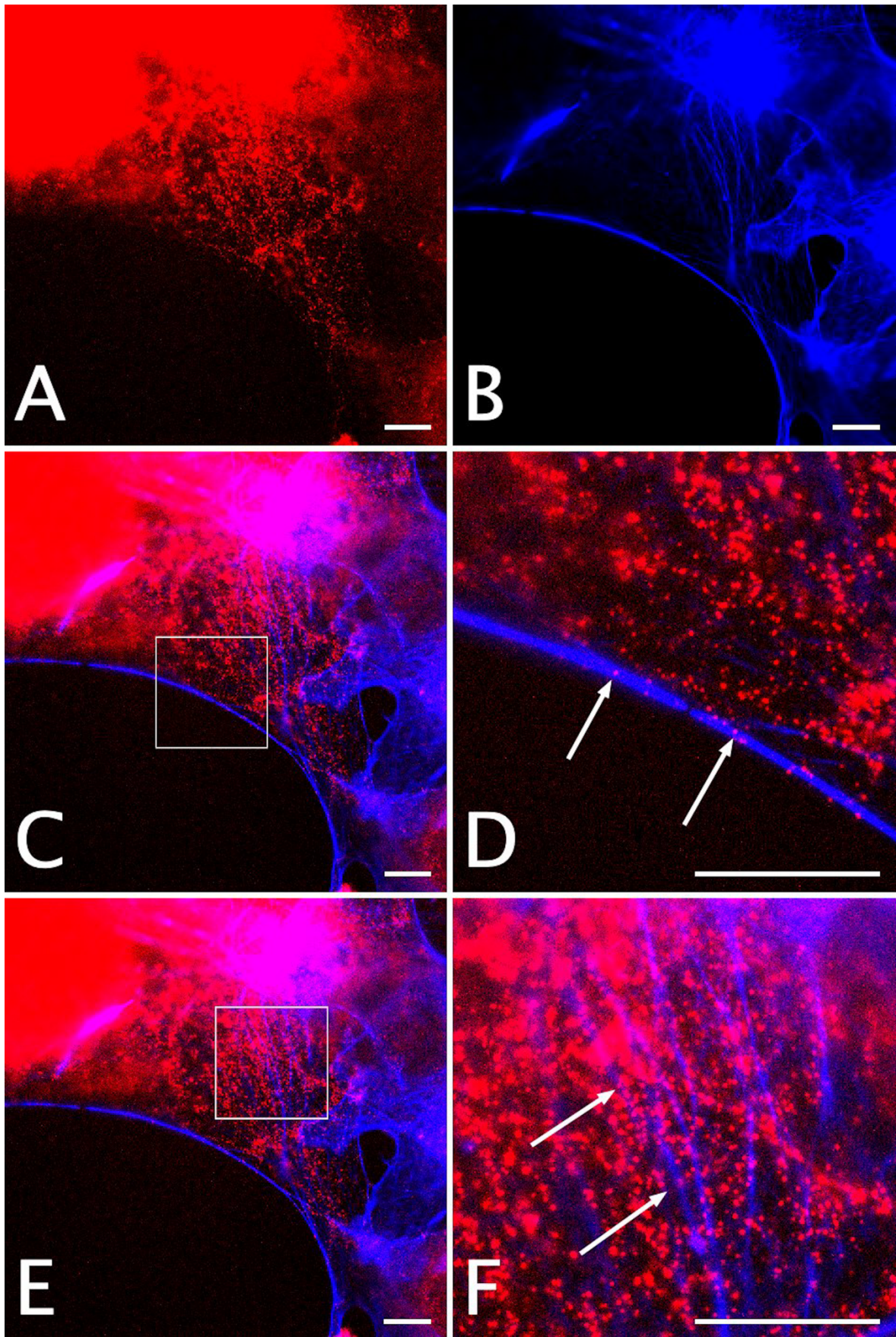


Abb. 16: Kolokalisation von Aktin (blau) und Nephrin (rot) in den magentafarbenen Bereichen (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 μm . (Expansionsfaktor 3,3).

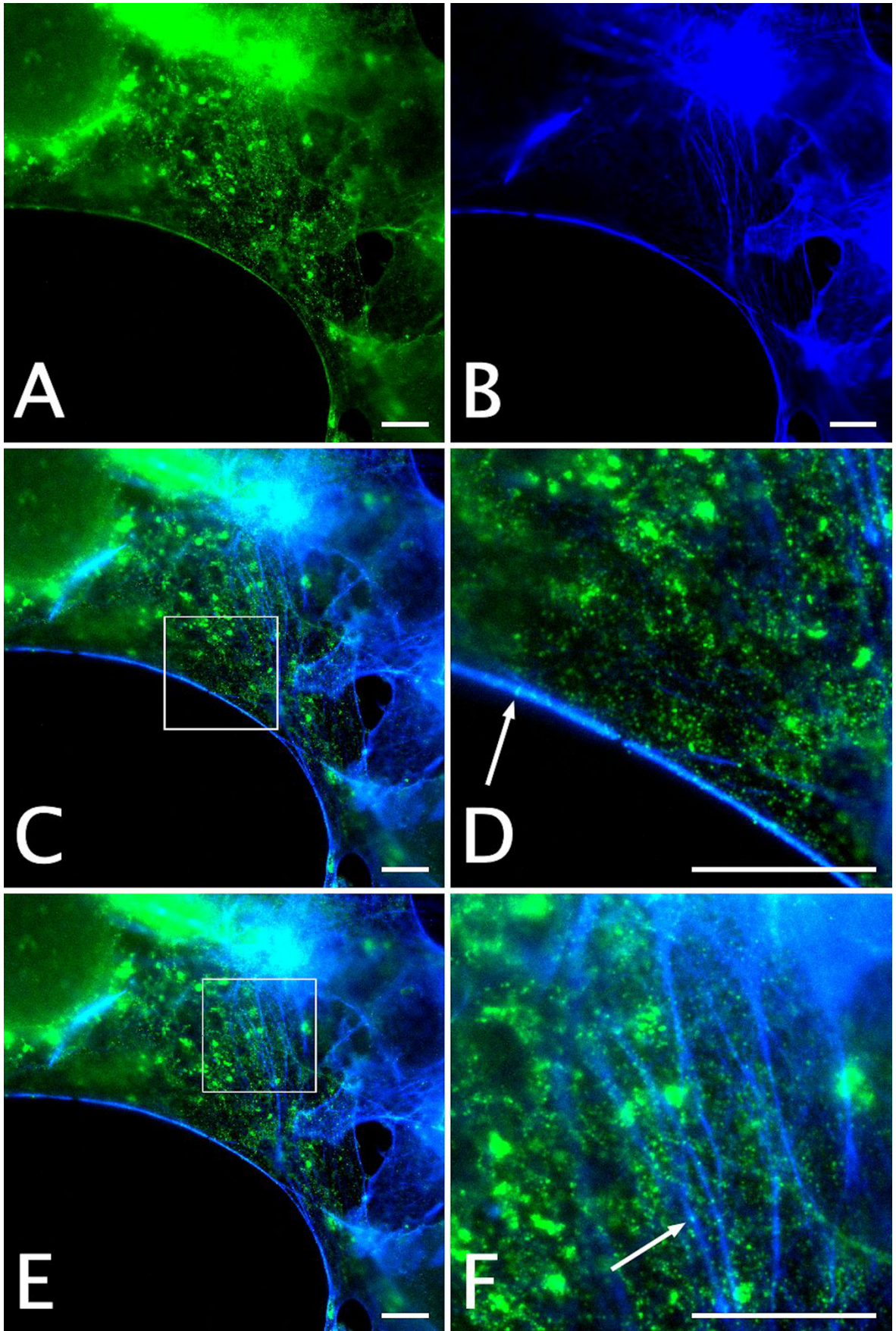


Abb. 17: **Kolokalisation zwischen Aktin (blau) und Podocin (grün) zeigt sich türkis** (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 μm (Expansionsfaktor: 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Konigshausen et al., 2021).

Die Kolokalisation zwischen Podocin (grün) und Aktin (blau) stellt sich cyanfarben dar (s. Abb. 17). Podocin und Aktin kolokalisieren entlang der kortikalen und der zentralen Aktinfasern (s. Pfeilmarkierungen in B und D).

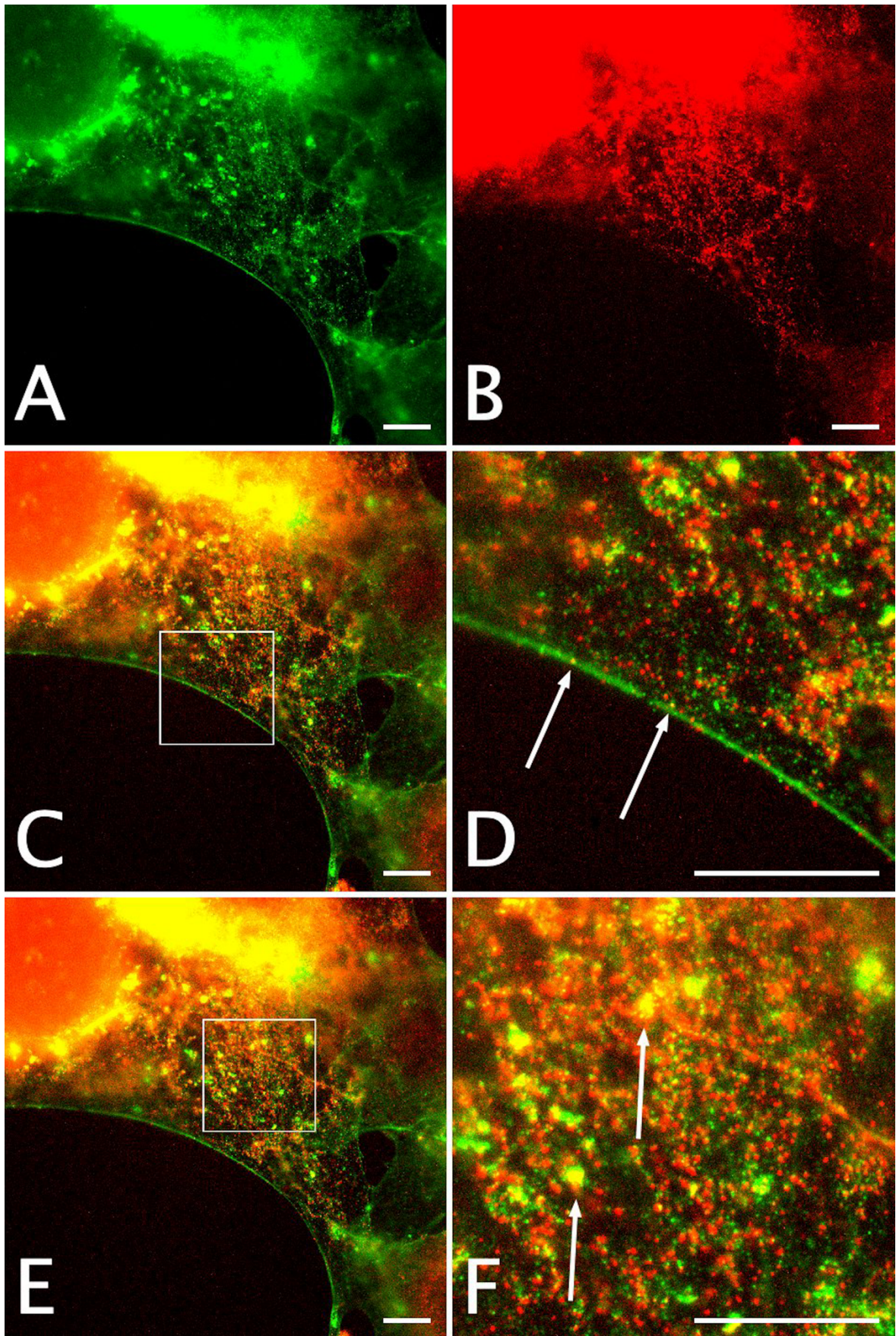


Abb. 18: **Kolokalisation von Nephtrin (rot) und Podocin (grün)** im Zytoplasma (gelb) und submembranös (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 μm (Expansionsfaktor 3,3).

Kolokalisation zwischen Nephrin (rot) und Podocin (grün) zeigt sich in den gelben Bereichen (s. Abb. 18). Dies ist membranös, submembranös und zytoplasmatisch der Fall (s. Pfeilmarkierungen). In der Triplefärbung von Nephrin (rot), Podocin (grün) und Aktin (blau) stellt sich die Kolokalisation aller drei Proteine als weiße Pixel dar. Eine Kolokalisation zeigt sich im Bereich der Membran, perinukleär und entlang der zentralen Aktinfasern (s. Abb. 19).

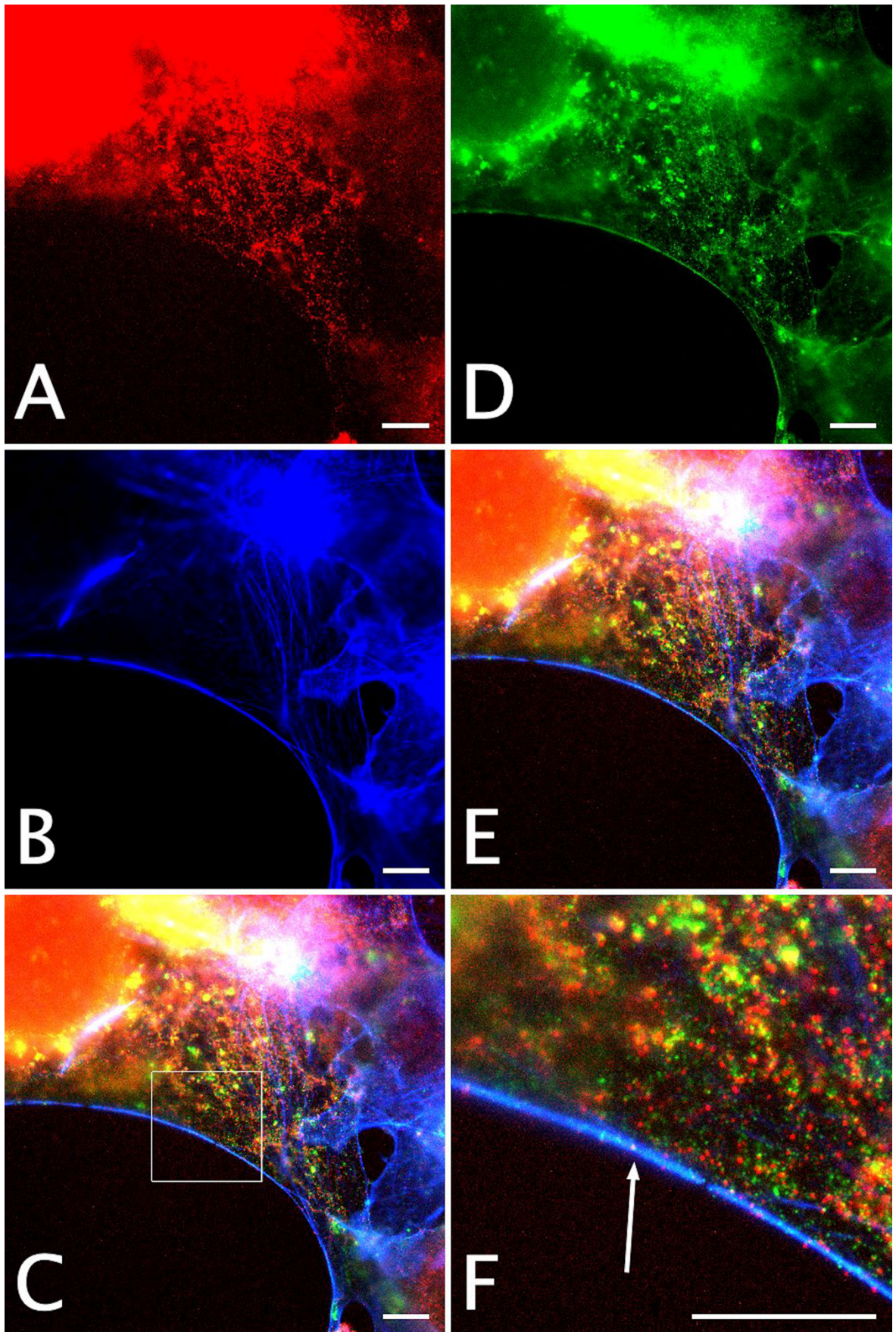


Abb. 19: **Kolokalisation zwischen Nephrin (rot), Podocin (grün) und Aktin (blau)** zeigt sich anhand weißer Pixel (s. Pfeilmarkierungen) perinukleär, im Bereich der zentralen Aktinfasern und submembranös. Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 μm (Expansionsfaktor: 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).

5 Diskussion

5.1 Methodische Diskussion

Die Expansionsmikroskopie ist eine 2015 vorgestellte Methode zur hochauflösenden Mikroskopie mit dem Ziel im Gegensatz zu den bisher bekannten Methoden, breit verfügbar und kostengünstig zu sein. Seit der Einführung der Methode 2015 wurden mit wachsender Anhängerschaft immer mehr Anwendungsbereiche erschlossen und Verbesserungen implementiert. Die Hauptanwendungsbereiche sind Darstellungen von Gewebe und Zellen aus Zellkulturen, weitere Anwendungsbereiche umfassen die Darstellung von Bakterien, Viren, Hefen, Zebrafisch, *C. elegans*, *Drosophila*, Organen und Pflanzen (Zhuang & Shi, 2023). Es gibt eine Vielzahl an dedizierten Protokollen zur Färbung von RNA und DNA (ExFISH), von Membranen (membrane ExM), Proteinen (proExM), Lipiden (lipid ExM), Glykanen und Aktinfasern (Zhuang & Shi, 2023).

5.1.1 Signalverlust wird durch die Wahl der Fluorophore und das *Anchoring* beeinflusst.

Die Färbung mit trifunktionalen Linkermolekülen ist der einfachen Immunfluoreszenzfärbung überlegen.

Der in dieser Arbeit beobachtete Signalverlust des Fluoreszenzsignals stellt auch in der Literatur eine gegenwärtige Herausforderung dar. Tillberg et al. beobachteten in der proExM einen Signalverlust von 50% durch den gesamten Prozess der ExM hinweg (Tillberg et al., 2016). Bei einer linearen Expansion der Probe um den Faktor vier wird das Fluoreszenzsignal der expandierten Probe um den Faktor 64 verdünnt (Wen et al., 2020). Der intrinsische Signalverlust durch die Expansion des Gels muss hingenommen werden, wohingegen Signalverlust durch unzureichendes *Anchoring* und *Dye Degradation* minimiert werden kann. Es hat sich in dieser Arbeit, wie auch in der Literatur herausgestellt, dass der Signalverlust multifaktoriell bedingt ist. Dabei spielen das *Anchoring*, die *Dye Degradation* und der enzymatische Verdau mit Proteinase K eine Rolle. Allgemein bekannt ist, dass während der Gelpolymerisierung freie Radikale entstehen, welche das Fluoreszenzsignal degradieren (*Dye Degradation*) (Zhuang & Shi, 2023). Die hier dargestellten Ergebnisse decken sich mit denen in der Literatur: Die Fluorophore Alexa 488, (Actin-ExM) 546 und CF 633 zeigten eine gute Signalretention nach der Expansion zwischen

45-70% (Tillberg et al., 2016). Nicht alle Fluorophore zeigen sich mit der Expansionsmikroskopie kompatibel. Dabei gibt es eine unterschiedlich starke Signaldegradierung durch den Prozess der ExM hinweg, die über den natürlichen Signalverlust hinaus geht (Tillberg et al., 2016). Ursprünglich empfohlen und erprobt war die Verwendung der Fluorophore Alexa 488, TAMRA, Atto 564, Atto 647N (Chen et al., 2016). Chozinski et al. fügten dem noch Alexa 405, Atto 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 586, GFP, YFP, DsRed, Hoechst 33342 und SYBR Gold hinzu (Chozinski et al., 2016). In dieser Arbeit wurden die Fluorophore Alexa 488, Texas Red, Actin-ExM 546, Alexa 594, CF633, Atto 647N sowie das rotfluoreszierende Protein „mRuby2-LifeAct7“ verwendet. Die beste Färbung in dieser Versuchsreihe gelang in absteigender Reihenfolge mit Actin ExM 546, mRuby, Alexa 488, und CF633. Die Färbung mit CF633 war nur mit langen Belichtungszeiten ausreichend detektierbar. Die Bewertung der Signalintensität erfolgte in dieser Arbeit rein optisch anhand des vorhandenen Fluoreszenzsignals nach dem Verdau und nach der Expansion. Bei schwachem Fluoreszenzsignal wurde die Belichtungszeit bis maximal 1000 ms verlängert. Es fanden keine objektivierbaren, normierten Messungen statt. Eine Möglichkeit der Objektivierung des Fluoreszenzsignals wird durch exemplarische Bestimmung der Fluoreszenzintensität vor der Polymerisierung und nach der Expansion erreicht. Die Fluoreszenzintensitäten werden anschließend zueinander in Verhältnis gesetzt (Tillberg et al., 2016). Beim „*Post-Expansion Staining*“ werden die Zielproteine nach der Expansion gefärbt, mit dem Ziel, den Signalverlust durch *Dye Degradation* und Verdau zu umgehen. Diese Variante konnte sich bislang nicht durchsetzen. Theoretisch besteht nach der Expansion zwar mehr Raum für die Antikörper, am Targetprotein zu binden. Jedoch kommt es durch den Verdau auch zur Degradierung der Epitope, welche nicht mehr durch die Antikörper erkannt werden können. Bei milderem Verdau, beispielsweise mit der gerichteten Proteinase Lys C, welche nur an der c-terminalen Seite von Lysin spaltet, kommt es während der Expansion zu Brüchen und ungleichmäßiger Expansion (Tillberg et al., 2016; Wang et al., 2022). Allgemein bekannt ist, dass unzureichend verlinkte Proteine auch bei erfolgreicher Färbung und guter Signalretention im Expansionsschritt ausgewaschen werden (Wen et al., 2020). In dieser Arbeit konnte der Erfolg des *Anchoring* nicht isoliert betrachtet werden. Hier wurde als indirektes Maß die Signalretention nach der Expansion betrachtet, die wie zuvor beschrieben, jedoch auch von der Auswahl der Fluorophore und dem Verdau beeinflusst wird. Basierend auf theoretischen Erfahrungen

in der Literatur wurde in dieser Arbeit ein *Anchoring Buffer* (150 mM NaHCO₃, pH 8.3) verwendet, der die Reaktionsbedingungen des AcX verbessert (Truckenbrodt et al., 2018). AcX wurde alle 3-4 Monate durch frisches AcX ersetzt. Neuere Protokolle wie „Magnify“ kommen ohne einen dedizierten Anchoringschritt aus. Im Gegensatz zur proExM bewirkt dort eine Methacrolein-haltige *Monomer Solution* ein simultanes *Anchoring* und Polymerisierung bei verbesserter Signalretention im Vergleich zur proExM mit AcX-*Anchoring* (Klimas et al., 2023). Übermäßiger Verdau konnte als Ursache eines Signalverlust nicht bestätigt werden. Antikörper und Fluoreszenzproteine haben sich, vorausgesetzt ist die Wahl geeigneter Fluorophore und ein effektives *Anchoring*, als relativ proteinaseresistent erwiesen.

5.1.2 Die Aktinfärbung mit Phalloidin ist ungeeignet für die Expansionsmikroskopie

Exemplarisch für den Signalverlust durch unzureichendes *Anchoring* gilt die in dieser Versuchsreihe durchgeführte Aktinfärbung mit Phalloidin. Aufgrund der kleinen Molekülgröße des Phalloidins können nicht genug AcX-Linkermoleküle an das Phalloidin binden. Dies erklärt den vollständigen Signalverlust der Aktinfärbung nach dem Verdau trotz Auswahl eines ExM-geeigneten Fluorophors, wie Phalloidin Atto 647N (Tillberg et al., 2016). Eine Alternative stellt in der Literatur die Aktinfärbung mittels fluoreszenzgekoppeltem Phalloidin und einem gegen Fluorophore gerichteten Sekundärantikörper dar (Park et al., 2020). Die insgesamt beste Signalretention schaffte in dieser Versuchsreihe die Verwendung von „Actin-ExM 546“. Actin-ExM ist ein trifunktionales Linkermolekül, welches in dieser Art von Wen et al. 2020 als „TRITON“ vorgestellt wurde (Wen et al., 2020). „TRITON“ (Abkürzung für „*trivalent anchoring*“) ermöglicht simultanes Färben und *Anchoring* in einem Schritt. Actin-ExM trägt eine Fluorophorgruppe, eine Acryloyl-Gruppe zum Verlinken im Gel, und eine Phalloidin-Gruppe. Actin-ExM schaffte in dieser Versuchsreihe die beste Signalretention aller verwendeten Fluorophore sowie stabile Färbeergebnisse. In aktuellen Entwicklungen werden diese trifunktionalen Linkermoleküle sowie auch AcX mit photostabilisierenden Substanzen wie Nitrobenzylalkohol (NBA) oder 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) konjugiert, um dem durch freie Radikale induzierten Signalverlust entgegenzuwirken (Wen et al., 2022). Dies erzielt eine deutliche Signalverbesserung für die

NBA-konjugierten Fluorophore 405 und 343. Für das Fluorophor 488 war der Effekt gering ausgeprägt, da 488 generell eine gute Signalretention zeigt (Wen et al., 2022). Solche Erweiterungen sind für die Signalerhaltung und die Qualität der Aufnahmen von entscheidender Bedeutung.

5.1.3 Unzureichender Verdau behindert die Expansion

Der ungerichtete proteolytische Verdau mittels Proteinase K konnte in dieser Versuchsreihe nicht als führende Ursache des Signalverlust belegt werden. Es kann in dieser Versuchsreihe keine Aussage dazu gemacht werden, zu welchem Anteil der Verdau am Signalverlust beiträgt. Diese Bewertung erfolgte ausschließlich anhand optischer Einschätzung der Signalstärke nach dem Verdau. Der Verdau trägt zum Signalverlust bei, indem ungerichtet Proteine degradiert und somit gefärbte, aber nicht ausreichend verlinkte Proteine während des Verdaus ausgewaschen werden (Chozinski et al., 2016).

5.1.4 Unterschiedliche Bestimmung des Expansionsfaktors führt zu unterschiedlichen Ergebnissen

Der in dieser Versuchsreihe maximal erreichte Expansionsfaktor von 3,3 (s. Abb. 11) lag unterhalb des zu erwarteten Expansionsfaktors von 4,5. Aufgrund der beobachteten Brüche im Aktinzytoskelett ist davon auszugehen, dass möglicherweise der Verdau in dieser Versuchsreihe nicht effektiv genug war, oder es zu einem übermäßigen *Crosslinking* der Proteine während der Fixation gekommen ist (Zhuang & Shi, 2023). Es ist anzunehmen, dass mit fortschreitender Erfahrung hier Verbesserungen erreicht werden können. Truckenbrodt et al. ersetzen im *Digestion Buffer* EDTA durch Calcium, um die Reaktionsbedingungen der Proteinase K zu verbessern (Truckenbrodt et al., 2019). In Erweiterungen der ExM wie der „X10 ExM“ wird eine zehnfache Expansion beschrieben (Truckenbrodt et al., 2019). Durch eine veränderte Gelzusammensetzung mit dem Crosslinker N,N-Dimethylacrylamid anstelle von Acrylamid und Methylenbisacrylamid werden die expandierenden Eigenschaften verstärkt. Andere Erweiterungen, wie die „*Ten-fold Robust Expansion Microscopy*“ (TReX) erreicht eine 10-fache (Damstra et al., 2022) und die „*Ninefold Swelling*“ (NIFS) eine 9-fache Expansion (Li et al., 2022). Bei der iterativen ExM wird ein zweites expandierbares Gel auf das bereits expandierte Gel gegeben um so eine 20-fache Expansion zu erreichen (Chang et al., 2017).

Die Messung des Expansionsfaktors erfolgte in dieser Versuchsreihe durch Vermessung markanter Strukturen vor und nach Expansion oder alternativ durch die Messung einer bekannten Größe wie z.B. eines Zellkerns vor und nach Expansion. Dies entspricht dem verbreiteten Vorgehen in der Literatur (Damstra et al., 2023). Das Wiederfinden markanter Strukturen in prä- und post-Expansionsbildern stellte in dieser Arbeit ein sehr zeitaufwendiges und eingeschränkt reproduzierbares Vorgehen dar. Zur besseren Orientierung im Gel und schnelleren Ermittlung des Expansionsfaktors, der Geldeformität, und zur vereinfachten Navigation innerhalb des Gels wurde 2023 von Damstra et al. die „GelMap“ vorgestellt (Damstra et al., 2023). Dabei wird ein fluoreszierendes Referenzraster in der Form eines Koordinatensystems auf die Kulturoberfläche übertragen und mit der Probe in das Gel polymerisiert. Das fluoreszierende Raster expandiert mit dem Gel und ist unter dem Mikroskop als Referenz sichtbar. Dies könnte in nachfolgenden Versuchsreihen implementiert werden.

5.1.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expansionsmikroskopie eine kostengünstige und einfach zu implementierende Möglichkeit der hochauflösenden Mikroskopie darstellt. Durch die zahlreichen Erweiterungen und Verbesserungen werden immer mehr Anwendungsgebiete erschlossen und bestehende Probleme angegangen. Dies stellt einen großen Fortschritt im Vergleich zur Ursprungsversion von 2015 (Chen et al., 2015) dar, welche entgegen der initialen Zielsetzung in Ihrer Anwendbarkeit beschränkt war. Es ist essentiell, unter vielen vorhandenen Methoden die am besten geeignete ExM-Methode auszuwählen, welche sich nach der Fragestellung und den darzustellenden Strukturen richtet. Dazu gibt es eine Vielzahl an Übersichtsarbeiten, exemplarisch (Hümpfer et al., 2024; Wang et al., 2022). Gegenstand weiterer Forschung ist aktuell die Kombination der ExM mit anderen *High-Resolution Imaging* Methoden, um eine noch bessere Auflösung zu erreichen (Wang et al., 2022).

5.2 Inhaltliche Diskussion

5.2.1 Die Protein 4.1O Splicevarianten 207, 204, und 201 zeigen ein verschiedenes intrazelluläres Expressionsmuster und kolokalisieren mit F-Aktin

Übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe zeigt sich das Expressionsmuster von Protein 4.1O (207) retikulär im Zytoplasma und entlang der Zellmembran im Bereich der peripheren Zellausläufer (Bajraktarevic, 2024). Die Splicevarianten werden hier erstmals mittels Immunfluoreszenz und Expansionsmikroskopie dargestellt. Die Splicevarianten 204 und 201 zeigen ein unterschiedlich stark ausgeprägtes, punktförmiges Verteilungsmuster im Zytoplasma und in den Zellausläufern (s. Abb. 13, 14). Protein 4.1O 207 zeigt eine Kolokalisation im Bereich des submembranösen Aktinengeflechts (s. Abb. 12) und entlang der kortikalen Aktinfasern. Ebenso zeigen die Splicevarianten 204 und 201 eine Kolokalisation mit Aktin entlang der zentralen und kortikalen Aktinfasern an den Zellausläufern (s. Abb. 13, 14). Die Ergebnisse der Kolokalisation stimmen bezüglich Protein 4.1O 207 mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe überein (Bajraktarevic, 2024). Eine Kolokalisation zwischen Aktin und den Protein 4.1O Splicevarianten wurde in dieser Versuchsreihe erstmals untersucht. Aufgrund der Kolokalisation der Splicevarianten mit kortikalem und zentralem F-Aktin kann eine ähnliche Funktion als Adaptermolekül wie von Protein 4.1O 207 vermutet werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen über die Funktion der Proteinfamilie 4.1 (s. Abschnitt 1.4.2): Über die Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne binden sie an intrazelluläres Spektrin und Aktin und dienen so der Stabilisierung des Spektrin-/Aktinzytoskeletts. Außerdem binden sie mit membranassoziierten Proteinen. Allgemein ist Protein 4.1 membranös und nukleär lokalisiert. Über die subzelluläre Verteilung ist bisher bekannt, dass Protein 4.1R in den Zentrosomen des Nukleus und entlang der Plasmamembran lokalisiert ist, Protein 4.1G zytoplasmatisch und perinukleär (Hoover & Bryant, 2000).

5.2.2 Nephrin, Podocin und F-Aktin kolokalisieren

Nephrin und Podocin zeigen in dieser Versuchsreihe ein ähnliches, punktförmiges Expressionsmuster zytoplasmatisch und submembranös (s. Abb. 15). Die stärkste Expression zeigt sich perinukleär, was am ehesten durch die Überexpression zu erklären

sein könnte. Dieses Muster weicht von dem von Saleem et al. beobachteten Muster ab, dort wurde in Podozyten ein filamentöses Expressionsmuster von Nephrin und Podocin im Zytoplasma beschrieben. Allerdings wurden die Beobachtungen von Saleem et al. an immortalisierten humanen Podozyten gemacht, die Zielproteine Nephrin und Podocin wurden dort nicht überexprimiert (Saleem et al., 2002). Kolokalisation von Aktin und Nephrin zeigt sich in dieser Versuchsreihe membranös entlang der kortikalen Aktinfasern und zytoplasmatisch entlang zentraler Aktinfasern (s. Abb. 16), ebenso die Kolokalisation von Podocin und Aktin (s. Abb. 17). Nephrin, Podocin und Aktin kolokalisieren in der Triplefärbung zellmembran-assoziiert an den peripheren Zellausläufern sowie entlang zentraler Aktinfasern (s. Abb. 19). Saleem et al. beschreiben die Kolokalisation zwischen Nephrin und Podocin mit Aktin in Podozyten als „partiell an den Spitzen der Aktinfilamente“ (Saleem et al., 2002). Ein solches Muster lässt sich in dieser Versuchsreihe nicht finden. Die hier dargelegten Verteilungsmuster decken sich mit den bisherigen Erkenntnissen über die Funktion dieser Proteine. Im Podozyten sind Nephrin und Podocin bekannterweise membran-assoziiert an der Schlitzmembran lokalisiert und über Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden (s. Abschnitt 1.4.1 und 1.4.3). Auch die Kolokalisation von Nephrin und Podocin ist in Einklang mit den bisherigen Erkenntnissen, da Podocin und Nephrin miteinander interagieren. Welsh et al. zeigten 2010, dass sich bei Patienten mit nephrotischem Syndrom die Verteilung der Proteine Nephrin und Podocin verändert und mehrheitlich im Zytoplasma lokalisiert sind (Welsh & Saleem, 2010). Eine solche Beurteilung war kein Gegenstand dieser Versuchsreihe.

5.2.3 Limitationen und Ausblick

Einschränkend gilt, dass die Untersuchungen mit überexprimierten COS7-Zellen durchgeführt wurden und nicht mit humanen Podozyten. Die Auswahl des Zellsystems erfolgt im Wissen, dass Podozyten schwer transfizierbar sind. COS7-Zellen ähneln dem humanen Fibroblasten und bilden keine Fußfortsätze aus. Die erbrachten Ergebnisse können daher nicht uneingeschränkt auf das Konzept des Podozyten und der glomerulären Schlitzmembran übertragen werden. In allen Versuchen wurde normoglykämisches Medium verwendet. Es lässt sich keine Aussage treffen bezüglich eines Rearrangement des Aktinzytoskeletts unter hyperglykämischen Bedingungen. Der bildliche Nachweis einer Kolokalisation lässt keine Erkenntnisse über die Art der Interaktion zu.

Ein weiterer Zugewinn wäre eine Versuchsreihe unter hyperglykämischen Bedingungen um ein Aktinrearrangement und die Variabilität der Expressionsmuster von Nephrin und Podocin unter hyperglykämischen Bedingungen zu beurteilen. Auch wäre eine weitere Triplefärbung gegen Protein 4.1O, Nephrin und Aktin sinnvoll. Diese Versuchsreihe konnte die in der Arbeitsgruppe erstmals beschriebenen Splicevarianten bildlich darstellen. Außerdem konnte die Kolokalisation von Protein 4.1O und deren Splicevarianten mit Aktin bestätigt werden. Mit der hier neu etablierten Methode der Expansionsmikroskopie konnte ohne den Einsatz teurer oder aufwendiger Methoden eine verbesserte Auflösung als mit der Immunfluoreszenzmikroskopie allein erreicht werden.

6 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde die neue Methode der Expansionsmikroskopie zur Analyse von Kolokalisation von Schlitzmembranproteinen etabliert. Dabei wurden kritische Schritte identifiziert und mit dem Wissen der aktuellen Literatur gelöst. Immernoch bedarf es weiteren Verbesserungen, um die Stabilität zu erhöhen und den Signalverlust zu verringern. Es konnte hier demonstriert werden, dass die Expansionsmikroskopie eine verbesserte Auflösung schafft und in einem üblich ausgestatteten Labor ohne kostenintensive Materialien oder Geräte implementiert werden kann. Es wurden Protein 4.1O und deren Splicevarianten hinsichtlich des Expressionsmuster und der Kolokalisation mit F-Aktin untersucht. Eine methodisch komplexe Triplefärbung wurde mit den Proteinen Nephrin, Podocin und Aktin erfolgreich durchgeführt. Die erbrachten Ergebnisse legen nahe, dass auch die Splicevarianten eine ähnliche Funktion haben wie Protein 4.1O (207). Die Ergebnisse der Triplefärbung bestätigen, dass Nephrin und Podocin mit F-Aktin kolokalisieren.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematischer Aufbau der glomerulären Basalmembran und der glomerulären Schlitzmembran. Dem negativ geladenen, fenestrierten Endothel liegt die glomeruläre Basalmembran (GBM) auf. Die Podozytenfußfortsätze bilden mit den Transmembranproteinen die glomeruläre Schlitzmembran, hierzu gehören Nephrin, NEPH1/2, Podocin, Cadherin-3, Podoplanin. Laminin und Dystroglykan verbinden das Aktinzytoskelett des Podozyten mit der GBM. Weitere Proteine sind Utrophin, Synaptopodin für die Organisation des Zytoskeletts, NHERF-2 interagiert mit Nephrin und Podocin, FAT1 für Zelladhäsion und Signalprotein, Zonula Occludens 1 Protein als Zellkontaktprotein. Aktin bildet das Zytoskelett des Podozyten. TRPC6 ist ein Ionenkanal. Übernommen aus: (Vaz de Castro et al., 2023) Kidney Dial. 2023 , 3(4), 346-372, published 12/2023, Open Access von mdpi.com	4
Abb. 2: Genereller Aufbau Protein 4.1. N-terminale, charakteristische FERM-Domäne mit drei Bindestellen, FERM-adjacent Domain (FA) als Phosphorylierungsstelle, Spektrin-Aktin-Bindungsstelle (SAB), C-terminale Domäne (CTD). Spliceregionen Headpiece (U1), U2 und U3. Übernommen aus: (Baines et al., 2014). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, Elsevier.	7
Abb. 3: Schematische Darstellung der Protein 4.1O Splicevarianten 201, 202, 204, und 207. Unpublizierte Daten und modifiziert nach Abbildung von Herrn Prof. Sellin, Heinrich Heine Universität, 2025.....	9
Abb. 4: Aufbau der Gelkammer. Übernommen aus: (Konigshausen et al., 2021). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.....	29
Abb. 5: Funktionsweise der Expansionsmikroskopie , übernommen aus: (Konigshausen et al., 2021). Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Rechteinhaber, JoVE.	30
Abb. 6: Workflow der ExM. A) Färbung mit Alexa 488 vor (A) und nach (B) dem Verdau. Färbung mit Phalloidin Atto 647N vor (C) und nach (D) dem Verdau. Alle Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 100 µm.....	33
Abb. 7: Aktinfärbung mit mRuby-2-LifeAct-7 (A) und Färbung mit Alexa 488 (B). Beide Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 100 µm.....	34
Abb. 8: Actin ExM Färbung A) nach dem Verdau und B) nach der Expansion mit Signalretention. Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar in A) 100 µm. Scalebar in B) 38,5 µm	

(Expansionsfaktor 2,6). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).	35
Abb. 9: Aktin Ruptur durch unzureichenden Verdau , alle Postexpansion, Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 15,2 µm (Expansionsfaktor 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).	36
Abb. 10: Bestimmung des Expansionsfaktor durch Wiederfinden markanter Strukturen vor (A) und nach der Expansion (B). Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar in A) 100 µm in B) 38,5 µm (Expansionsfaktor 2,6). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).	37
Abb. 11: Methode 2: Bestimmung des Expansionsfaktors A) Zellkerngröße vor Expansion 10 µm, B) nach der Expansion 33 µm. Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar A) 20 µm, Scalebar B) 15,2 µm (Expansionsfaktor 3,3).	38
Abb. 12: Kolokalisation von Protein 4.1O 207 und Aktin . Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 63x, Scalebar 11 µm (Expansionsfaktor 1,8).	39
Abb. 13: Kolokalisation Protein 4.1O 204 und Aktin . Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 40x. Scalebar 23 µm (Expansionsfaktor 2,2).	40
Abb. 14: Kolokalisation Protein 4.1O 201 und Aktin . Post-Expansion. Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 11 µm (Expansionsfaktor 1,8).	41
Abb. 15: Triplefärbung der Proteine A) Nephtrin B) Podocin und C) Aktin. Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 15,2 µm (Expansionsfaktor 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).	42
Abb. 16: Kolokalisation von Aktin (blau) und Nephtrin (rot) in den magentafarbenen Bereichen (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 µm. (Expansionsfaktor 3,3).	43
Abb. 17: Kolokalisation zwischen Aktin (blau) und Podocin (grün) zeigt sich türkis (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 µm (Expansionsfaktor: 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al., 2021).	44
Abb. 18: Kolokalisation von Nephtrin (rot) und Podocin (grün) im Zytoplasma (gelb) und submembranös (s. Pfeilmarkierungen). Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 µm (Expansionsfaktor 3,3).	46
Abb. 19: Kolokalisation zwischen Nephtrin (rot), Podocin (grün) und Aktin (blau) zeigt sich anhand weißer Pixel (s. Pfeilmarkierungen) perinukleär, im Bereich der zentralen	

Aktinfasern und submembranös. Alle Vergrößerungsobjektiv 63x. Scalebar 10 μm
(Expansionsfaktor: 3,3). Wie bereits gezeigt in und adaptiert nach: (Königshausen et al.,
2021). 48

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Baines, A. J., Lu, H. C., & Bennett, P. M. (2014). The Protein 4.1 family: hub proteins in animals for organizing membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(2), 605-619. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.030>
- Bajraktarevic, A. (2024). *FRMD3/Protein 4.1O ist ein neuer durch MAP-Kinasen regulierter Nephrin-Adaptor an F-Aktin und ist mit Diabetes mellitus assoziiert* [Heinrich Heine Universität Düsseldorf].
- Barutta, F., Bellini, S., & Gruden, G. (2022). Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 136(7), 493-520. <https://doi.org/10.1042/cs20210625>
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313, 1642.
- Boute, N., Gribouval, O., Roselli, S., Benessy, F., Lee, H., Fuchshuber, A., Dahan, K., Gubler, M. C., Niaudet, P., & Antignac, C. (2000). NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genetics*, 24(4), 349-354. <https://doi.org/10.1038/74166>
- Bucur, O., & Zhao, Y. (2018). Nanoscale Imaging of Kidney Glomeruli Using Expansion Pathology. *Front Med (Lausanne)*, 5, 322. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00322>
- Buffon, M. P., Sortica, D. A., Gerchman, F., Crispim, D., & Canani, L. H. (2015). FRMD3 gene: its role in diabetic kidney disease. A narrative review. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/s13098-015-0114-4>
- Chang, J.-B., Chen, F., Yoon, Y.-G., Jung, E. E., Babcock, H., Kang, J. S., Asano, S., Suk, H.-J., Pak, N., Tillberg, P. W., Wassie, A. T., Cai, D., & Boyden, E. S. (2017). Iterative expansion microscopy. *Nature Methods*, 14(6), 593-599. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4261>
- Chen, F., Tillberg, P. W., & Boyden, E. S. (2015). Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*, 347(6221), 543-548. <https://doi.org/10.1126/science.1260088>
- Chen, F., Wassie, A. T., Cote, A. J., Sinha, A., Alon, S., Asano, S., Daugharthy, E. R., Chang, J.-B., Marblestone, A., Church, G. M., Raj, A., & Boyden, E. S. (2016). Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. *Nature Methods*, 13(8), 679-684. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3899>

- Chozinski, T. J., Halpern, A. R., Okawa, H., Kim, H. J., Tremel, G. J., Wong, R. O., & Vaughan, J. C. (2016). Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nat Methods*, 13(6), 485-488.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3833>
- Damstra, H. G., Mohar, B., Eddison, M., Akhmanova, A., Kapitein, L. C., & Tillberg, P. W. (2022). Visualizing Cellular and Tissue Ultrastructure Using Ten-Fold Robust Expansion Microscopy (TReX). *Elife*, 11, e73775.
- Damstra, H. G. J., Passmore, J. B., Serweta, A. K., Koutlas, I., Burute, M., Meye, F. J., Akhmanova, A., & Kapitein, L. C. (2023). GelMap: intrinsic calibration and deformation mapping for expansion microscopy. *Nature Methods*, 20(10), 1573-1580. <https://doi.org/10.1038/s41592-023-02001-y>
- Dertinger, T., Colyer, R., Iyer, G., Weiss, S., & Enderlein, J. (2009). Fast, Background-Free, 3D Super-Resolution Optical Fluctuation Imaging (SOFI). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 106, 22287.
- Diakowski, W., Grzybek, M., & Sikorski, A. F. (2006). Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 44(4), 231-248.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., & Mundel, P. (2007). Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, 17(9), 428-437.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.06.006>
- Garg, P. (2018). A Review of Podocyte Biology. *American Journal of Nephrology*, 47 Suppl 1, 3-13. <https://doi.org/10.1159/000481633>
- Gustafsson, M. G. L. (2000). Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2), 82-87.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy. *Opt. Lett.*, 19, 780.
- Hoover, K. B., & Bryant, P. J. (2000). The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(2), 229-234.
[https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(99\)00080-0](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)00080-0)
- Huber, T. B., & Benzing, T. (2005). The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 14(3), 211-216. <https://doi.org/10.1097/01.mnh.0000165885.85803.a8>

- Huber, T. B., Hartleben, B., Kim, J., Schmidts, M., Schermer, B., Keil, A., Egger, L., Lecha, R. L., Borner, C., Pavenstädt, H., Shaw, A. S., Walz, G., & Benzing, T. (2003). Nephrin and CD2AP associate with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 4917-4928. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.14.4917-4928.2003>
- Huber, T. B., Kottgen, M., Schilling, B., Walz, G., & Benzing, T. (2001). Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 41543-41546. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100452200>
- Hümpfer, N., Thielhorn, R., & Ewers, H. (2024). Expanding boundaries - a cell biologist's guide to expansion microscopy. *Journal of Cell Science*, 137(7). <https://doi.org/10.1242/jcs.260765>
- Ilatovskaya, D. V., & Staruschenko, A. (2015). TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 309(5), F393-397. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00186.2015>
- Jones, N., Blasutig, I. M., Eremina, V., Ruston, J. M., Bladt, F., Li, H., Huang, H., Larose, L., Li, S. S., Takano, T., Quaggin, S. E., & Pawson, T. (2006). Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature*, 440(7085), 818-823. <https://doi.org/10.1038/nature04662>
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C. E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A., & Tryggvason, K. (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Molecular Cell*, 1(4), 575-582. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80057-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80057-x)
- Klimas, A., Gallagher, B. R., Wijesekara, P., Fekir, S., DiBernardo, E. F., Cheng, Z., Stolz, D. B., Cambi, F., Watkins, S. C., & Brody, S. L. (2023). Magnify is a Universal Molecular Anchoring Strategy for Expansion Microscopy. *Nature Biotechnology*, 2023, 1.
- Königshausen, E., Bajraktarevic, A., Ohlsson, S., Stahl, K., Schönberger, M., Wiech, T., Haller, H. G., Rump, L. C., Schiffer, M., & Sellin, L. (2017). FRMD3/Protein 4.1O Is a Novel Nephrin Adaptor to F-Actin Regulated by MAPK- and Src-Kinases and Linked to Diabetes [Abstract].
- Königshausen, E., Reisewitz, T., Matten, L., Vienken, T., Wiech, T., Rump, L. C., & Sellin, L. (2022). FRMD3/Protein 4.1O Splice Variants Regulate Hippo Signaling and Cell Migration [Abstract].
- Königshausen, E., Schmitz, C. T., Rump, L. C., & Sellin, L. (2021). Imaging of Podocytic Proteins Nephrin, Actin, and Podocin with Expansion Microscopy. *J Vis Exp*(170). <https://doi.org/10.3791/62079>

- Kramer-Zucker, A. G., Wiessner, S., Jensen, A. M., & Drummond, I. A. (2005). Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Developmental Biology*, 285(2), 316-329. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.038>
- Kredel, S., Oswald, F., Nienhaus, K., Deuschle, K., Rocker, C., Wolff, M., Heilker, R., Nienhaus, G. U., & Wiedenmann, J. (2009). mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures. *PloS One*, 4(2), e4391. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004391>
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., LeHir, M., & Lemley, K. V. (2013). The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 304(4), F333-347. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00478.2012>
- Li, H., Warden, A. R., He, J., Shen, G., & Ding, X. (2022). Expansion microscopy with ninefold swelling (NIFS) hydrogel permits cellular ultrastructure imaging on conventional microscope. *Sci Adv*, 8(18), eabm4006. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4006>
- Lin, Y. C., Chang, Y. H., Yang, S. Y., Wu, K. D., & Chu, T. S. (2018). Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 117(8), 662-675. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.02.007>
- Mutterer, J., & Zinck, E. (2013). Quick-and-clean article figures with FigureJ. *Journal of Microscopy*, 252(1), 89-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jmi.12069>
- Ni, X., Ji, C., Cao, G., Cheng, H., Guo, L., Gu, S., Ying, K., Zhao, R. C., & Mao, Y. (2003). Molecular cloning and characterization of the protein 4.10 gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary. *Journal of Human Genetics*, 48(2), 101-106. <https://doi.org/10.1007/s100380300015>
- Ohlsson, S. (2018). *Die Rolle des Proteins 4.10 für die Funktion des Podozyten*. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. <https://books.google.de/books?id=MESD0AEACAAJ>
- Park, C. E., Cho, Y., Cho, I., Jung, H., Kim, B., Shin, J. H., Choi, S., Kwon, S. K., Hahn, Y. K., & Chang, J. B. (2020). Super-Resolution Three-Dimensional Imaging of Actin Filaments in Cultured Cells and the Brain via Expansion Microscopy. *ACS Nano*, 14(11), 14999-15010. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04915>
- Patrakka, J., & Tryggvason, K. (2007). Nephrin--a unique structural and signaling protein of the kidney filter. *Trends in Molecular Medicine*, 13(9), 396-403. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.06.006>

- Pavenstadt, H., Kriz, W., & Kretzler, M. (2003). Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiological Reviews*, 83(1), 253-307.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2002>
- Qi, C., Mao, X., Zhang, Z., & Wu, H. (2017). Classification and Differential Diagnosis of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*, 2017, 8637138.
<https://doi.org/10.1155/2017/8637138>
- Ramez, M., Blot-Chabaud, M., Cluzeaud, F., Chanan, S., Patterson, M., Walensky, L. D., Marfatia, S., Baines, A. J., Chasis, J. A., Conboy, J. G., Mohandas, N., & Gascard, P. (2003). Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron. *Kidney International*, 63(4), 1321-1337.
<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00870.x>
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *Nat. Methods*, 3, 793.
- Saleem, M. A., Ni, L., Witherden, I., Tryggvason, K., Ruotsalainen, V., Mundel, P., & Mathieson, P. W. (2002). Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *American Journal of Pathology*, 161(4), 1459-1466. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64421-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64421-5)
- Samsu, N. (2021). Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*, 2021, 1497449.
<https://doi.org/10.1155/2021/1497449>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671-675.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Stahlberg, H., & Walz, T. (2008). Molecular electron microscopy: state of the art and current challenges. *ACS Chemical Biology*, 3(5), 268-281.
<https://doi.org/10.1021/cb800037d>
- Thipsawat, S. (2021). Early detection of diabetic nephropathy in patient with type 2 diabetes mellitus: A review of the literature. *Diabetes & Vascular Disease Research*, 18(6), 14791641211058856.
<https://doi.org/10.1177/14791641211058856>
- Tillberg, P. W., Chen, F., Piatkevich, K. D., Zhao, Y., Yu, C. C., English, B. P., Gao, L., Martorell, A., Suk, H. J., Yoshida, F., DeGennaro, E. M., Roossien, D. H., Gong, G., Seneviratne, U., Tannenbaum, S. R., Desimone, R., Cai, D., & Boyden, E. S. (2016). Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. *Nature Biotechnology*, 34(9), 987-992.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3625>

- Truckenbrodt, S., Maidorn, M., Crzan, D., Wildhagen, H., Kabatas, S., & Rizzoli, S. O. (2018). X10 Expansion Microscopy Enables 25-nm Resolution on Conventional Microscopes. *EMBO Rep.*, 19, e45836.
- Truckenbrodt, S., Sommer, C., Rizzoli, S. O., & Danzl, J. G. (2019). A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nature Protocols*, 14(3), 832-863. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0117-3>
- Vaz de Castro, P. A. S., Fujihara Ide, T., Crespo Torres, F., & Simões e Silva, A. C. (2023). The View of Pediatric Nephrotic Syndrome as a Podocytopathy. *Kidney and Dialysis*, 3(4), 346-372. <https://www.mdpi.com/2673-8236/3/4/30>
- Wang, W., Chan, Y. H., Kwon, S., Tandukar, J., & Gao, R. (2022). Nanoscale fluorescence imaging of biological ultrastructure via molecular anchoring and physical expansion. *Nano Convergence*, 9(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40580-022-00318-6>
- Welsh, G. I., & Saleem, M. A. (2010). Nephtrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *Journal of Pathology*, 220(3), 328-337. <https://doi.org/10.1002/path.2661>
- Wen, G., Leen, V., Jia, Y., Rohand, T., & Hofkens, J. (2022). Improved Dye Survival in Expansion Microscopy through Stabilizer-Conjugated Linkers. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, e202202404. <https://doi.org/10.1002/chem.202202404>
- Wen, G., Vanheusden, M., Acke, A., Valli, D., Neely, R. K., Leen, V., & Hofkens, J. (2020). Evaluation of Direct Grafting Strategies via Trivalent Anchoring for Enabling Lipid Membrane and Cytoskeleton Staining in Expansion Microscopy. *ACS Nano*, 14(7), 7860-7867. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b09259>
- Yu, S. M., Nissaisorakarn, P., Husain, I., & Jim, B. (2018). Proteinuric Kidney Diseases: A Podocyte's Slit Diaphragm and Cytoskeleton Approach. *Front Med (Lausanne)*, 5, 221. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00221>
- Zhuang, Y., & Shi, X. (2023). Expansion microscopy: A chemical approach for super-resolution microscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, 81, 102614. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102614>

Danksagung

Zuletzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zu meiner Promotion begleitet und so vielseitig unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. L. C. Rump für die Möglichkeit, die wissenschaftlichen Untersuchungen im Forschungslabor der Klinik für Nephrologie durchführen zu dürfen. Bei Herrn Prof. Dr. med. L. Sellin bedanke ich mich für die konstruktiven Ideen, den stetigen Austausch und die fachliche Betreuung.

Ein großes Dankeschön gilt ebenso Frau PD Dr. med. E. Königshausen für die engagierten und wertschätzenden Gespräche, Hilfestellungen und Motivationen.

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

Für die einzigartige und engagierte technische Unterstützung in allen Lagen und die Einarbeitung danke ich herzlichst Frau B. Duvnjak.

Ein besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden für die unzähligen Aufmunterungen und bereichernden Gespräche.

Meinen Freunden, meinen Geschwistern, und meinem Freund danke ich für die unermüdliche moralische Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, diese Arbeit ist Ihnen gewidmet.