

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Roman Ulrich Müller

Eigenschaften von Protein 4.1O und dessen Interaktionsverhalten mit Nephrin

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

vorgelegt von
Yusuf Çabuk

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Butz

„Alle Wissenschaft ist nur eine Verfeinerung des Denkens des Alltags“

Albert Einstein

Publikationen

Zusammenfassung

Die Albuminurie, ein zentraler Marker für das Risiko von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Herzinfarkte und Schlaganfälle, ist eng mit einer Schädigung des glomerulären Filters verbunden. Dieser ist für die Barrierefunktion in den Nieren verantwortlich. Dieser Filter besteht aus einer komplexen Struktur, die fenestriertes Endothel, die glomeruläre Basalmembran und die Schlitzmembran benachbarter Podozyten umfasst. Der glomeruläre Filter wird durch verschiedene Proteine gebildet, maßgeblich hierunter das Nephrin. Gleichwohl rückt Protein 4.1O zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. FRMD3, das für das Protein 4.1O kodiert, wurde als vielversprechendes Kandidatengen für die diabetische Nephropathie identifiziert, aber seine genaue Funktion blieb bisher ungeklärt. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Protein 4.1O in Podozyten exprimiert wird und eine enge Wechselwirkung mit Schlitzmembranproteinen wie Nephrin sowie mit dem Zytoskelett-Protein Aktin eingeht. Ein Verlust des 4.1O-Paralogs (*frmd3*) im Zebrafischmodell führte zu einem nephrotischen Syndrom.

Das Ziel dieses Projekts ist es, das Interaktionsverhalten von Protein 4.1O mit Nephrin zu untersuchen und daraus Rückschlüsse auf seine funktionellen Eigenschaften zu ziehen. Dazu wurden verschiedene Transkriptionsvarianten, potenzielle Coiled-Coil-Domänen und die Palmitoylierung des Protein 4.1O analysiert.

HEK293T-Zellen exprimierten Nephrin sowie Protein 4.1O und dessen Varianten. Die Interaktion zwischen Nephrin und Protein 4.1O wurde anschließend mittels Co-Immunpräzipitation beurteilt.

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Transkriptionsvarianten des Protein 4.1O mit dem zytosolischen Teil Nephrins interagieren. Die Deletion der coiled-coil-Domäne führte zu einer signifikanten Verstärkung dieser Interaktion. Um den Einfluss der Palmitoylierung auf die Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen, wurden spezifische Cysteinresiduen, die der Palmitoylierung unterliegen, durch Mutationen ersetzt. Diese Varianten zeigten ebenfalls eine robuste Interaktion mit dem zytosolischen Teil von Nephrin.

Zusammenfassend bleibt die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin trotz der Einflussfaktoren alternatives Splicing und der Palmitoylierung erhalten. Die Deletion der coiled-coil-Domäne führt zur gesteigerten Interaktion mit Nephrin. Dies deutet auf einen regulatorischen Einfluss der Coiled-Coil-Domäne auf diese Interaktion hin.

Abstract

Albuminuria, a key marker for the risk of cardiovascular diseases such as heart attacks and strokes, is closely associated with damage to the glomerular filter, which fulfills a crucial barrier function in the kidneys. This filter consists of a complex structure that includes fenestrated endothelium, the glomerular basement membrane and the slit diaphragm of neighbouring podocytes. The glomerular filter is maintained by various proteins, one of which is increasingly becoming the focus of research: the protein 4.1O. FRMD3, which encodes protein 4.1O, has been identified as a promising candidate gene for diabetic nephropathy, but its exact function remains unclear [2]. Previous work has shown that protein 4.1O is expressed in podocytes and interacts closely with slit diaphragm proteins such as nephrin as well as with the cytoskeletal protein actin. A loss of the 4.1O paralogue (frmd3) in the zebrafish model led to a nephrotic syndrome.

The aim of the project is to investigate the interaction between protein 4.1O and Nephrin and to derive insights into the functional properties of 4.1O. For this purpose, various transcriptional variants, potential coiled-coil domains, and the palmitoylation of 4.1O were analyzed.

HEK293T cells were used to express Nephrin, as well as protein 4.1O and its variants. Their interaction was then assessed via co-immunoprecipitation.

The results of the present study show that the transcription variants of protein 4.1O interact with the cytosolic part of nephrin. Deleting the coiled-coil domain significantly enhanced this interaction. To investigate the influence of palmitoylation on the protein-protein interaction, specific cysteine residues that are subject to palmitoylation were replaced by mutations. These variants also showed a robust interaction with the cytosolic part of nephrin.

In summary, the interaction of protein 4.1O and nephrin is maintained despite the influence of alternative splicing and palmitoylation. Deletion of the coiled-coil domain increases the interaction with Nephrin, suggesting a regulatory function of this domain in modulating 4.1O–Nephrin binding.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäuren
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
CD2AP	CD2 assoziiertes Protein
Co-IP	Co-Immunpräzipitation
DDT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
FERM	4.1-Protein (Four-point-one), Ezrin, Radixin, Moesin
FRMD3	FERM domain containing 3
GLEPP	Glomerular Epithelial Protein 1
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HEBS	HEPES Buffered Saline
HEK293T	Human embryonic kidney cells 293T
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SABD	Spektrin-Aktin-Bindungs-Domäne
SFK	Src-Familien-Kinase
sIg	<i>surface immunoglobine</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Y	Tyrosin
ZO-1	Zonula Occludens 1

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	<i>Die Glomeruläre Filterbarriere.....</i>	<i>1</i>
1.1.1.	Der Aufbau der Glomerulären Filterbarriere	1
1.1.2.	Das dynamische Modell der Glomerulären Schlitzmembran	3
1.2.	<i>Das Protein 4.1O</i>	<i>7</i>
1.2.1.	Protein 4.1 Superfamilie	7
1.2.2.	FRMD3 (FERM domain containing 3)-Gen.....	8
1.2.3.	Struktur.....	9
1.2.4.	Funktion	13
1.3.	<i>Die Palmitoylierung.....</i>	<i>18</i>
2.	Ziele der Arbeit	19
3.	Material & Methoden	20
3.1.	<i>Material</i>	<i>20</i>
3.1.1.	Geräte	20
3.1.2.	Chemikalien.....	21
3.1.3.	Puffer	22
3.1.4.	Polyacrylamidgele	23
3.1.5.	ECL	24
3.1.6.	Antikörper	24
3.1.7.	Restriktionsenzyme & Puffer	24
3.1.8.	Kits	24
3.1.9.	Plasmide	25
3.1.10.	Zellkultur.....	25
3.1.11.	Software	25
3.2.	<i>Methoden</i>	<i>27</i>
3.2.1.	Zellkultur.....	27
3.2.2.	Transfektion.....	27
3.2.3.	Zellernte	28
3.2.4.	Co-Immunpräzipitation	28
3.2.5.	SDS-Gelelektrophorese	29
3.2.6.	Western-Blot	29
3.2.7.	Immunologischer Nachweis	30
3.2.8.	Transformation	30
3.2.9.	DNA-Isolierung und Aufreinigung	31
3.2.10.	Restriktionsenzymverdau	31
3.2.11.	Agarose-Gelelektrophorese	32

4.	Ergebnisse	33
4.1.	<i>Interaktion von 4.1O Splicevarianten mit Nephrin</i>	33
4.2.	<i>Interaktion von 4.1O Punktmutanten mit Nephrin</i>	35
4.2.1.	Protein 4.1O C516A/S.....	35
4.2.2.	Protein 4.1O C533A/S.....	36
4.2.3.	Protein 4.1O C552A/S.....	37
4.3.	<i>Interaktion von 4.1O Mutante cc_del mit Nephrin.....</i>	39
5.	Diskussion & Schlussfolgerungen	41
5.1.	<i>Einfluss des alternativen Splicings von Protein 4.1O auf die Interaktion zu Nephrin</i>	41
5.2.	<i>Einfluss der Palmitoylierung von Protein 4.1O auf die Interaktion zu Nephrin</i>	43
5.3.	<i>Einfluss der coiled-coil Domäne von Protein 4.1O auf die Interaktion zu Nephrin</i>	45
5.4.	<i>Limitationen</i>	47
5.5.	<i>Schlussfolgerungen</i>	48
6.	Abbildungsverzeichnis	50
7.	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	52

1. Einleitung

1.1. Die Glomeruläre Filterbarriere

Der glomeruläre Filter stellt die Blut-Harn-Schranke dar und ist die entscheidende Einheit im Nephron für die Filtrationsfunktion der Niere. Daher ist die Integrität und Funktion dieser Membran für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion von großer Bedeutung. Als hochspezialisiertes und komplexes Netzwerk aus Zellen und Proteinen fungiert sie als selektivpermeable Filterbarriere, deren Selektion von der Größe, Form und Ladung der filtrierte Moleküle abhängt [6]. So wird gewährleistet, dass große Moleküle wie Serumproteine und Blutzellen nicht in den Urin gelangen, während harnpflichtige (niedermolekulare) Moleküle den Filter passieren können. Der Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere umfasst drei Hauptkomponenten: das kapillare, fenestrierte Endothel, die Basalmembran, die Podozytenfußfortsätze mit der glomerulären Schlitzmembran [7].

1.1.1. Der Aufbau der Glomerulären Filterbarriere

Das glomeruläre Endothel ist ein spezielles fenestriertes Endothel, das durch das Fehlen von Membranen in den Fenstern gekennzeichnet ist. Diese typischerweise 70-100 nm großen Öffnungen ermöglichen einen hohen Blutplasmafluss und bilden gleichzeitig eine effektive Barriere gegen größere Blutzellen und Makromoleküle [8]. Die luminale Seite des Endothels ist von einer Glykokalyx-Schicht bedeckt, in der Podocalyxin, ein transmembranes Sialomucin mit zahlreichen negativen Ladungen, eine Schlüsselkomponente darstellt. Diese negativen Ladungen sind entscheidend für die ladungsselektive Filtrationsbarriere [9].

Die etwa 300 nm dicke glomeruläre Basalmembran befindet sich zwischen dem Kapillarendothel und den Podozyten. Sie besteht aus einer zentralen Lamina densa, die von der Lamina rara interna (endotheliale Seite) und der Lamina rara externa (podozytenseitig) flankiert wird [10]. In diese Laminae ragen Zell-Adhäsionsmoleküle hinein, die die Verankerung von Endothelzellen und Podozyten ermöglichen. An die

Lamina densa gebundene Heparansulfat-Proteoglykane verleihen der glomerulären Basalmembran eine starke negative Ladung [11].

Die interdigitierenden Fußfortsätze bilden die Podozytenschicht, wodurch eine nahezu vollständige Abdeckung der glomerulären Basalmembran erzielt wird. Die verbleibenden etwa 30-40 nm breiten Spalten werden von einer Schlitzmembran überspannt [12]. Diese Membran besteht hauptsächlich aus Nephrin-Molekülen, die von den Füßen benachbarter Podozyten stammen und sich in der Mitte des Schlitzes überlappen, während sie seitlich Filtrationsporen bilden. Die intrazelluläre Domäne des Nephrins ist über mehrere Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Jüngste Studien zeigen, dass diese Verbindung zwischen Nephrin und Zytoskelett dynamisch ist und durch verschiedene Signalwege reguliert wird. Diese Aspekte werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

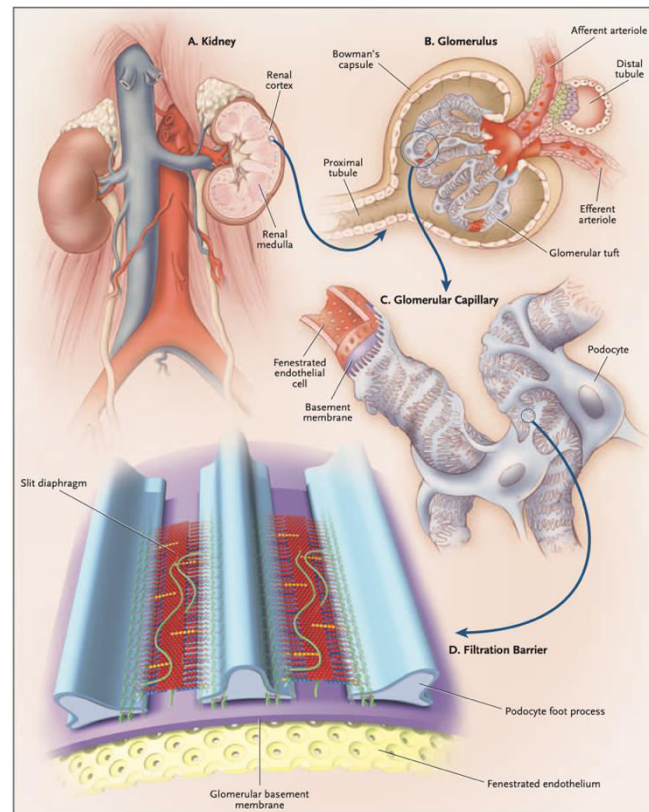


Abbildung 1: Aufbau der glomerulären Filterbarriere

A Makroanatomie der Nieren. B Glomerulus. C glomeruläre Kapillarschlinge mit aufgelagerten Podozyten. D Dreischichtige Filterbarriere bestehend aus der Schlitzmembran, der glomerulären Basalmembran und dem fenestrierten Kapillarendothel.

Reproduced with permission from The New England Journal of Medicine 2006; 354:1388, Copyright Massachusetts Medical Society [4]

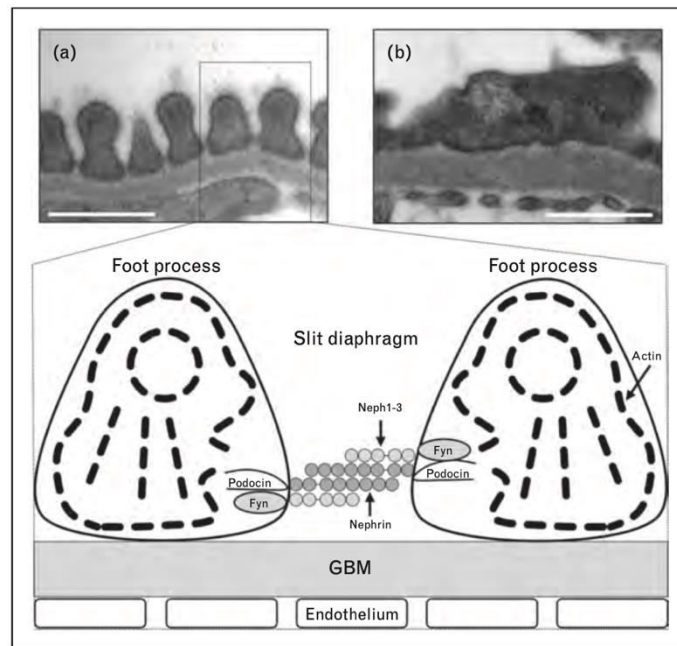


Abbildung 2: Molekulare Architektur der glomerulären Schlitzmembran

Die Schlitzmembran wird durch die Nephrin-Moleküle der interdigitierenden Podozyten gebildet. a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme benachbarter Podozytenfußfortsätze. Der Ausschnitt zeigt die Komponenten des Schlitzdiaphragmas

(b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme ausgelöschter Podozytenfußfortsätze.

Reproduced with permission from Lippincott Williams & Wilkins[5]

1.1.2. Das dynamische Modell der Glomerulären Schlitzmembran

Die Integrität und Funktion der Schlitzmembran wird durch ein komplexes Netzwerk von Proteinen gewährleistet, die in der Lipiddoppelschicht der podozytären Fußfortsätze verankert sind und miteinander interagieren. Diese Proteine sind nicht nur für die Struktur verantwortlich, sondern spielen auch eine zentrale Rolle in Signalübertragungsprozessen, die die Podozytenfunktion und die glomeruläre Filtration regulieren. Dadurch wird ein dynamisches Proteinnetzwerk gebildet, das auf verschiedene Reize reagieren kann. Als wichtige regulatorische Moleküle der glomerulären Schlitzmembran wurden bisher die Proteine Zonula Occludens 1 (ZO-1), P-Cadherin, FAT1, Neph1, Neph2, Neph3, Podocin, β -arrestin2, Glomerular Epithelial Protein 1 (GLEPP1) identifiziert [13-21]. Im Folgenden werden vier Schlüsselproteine der Schlitzmembran dargestellt: Nephrin, Podocin, β -Arrestin2 und GLEPP1. Das Protein 4.1O wird in Kapitel 2.4.5 beschrieben.

1.1.2.1. Nephrin

Das 185 kDa schwere Nephrin-Protein wird auf dem NPHS1-Gen auf Chromosom 19q13.1 codiert. Mutationen in NPHS1 verursachen das autosomal-rezessive kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (CNF), das sich durch massive Proteinurie, Hypalbuminämie und früh einsetzende Ödeme auszeichnet [22]. Nephrin ist ein Transmembranprotein mit einer kurzen intrazellulären Domäne (AA 1087 - 1241) und einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne, die aus acht Immunglobulin-ähnlichen Modulen und einer Fibronectin Typ III-ähnlichen Domäne besteht. Dieser extrazelluläre Teil bildet über eine Homodimerisierung mit den Nephrin-Molekülen benachbarter Podozyten und einer Interaktion mit Nephl und Neph2 [17] die glomeruläre Schlitzmembran (s. Abb. 2). Somit zeigt die glomeruläre Schlitzmembran durch die Homodimerisierung von Nephrin und dessen Interaktion mit *tight*- und *adherens-junction*-Proteinen Eigenschaften, die einer *adherens junction* ähneln.

Für die zytoplasmatische Domäne des Nephrins konnten multiple Protein-Protein-Interaktionen gezeigt und Funktionen abgeleitet werden. Hier findet die Verankerung des Nephrins mit dem Aktin-Zytoskelett statt. Die intrazelluläre Domäne von Nephrin bindet an das Adapterprotein *CD2 assoziiertes Protein* (CD2AP), das wiederum mit Aktin interagiert [23]. Somit stellt CD2AP als Adapterprotein eine Verbindung zwischen den zytoplasmatischen Abschnitten der Schlitzmembranproteine und dem Aktin-Zytoskelett her und stabilisiert die Schlitzmembranstruktur. Zur Gruppe der zytoskeletalen Adapterproteine zählt auch Nck2, indem es über eine SH2-Domäne an Nephrin und über eine SH3-Domäne an Effektorproteinen des Zytoskeletts bindet [24]. Ohlsson et al. konnten zeigen, dass 4.1O an die Schlitzmembranproteine Nephrin, Nephl und GLEPP bindet und mit dem Aktin-Zytoskelett interagiert, was auf seine Rolle als *linker*-Protein hinweist [25].

Neben der Verankerung am Zytoskelett ist Nephrin an mehreren Signaltransduktionswegen involviert. Hierzu gehören Prozesse wie Endozytose, Polarität, Umbau des Aktinzytoskeletts, Transkription, Überleben und Kalzium-Signalisierung [5]. Diese Signaltransduktion wird durch die Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste des Nephrins reguliert. Hierfür besitzt der zytoplasmatische C-Terminus von Nephrin insgesamt neun Tyrosinreste, von denen drei im menschlichen Nephrin hochwirksam für Src-Familie-Kinasen sind: Tyr1176, Tyr1193 und Tyr1217 [26].

Zudem besitzt Nephrin acht IgG-ähnliche Domänen, die jeweils zwei Cysteine enthalten, welche Disulfidbrücken ausbilden und so die Proteinstruktur stabilisieren. Darüber hinaus existieren drei freie Cysteinreste, die vermutlich an Proteininteraktionen beteiligt sind. Ihr Fehlen führt zu Proteinurie und dem kongenitalen nephrotischen Syndrom [27, 28].

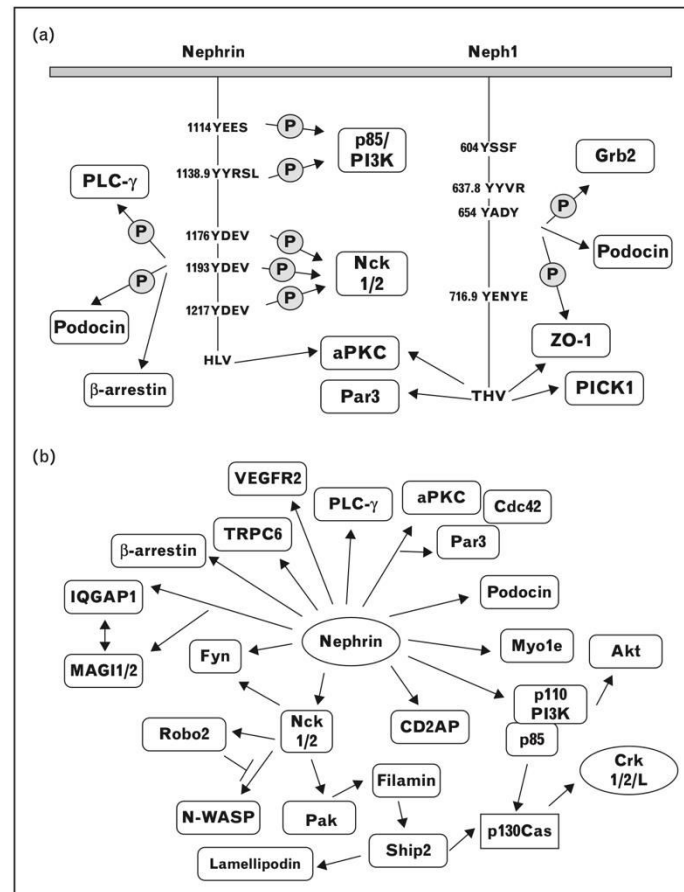


Abbildung 3: Übersicht der Signalkomplexe an der Schlitzmembran

(a) Darstellung der intrazellulären Tyrosinreste vom humanen Nephrin und murinen Neph1, welche Phosphorylierungen unterliegen.

(b) Übersicht der Signaltransduktionswege von Nephrin.

Reproduced with permission from Lippincott Williams & Wilkins[5]

1.1.2.2. Podocin

Podocin wird vom NPHS2-Gen kodiert und ist etwa 42 kDa schwer. Mutationen im NPHS2-Gen führen ebenfalls zum nephrotischen Syndrom im Kindesalter und zur chronischen Nierenerkrankung [19, 29]. Es gehört zu Familie der Stomatin-ähnlichen Proteine und besitzt eine charakteristische Haarnadelstruktur [12, 19]. Podocin befindet

sich in den Lipid-Rafts der Podozyten-Plasmamembran, in denen viele Komponenten der Signaltransduktion lokalisiert sind [30]. Die C-terminale PHB-Domäne von Podocin kann Nephrin im zytoplasmatischen Anteil (AA 1183 – 1208) binden [31]. Somit führt die Bindung von Podocin und Nephrin zur Rekrutierung von Nephrin in Lipid-Rafts. Es resultiert die Förderung der Nephrin-vermittelten Signalübertragung in Podozyten. Zudem wurde gezeigt, dass Nephrin insbesondere im phosphorylierten Zustand Podocin bindet [31]. Die Interaktion von Nephrin zu Podocin wird daher durch die Phosphorylierung von Nephrin reguliert. Auch interagiert Podocin mit Nephrin und CD2AP [4, 30].

1.1.2.3. β -Arrestin2

β -Arrestin2 wird von dem Gen ARRB2-Gen kodiert. Es ist 46 kDa schwer und gehört zur Familie der Arrestinproteine. Ursprünglich war es für seine Rolle in der Desensibilisierung und Internalisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) bekannt [32]. Quack et al. konnten zeigen, dass β -Arrestin2 in der glomerulären Schlitzmembran exprimiert wird. Dort interagiert β -Arrestin2 spezifisch mit Nephrin zwischen den Aminosäuren 1120-1125 von Nephrin abhängig vom Phosphorylierungsstatus von Tyrosin 1193 [31]. Die Bindung von β -Arrestin2 an Nephrin führt zur Endozytose und den Abbau von Nephrin. Dieser Prozess ist daher an der dynamischen Regulation der Nephrin-Expression an der Zelloberfläche und somit für die Aufrechterhaltung der Integrität der Schlitzmembran beteiligt.

1.1.2.4. GLEPP-1

Glomerular epithelial protein 1 (GLEPP-1) ist auch bekannt als Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ O (PTPRO) bekannt. Es wird vom PTPRO-Gen kodiert und im Gehirn und in Podozyten exprimiert [33]. In den Podozyten wird GLEPP-1 im apikalen Pol der Podozytenfußfortsätze exprimiert. Grabowski et al. berichten über eine Expression an der glomerulären Schlitzmembran, die durch Immunogold-Färbung nachgewiesen wurde [34]. Es ist ein hochkonserviertes Transmembranprotein mit einem großen extrazellulären und einem C-terminalen intrazellulären Abschnitt mit einer Tyrosinphosphatase-Domäne [20]. GLEPP1 interagiert mit Nephrin, Podocin, Src und

Fyn, Src und Fyn sind Src-Familien-Kinasen (SFK) und können Nephrin an intrazellulären Tyrosinresiduen phosphorylieren [35]. Weiterhin konnten Grabowski et al. zeigen, dass die Interaktion von GLEPP-1 mit SFKs zu einer Aktivierung der SFKs durch die Dephosphorylierung am Y527 führt. Die aktivierten SFKs können damit Nephrin am Y1193 phosphorylieren und damit die Bindung von Nephrin zu Podocin verstärken. In Folge wird Nephrin in der Schlitzmembran stabilisiert [34]. Somit ist GLEPP-1 an der Modulation der Nephrin-Signaltransduktion beteiligt.

Zusammenfassend bildet die Interaktion zwischen Nephrin und weiteren Proteinen ein komplexes Netzwerk, das für die Funktion der glomerulären Schlitzmembran entscheidend ist. Auf posttranslationaler Ebene wird Nephrin durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Störungen in diesem Netzwerk können zu schwerwiegenden Nierenerkrankungen führen, was die Bedeutung eines tieferen Verständnisses dieser Interaktionen für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze unterstreicht.

1.2. Das Protein 4.1O

Das Protein 4.1O gehört zur Familie der Bande 4.1 Proteine. Etymologische Grundlage ist eine Elektrophorese von zellulären Proteinen, in welchem das Protein 4.1O in der vierten Bande und der ersten Subbande zu liegen kommt. Da das Protein im adulten Gewebe ovariell entdeckt wurde, fügte man zusätzlich ein „O“ für *ovary type* an das Ende. Initial konnte eine Expression im fetalen Skelettmuskel, Thymus und Gehirn nachgewiesen werden [36]. Neuere Untersuchungen zeigen ebenfalls den Nachweis des Proteins in vielen weiteren Geweben [37, 38] unter anderem in humanen Podozyten und HEK293T-Zellen [25].

1.2.1. Protein 4.1 Superfamilie

Die Familie der 4.1 Proteine gehören zur Gruppe der Proteine mit einer N-terminal gelegenen FERM (4.1-Protein, Ezrin, Radixin, Moesin) -Domäne. Dazu zählen Talin, Merlin, die Gruppe der ERM- (Ezrin, Radixin, Moesin) Proteine sowie einige

Tyrosinkinasen und -phosphatasen (s. Tab. 2). Zur Gruppe der Proteine 4.1 gehören neben dem Protein 4.1O (*ovary type*) die Proteine 4.1R (*red-blood-cell type*), 4.1G (*general type*), 4.1B (*brain-type*) und 4.1N (*neuronal-type*), benannt nach dem Gewebe ihrer Entdeckung. Im Rahmen stetiger Forschung ist man heute zur Auffassung gekommen, dass diese Proteine ubiquitär [37] exprimiert werden.

1.2.2. FRMD3 (FERM domain containing 3)-Gen

Das proteincodierende Gen des Protein 4.1O heißt FRMD3-Gen und befindet sich auf dem langen Arm des neunten Chromosoms (9q21.32). Es umfasst 295557 bp [39] bestehend aus 14 Exons und 13 Introns [36]. Es kodiert für 6 Transkriptionsvarianten des Protein 4.1O, wobei nur 5 davon zu Proteinen prozessiert werden. Dieses Gen konnte als Kandidatengen für die diabetische Nephropathie bei Typ 1 Diabetikern identifiziert werden [40]. Das Risiko einer diabetischen Nephropathie im Fall eines SNP im FRMD3-Gen ist signifikant um den Faktor 1,45 erhöht [40]. Für Typ-2-Diabetes zeigte sich beim rs1888747-Polymorphismus des FRMD3-Gens, dass der homozygote C/C-Genotyp mit einem protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie verbunden ist [41]. Zudem konnte Martini et al. zeigen, dass die glomeruläre Expression von FRMD3

bei Typ-2-Diabetikern mit fortschreitender Erkrankung signifikant abnimmt [42]. Die vorliegenden Assoziationen deuten auf eine potenzielle funktionelle Bedeutung des FRMD3-Gens im Kontext der diabetischen Nephropathie hin.

<i>Transcript ID</i>	Name	bp	Protein	Biotype	UniProt Match
<i>ENST00000304195.8</i>	FRMD3-201	5260	597 AA	Protein coding	A2A2Y4-1
<i>ENST00000621208.4</i>	FRMD3-207	5064	553 AA	Protein coding	A2A2Y4-5
<i>ENST00000376438.5</i>	FRMD3-204	2198	556 AA	Protein coding	A2A2Y4-2
<i>ENST00000376434.5</i>	FRMD3-203	1397	362 AA	Protein coding	A2A2Y4-3
<i>ENST00000328788.5</i>	FRMD3-202	964	213 AA	Protein coding	A2A2Y4-4
<i>ENST00000431299.1</i>	FRMD3-205	662	140 AA	Protein coding	Q5JV61
<i>ENST00000465485.1</i>	FRMD3-206	604	No protein	Processed transcript	-

Tabelle 1: Transkriptionsvarianten des Protein 4.1O.

FRMD3 kodiert für 5 Proteinvarianten des Protein 4.1O. Belegt wurde bisher nur die Variante 207 und 201 in HEK-293T-Zellen.

1.2.3. Struktur

Charakteristische Eigenschaft der Proteine 4.1 ist eine Dreiteilung der Struktur. Es besteht aus einer N-terminal gelegenen 32 kDa FERM-Domäne (mit einer direkt daneben befindlichen 5 kDa FA-Domäne), eine 13 kDa aktinbindende Domäne sowie eine 12 kDa C-terminale Domäne (Abb. 4). Dieser Aufbau findet sich in verschiedenen Mitgliedern der Familie, einschließlich des erythrozytären Proteins 4.1R [43]. Dies unterstreicht die evolutionäre Konservierung dieser Proteingruppe.

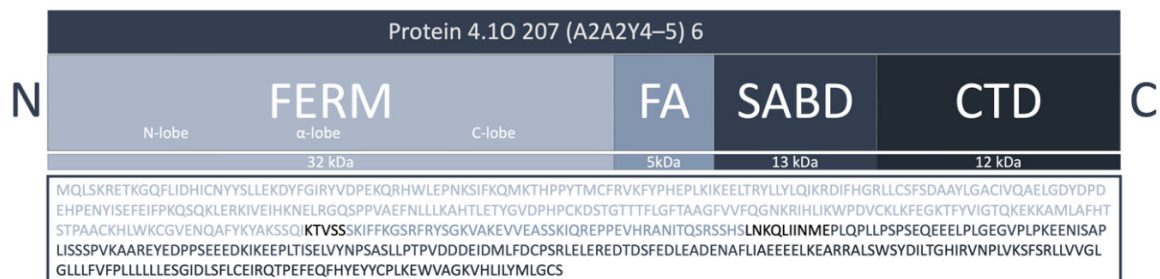


Abbildung 4: Domänen des Protein 4.1O Variante 207 basierend auf SMART und der Vorarbeit [7] unserer Arbeitsgruppe

Protein 4.1O besteht aus einer N-terminal gelegenen FERM-Domäne typischerweise benachbart mit seiner regulierenden FERM-adjacent-Domäne. Weiterhin folgt eine Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne und abschließend die C-terminale Domäne.

SMART: Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)[2, 3]; FERM: 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin; FA: FERM-adjacent; SABD: spectrin-actin-binding domain; CTD: C-terminal domain; kDa: kilodalton;

Für das Protein 4.1O wurde mithilfe des Programms PCOILS [44, 45] eine potenzielle coiled-coil-Domäne im Bereich der Aminosäuren 445–472 vorhergesagt, analog zu den Strukturelementen im Protein 4.1R (Abb. 5). Die coiled-coil-Struktur wurde erstmals 1953 von Francis Crick beschrieben [46]. Es sind Struktur motive, die durch die spezifische Interaktion von zwei oder mehr α -Helices entstehen. Diese Helices winden sich umeinander und bilden eine superhelikale Struktur, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäureresten stabilisiert wird. Sie weisen eine Periodizität von sieben Aminosäureresten auf, die sogenannte Heptad-Wiederholung. Dabei handelt es sich um eine wiederholende Abfolge von sieben Aminosäureresten (a-b-c-d-e-f-g), wobei hydrophobe Aminosäuren bevorzugt an den Positionen a und d auftreten. Coiled-coil-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen. Diese Interaktionen sind wichtig für die Bildung von Multiproteinkomplexen sowie für die Funktionalität vieler Proteine [47].

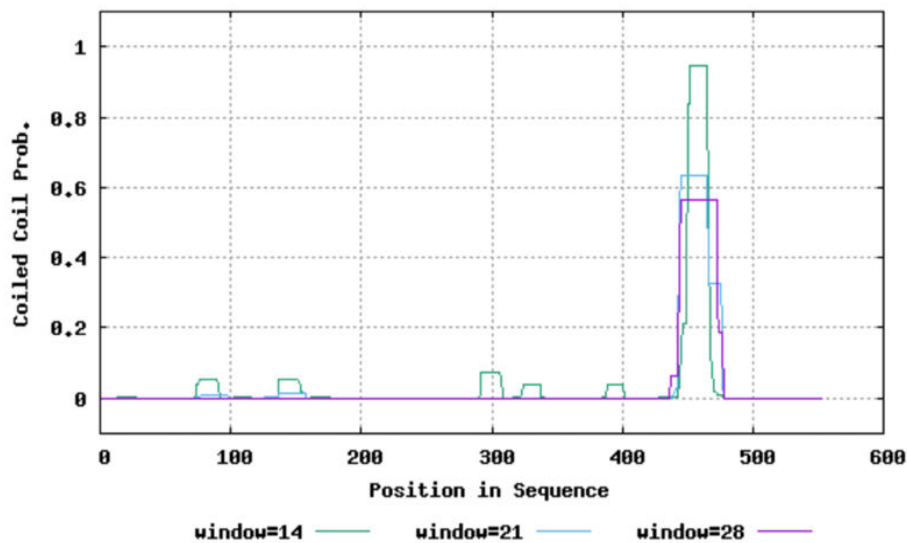


Abbildung 5: Wahrscheinlichkeit einer coiled-coil Domäne im Protein 4.10 Transkriptionsvariante 207 basierend auf der PCOILS Analyse-Software [3-6].

Die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein einer coiled-coil-Domäne mit einem Fenster von 14 im Bereich von 452-465 liegt bei 94,5 % basierend auf den Berechnungen von PCOILS. Die Wahrscheinlichkeit im Bereich von 445-465 (Fenster 21) liegt bei 63,3 % und im Bereich von 445-472 (Fenster 28) bei 56,4 %.

Die Tertiärstruktur der Protein-4.10-Varianten wurde mithilfe öffentlich zugänglicher Vorhersagemodelle (*AlphaFold2*) analysiert [1, 38]. Da in den verfügbaren Datenbanken bislang lediglich ein Modell der Transkriptionsvariante 201 vorliegt, wurde zur weiterführenden strukturellen Charakterisierung die cloudbasierte Plattform *ColabFold* verwendet [1, 38, 48, 49], um Vorhersagemodelle für die Varianten 204 und 207 zu erzeugen (s. Abbildungen 6 – 8). Diese Modelle ermöglichen eine vergleichende Analyse der Splicevarianten hinsichtlich struktureller Unterschiede

Die grundlegende Struktur der drei Proteine ist ähnlich. Sie besitzen alle einen C-Terminus, eine FERM-Domäne, eine prädiktiv schlaufenförmige Spektrin-Aktin-Bindungsdomäne (SABD) -Domäne und einen N-Terminus. Im Wesentlichen unterscheiden sich die Varianten in ihren terminalen Bereichen. Während die Splicevarianten 201 und 204 einen längeren N-Terminus aufweisen, ist dieser bei der Variante 207 vergleichsweise sehr kurz (5 AA). Der N-Terminus ist auf den Abbildungen jeweils unten links abgebildet (Abb. 6 - 8).

Der C-Terminus kommt auf den Abbildungen (Abb. 6 - 8) unten rechts zu liegen. Dieser ist ebenfalls verschieden lang. Insbesondere ist hier die Variante 204 durch das Fehlen der Aminosäuresequenz ab der 513. Aminosäure der Variante 207 gekennzeichnet. Damit fehlt der Variante 204 der C-terminale Abschnitt mitsamt der Bindungsstelle für Nephrin. Eine Übersicht der Sequenzunterschiede zwischen den Varianten ist in Abbildung 9 dargestellt (Uniprot Align-Funktion).

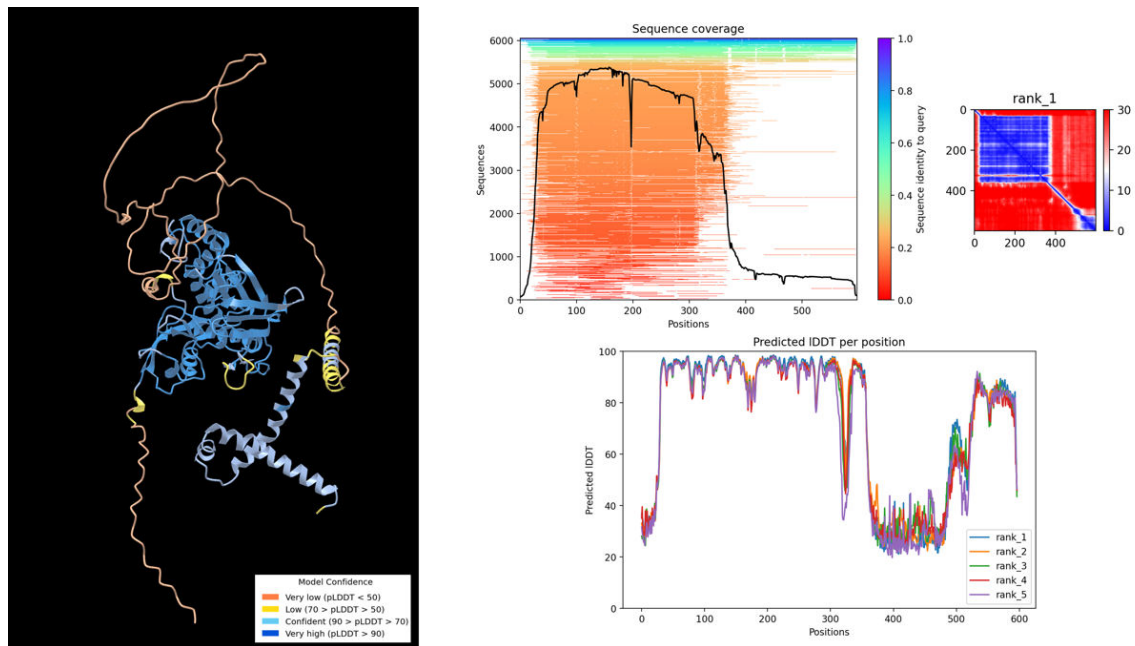


Abbildung 6: Tertiärstruktur der Proteine 4.10 modelliert mit AlphaFold [1, 2] der Variante 201.

Die Abbildung zeigt die 3D-Konformation des Proteins A2A2Y4-1. Dabei sind unterschiedliche Bereiche des Proteins mit unterschiedlicher Konfidenz berechnet worden (s. Farbkodierung links unten).

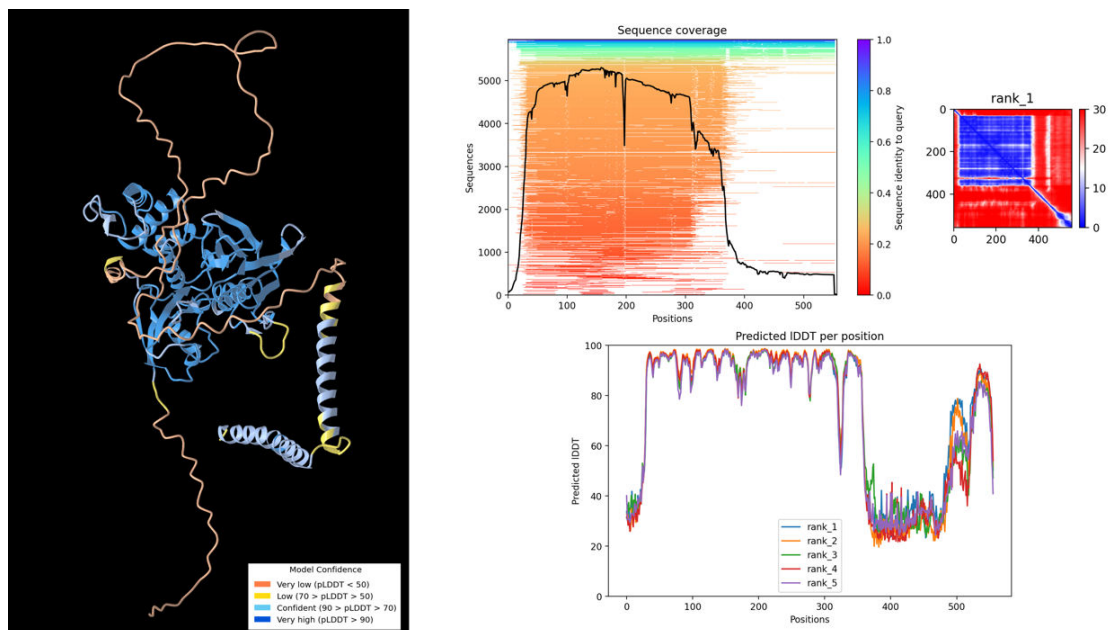


Abbildung 7: Tertiärstruktur der Proteine 4.10 modelliert mit AlphaFold [1, 2] der Variante 204.

Die Abbildung zeigt die 3D-Konformation des Proteins A2A2Y4-2. Dabei sind unterschiedliche Bereiche des Proteins mit unterschiedlicher Konfidenz berechnet worden (s. Farbkodierung links unten).

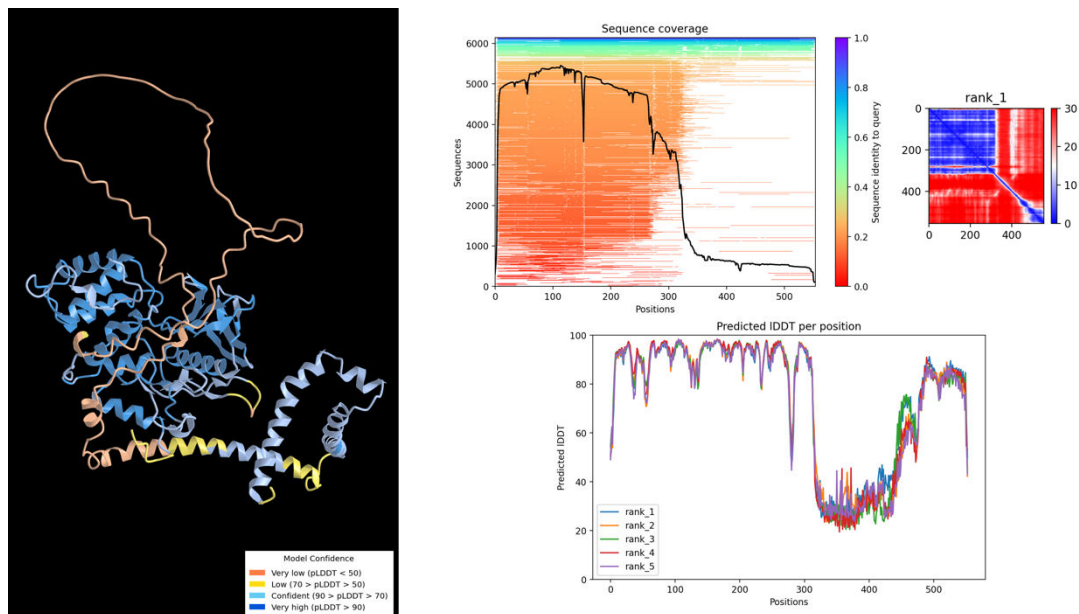


Abbildung 8: Tertiärstruktur der Proteine 4.10 modelliert mit Alphafold [1, 2] der Variante 207.

Die Abbildung zeigt die 3D-Konformation des Proteins A2A2Y4-5. Dabei sind unterschiedliche Bereiche des Proteins mit unterschiedlicher Konfidenz berechnet worden (s. Farbkodierung links unten).

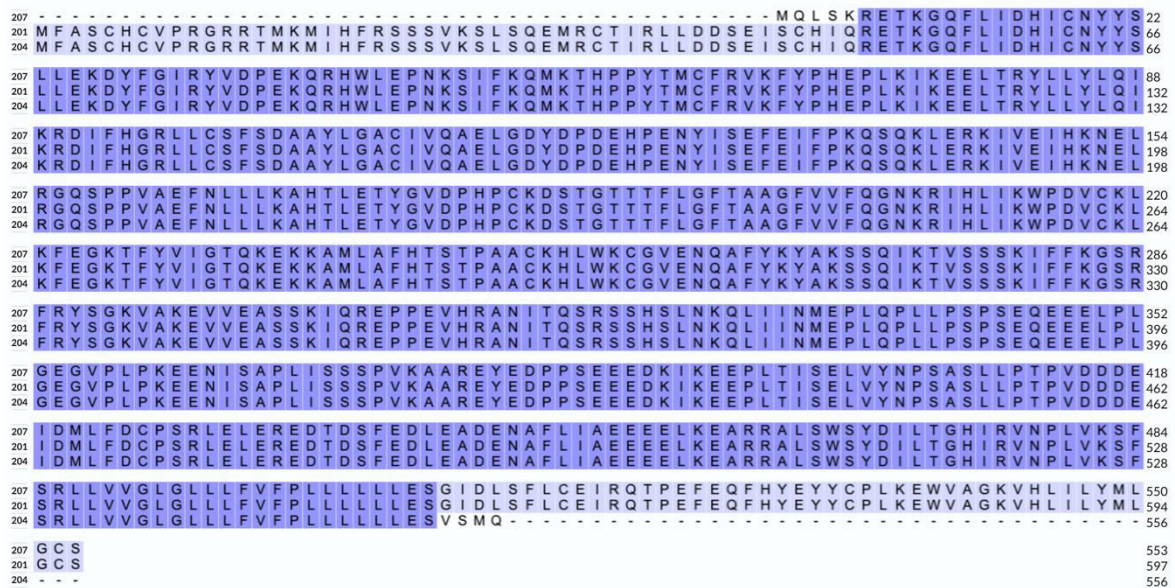


Abbildung 9: Alignment der 3 Transkriptionsvarianten des Protein 4.10 mithilfe Unitprot-Align unter: <https://www.uniprot.org/align>, letzter Zugriff am 01.06.2024.

Zu erkennen ist die hochkonservierte FERM-Domäne mit anschließender SABD-Domäne in dunkelblau und vor und nachgeschaltet in hellblau die unterschiedlichen C- und N-Termini der Transkriptionsvarianten des Protein 4.10.

1.2.4. Funktion

Für Proteine der Bande 4.1 konnte eine essenzielle Bedeutung in der Zellarchitektur durch Teilnahme am Zytoskelett nachgewiesen werden. Erythrozyten haben eine besondere bikonkave Form, welche durch das Zytoskelett aufrechterhalten wird. Hierbei spielt Protein 4.1R eine wichtige Rolle [50]. Auch Podozyten haben mit ihren verzweigten Fußfortsätzen eine komplizierte Form. Hierbei ist die aktinbindende Eigenschaft des Protein 4.1O entscheidend. Das Protein 4.1O fungiert als Ankerprotein, an dem membranständige Proteine, wie zum Beispiel Nephrin, binden und am Aktinskelett fixiert werden können. Die hochkonservierte FERM-Domäne des Proteins ist für die Bindung am zytoplasmatischen Teil von Membranproteinen verantwortlich, während der weiter c-terminal gelegene (SABD-) Anteil F-Aktin binden kann [25, 51, 52]. Die Fähigkeit zur Interaktion mit Aktin ist nicht nur auf das Protein 4.1O beschränkt, sondern erstreckt sich auf nahezu alle Mitglieder der 4.1 Proteinfamilie. Neben der Rolle in der Architektur der Zellen wurden für das Protein 4.1O weitere Funktionen wie die Regulierung des Zellwachstums oder die Funktion als Tumorsuppressorgen beschrieben, die im Weiteren näher dargestellt werden.

1.2.4.1. Die FERM-Domäne

Diese Domäne hat viele Synonyme (N-terminale Domäne, die aminoternale Domäne, die 30-kDa-Domäne, 4.1N30, die ERM-ähnliche Domäne, die membran-zytoskelett-verbindende Domäne, die Ezrin-ähnliche Domäne der Band 4.1-Superfamilie, die konservierte N-terminale Region oder die membrananhängende Domäne [53]) und ist ein Bestandteil vieler Proteine (s. Tab 2). Sie selbst lässt sich in die N-, α - und c- (bzw. F1-, F2-, F3-; bzw. A-, B-, C-) Subdomänen aufteilen, welche sich kugelförmig zu einer Kleeblattstruktur (Abb. 10) zusammensetzen [54, 55]. Dabei weist die N-Subdomäne eine Ubiquitin-ähnliche Faltung auf. Zusammen mit der α -Subdomäne werden beide Domänen auch B41-Domäne bezeichnet.

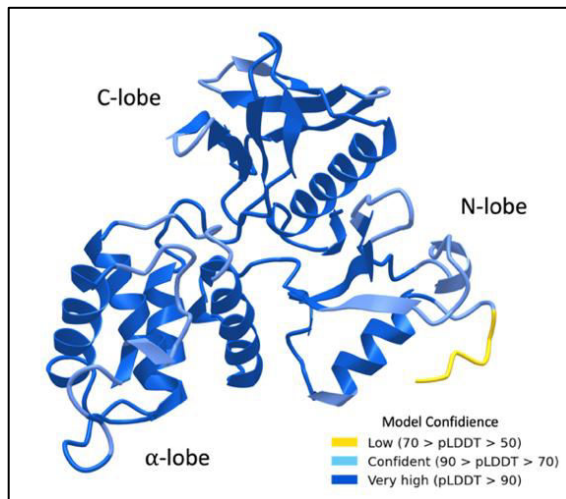


Abbildung 10: FERM-Domäne des Protein 4.10 Variante 207.

Ausschnitt des Protein 4.10 Variante 207 der Sequenz 1-272 (FERM-Domäne) modelliert mit AlphaFold 2 [1]. Man erkennt die Kleeblattstruktur der FERM-Domäne.

Hierdurch erfolgt die Bindung an die zytoplasmatische Regionen von Transmembranproteinen wie z.B. Glycophrin A/C [58, 59], Bande-3-Protein und CD44 [60, 61]. Zudem konnten weitere Bindungspartner dieser Domäne identifiziert gemacht werden. FERM-Domänen sind in der Lage an ATP, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, Phosphatidylserin, Calmodulin und p55 zu binden [62, 63]. Dadurch ist die FERM-Domäne für die PIP2-abhängige Bindung von (F-)ERM-Proteinen an die Zellmembran verantwortlich und bewirkt zur Fähigkeit Proteine wie zum Beispiel Aktinfilamente an die Zellmembran zu verlinken [53, 64].

Die α -Subdomäne besteht vollständig aus α -Helices mit einem Kern, der dem Acyl-CoA-bindenden Protein ähnelt. In ERM-Proteinen befindet sich hier die auto-inhibierende Stelle, welche durch Tyrosinkinasen erst aktiviert werden muss, um die FERM-Domäne in einen funktionell aktiven Zustand zu bringen [56].

Die letzte Subdomäne ähnelt einer PH-Domäne (Pleckstrin-homologe-Domäne). PH-Domänen enthalten eine basische Phospholipid-Bindungstasche und sind daher in der Lage, sowohl an Peptide als auch an Phospholipide zu binden [57].

Gen	Synonym
EPB41	4.1R
EPB41L1	KIAA0338, 4.1N
EPB41L2	4.1-G, 4.1G
EPB41L3	DAL1, KIAA0987, 4.1B
EPB41L4A	NBL4
EPB41L4B	EHM2, LULU2
EPB41L5	KIAA1548, FLJ12957, BE37, YMO1, YRT, LULU, LULU1
EZR	
FARP1	CDEP, PLEKHC2, MGC87400, PPP1R75, GLCC1
FARP2	KIAA0793, FIR, PLEKHC3, FRG

FERMT1	FLJ20116, URP1, KIND1, UNC112A
FERMT2	mig-2, KIND2, UNC112B
FERMT3	URP2, KIND3, MIG2B, MGC10966, UNC112C
FRMD1	FLJ00181, DKFZp434O0117, FLJ40260, FLJ22615, bA164L23.1
FRMD3	EPB41L4O, MGC20553
FRMD4A	FLJ10210, KIAA1294, bA295P9.4
FRMD4B	KIAA1013, GRSP1
FRMD5	MGC14161
FRMD6	MGC17921, willin, EX1
FRMD7	FLJ43346
FRMD8	FLJ90369, FKSG44, iTAP

FRMPD1	KIAA0967, FRMD2	PLEKHH2	KIAA2028, PLEKHH1L
FRMPD2	MGC35285	PLEKHH3	FLJ21019
FRMPD3	RP5-1070B1.1, KIAA1817	PTK2	FAK, FADK, FAK1, PPP1R71
FRMPD4	KIAA0316	PTK2B	CAKB, PYK2, RAFTK, PTK, CADTK
JAK1	JAK1A, JTK3	PTPN3	PTPH1
JAK2	JTK10	PTPN4	PTPMEG
KRIT1	CAM	PTPN13	PTP1E, PTP-BAS, PTPL1, PTP-BL
MSN		PTPN14	PEZ, PTPD2
MYLIP	MIR, IDOL	PTPN21	PTPD1, PTPRL10
MYO7A	NSRD2	RDX	
MYO7B		TLN1	ILWEQ
MYO10	KIAA0799, MyoX	TLN2	KIAA0320, ILWEQ
MYO15A		TYK2	JTK1
MYO15B	MYO15BP		
NF2	merlin, ACN, SCH, BANF, merlin-1		
PLEKHH1	KIAA1200		

Tabelle 2: Humane Gene mit FERM-Domäne

Aufgelistet sind die humanen Gene, welche eine FERM-Domäne besitzen basierend auf den Informationen von HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute unter <https://www.genenames.org/data/genegroup/#!/group/1293>. Die Tabelle soll das Vorkommen der FERM-Domäne veranschaulichen. Zuletzt besucht 01.07.2022

1.2.4.2. Protein 4.1 in Erythrozyten

Eine wichtige Eigenschaft von Erythrozyten ist ihre bikonkave Morphologie, die eine mechanische Belastungsfähigkeit erfordert. Hierbei ist der Aufbau der Zellmembran von relevanter Bedeutung, in dem das Protein 4.1R, Aktin und Spektrin als essenzielle Strukturproteine fungieren [65]. Durch die submembranöse Quervernetzung, getragen durch viele Protein-Protein-Interaktionen, der oben genannten sowie weiterer Proteine (z.B. Adducin, Dematin, Tropomyosin) resultiert ein stützendes Proteingerüst unterhalb der Lipiddoppelschicht für die erforderliche mechanische Stabilität der erythrozytären Zellmembran.

Das Protein 4.1R fungiert in diesem Kontext als *linker*-Protein. Die Gruppe der Proteine 4.1 spielen eine wesentliche Rolle bei der Organisation und Stabilisierung des Spektrin/Aktin-Zytoskeletts sowie bei der Verankerung von integralen Membranproteinen an das Zytoskelett [58, 66, 67]. So bindet auch das Protein 4.1R mit seiner SABD-Domäne an α -/ β -Spektrin-Tetramere und F-Aktin und übt einen fördernden Effekt auf die Aktin-Spektrin-Bindung aus. Zudem bindet es mit seiner FERM-Domäne an Transmembranproteine wie das Bande-3-Protein, einem Anionenaustauscher unter

Beteiligung der Proteine GPC/D, p55 und Bande-3 [65, 68, 69]. Dadurch resultiert der sog. Aktin-junktionale-Komplex und der pseudohexagonale Aufbau der Erythrozytenmembran [65, 68].

1.2.4.3. Protein 4.1O als potenzieller Tumorsuppressor

Das Protein 4.1O wurde initial im Ovarialgewebe entdeckt. Im Gegensatz dazu wurde im Ovarialkarzinom (GI 102) keine Expression gezeigt [36]. Dieser Zusammenhang ließ die Schlussfolgerung einer tumorunterdrückenden Wirkung des Protein 4.1O zu.

Für einige Mitglieder der Proteine mit einer FERM-Domäne (s. Tab 2) konnten bereits tumorsuppressive Effekte belegt werden [70]. Hierzu gehört besonders das Protein Merlin. Es interagiert mit Paxillin, wodurch die Bindung an CD44 vereinfacht wird [71]. Durch diese Interaktion mit CD44 wirkt Merlin wachstumsunterdrückend [72]. Auch die Proteine 4.1B [73, 74] und 4.1R [75] stellten sich in der Entstehung von Meningeomen bzw. Lungenkarzinom als Tumorsuppressoren heraus. Für die beiden 4.1-Proteine konnte ebenfalls eine Interaktion mit CD44 nachgewiesen werden, sodass der tumorsuppressive Effekt auf einem ähnlichen Signalweg funktionieren könnte [61, 70]. Die Tatsache, dass mehrere Mitglieder aus der Protein-4.1-Superfamilie Tumorsuppressorgene sind, lässt die Möglichkeit aufkommen, dass andere Mitglieder ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Zellwachstums spielen könnten [70]. Da auch das jüngste Mitglied der Familie, Protein 4.1O, eine hochkonservierte FERM-Domäne besitzt, ist die Bindung zu CD44 postulierbar.

Neue Untersuchungen konnten zeigen, dass Protein 4.1O durchaus in der Entstehung und Progression von Lungenkarzinomen involviert ist. Beim Vergleich der Expression von FRMD3 im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom mit normalem Lungengewebe konnte eine signifikante Minderung festgestellt werden [76]. Auch im Mammakarzinom konnte FRMD3 als Tumorsuppressor identifiziert werden. Es hemmt Zellproliferation, Migration und Metastasierung und ist in Tumorgewebe signifikant vermindert exprimiert [77].

Diese Befunde stützen die Annahme, dass Protein 4.1O tumorsuppressive Eigenschaften besitzen könnte.

1.2.4.4. Interaktionspartner des Protein 4.1O in der Niere

Ergebnisse der Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass das Protein 4.1O in humanen Podozyten exprimiert wird und verschiedene Interaktionen mit podozytären Proteinen eingeht. Neben der Bindung an F-Aktin und oben genannten Bindungspartner über die FERM-Domäne konnte gezeigt werden, dass eine Bindung des Protein 4.1O zu Nephrin besteht. Die Bindungsstelle des Protein 4.1O für diese Interaktion ist als Aminosäuresequenz 506 – 554 in der Variante 207, also der C-terminalen Domäne, zu lokalisieren [25]. Dadurch werden die Nephrin-Moleküle an dem podozytären Zytoskelett stabilisiert. Protein 4.1O interagiert auch mit Neph1 und mit GLEPP-1 [25]. Die Protein-Protein-Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin ist als Schlüsselfunktion des Protein 4.1O in Podozyten anzunehmen.

Zudem konnten Ohlsson et al. zeigen, dass das Protein 4.1O auch als Regulator in der Nephrin-Signaltransduktion eine Rolle spielt [25]. Unter hyperosmolaren Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Protein 4.1O die Interaktion von Nephrin und dem Adapterprotein Nck2 hemmte. Zudem führt das Protein 4.1O zur verminderten Interaktion von Nephrin mit β -arrestin2, welches zur verminderten Endozytose von Nephrin und damit zur Stabilisierung von Nephrin in der Schlitzmembran führt [25].

1.2.4.5. Verlust des Protein 4.1O-Orthologs im Tiermodell

Die Arbeitsgruppe von Kramer-Zucker hat sich bereits früh mit dem Ortholog des FRDM3-Gens in Zebrafischen beschäftigt, welches als *Mosaic eyes* beschrieben wird. Sie konnten herausarbeiten, dass *Mosaic eyes* besonders in pronephrotischen Podozyten exprimiert werden und essenziell in der Ausbildung der glomerulären Schlitzmembran sind. In Zebrafischen ohne *Mosaic eyes* – Allel kam es zur fehlenden glomerulären Schlitzmembran mit konsekutiver Proteinurie [78]. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Prof. M. Schiffer (Erlangen) ergaben, dass der *Knockdown* des frmd3-Orthologs im Zebrafisch ein nephrotisches Syndrom zur Folge hat. Durch die Reexpression des humanen Protein 4.1O (C-terminal) konnte dieser Phänotyp teilweise kompensiert werden [79].

1.3. Die Palmitoylierung

In dieser Arbeit wird auch der Einfluss der Palmitoylierung auf die Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin untersucht. Sie ist eine reversible posttranslationale Modifikation, die eine wichtige Rolle bei der Regulierung zellulärer Prozesse spielt. Bei der S-Palmitoylierung wird die gesättigte Palmitinsäure, kovalent über eine Thioesterbindung an spezifische Cysteinreste von Proteinen gebunden. Dieser Prozess wird durch Palmitoyl-Acyltransferasen katalysiert und kann durch Palmitoyl-Protein-Thioesterasen umgekehrt werden.

Die Palmitoylierung beeinflusst verschiedene Aspekte der Proteinfunktion, einschließlich ihrer subzellulären Lokalisation, Protein-Protein-Interaktionen und Signaltransduktion. Ein Beispiel ist die Rolle der Palmitoylierung bei der Membranassoziation von Proteinen. Durch die kovalente Anbindung von Palmitinsäure werden Proteine hydrophober und können somit in Lipidmembranen verankert werden. Dies ist beispielsweise für G-Proteine relevant, da ihre Lokalisation in *lipid rafts* für ihre Funktion in der Signalübertragung entscheidend ist [80]. Darüber hinaus kann die Palmitoylierung auch Protein-Protein-Interaktionen modulieren. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Palmitoylierung von AMPA-Rezeptoren die Interaktion mit dem Zytoskelettprotein 4.1N hemmt. Dies führt zu einer Destabilisierung der Rezeptorverankerung am Aktin-Zytoskelett und Internalisierung des Rezeptors [81].

Außerdem ist die Palmitoylierung auch in der Steuerung von Transportvorgängen, wie z.B. den Zeitpunkt der Endozytose, beteiligt. Der humane Transferrin-Rezeptor wird ligandenabhängig Clathrin-vermittelt endozytiert. Der Rezeptor kann an zwei benachbarten Cysteinen palmitoyliert werden mit dem Effekt einer Erhöhung der Verweildauer innerhalb der Membran [82, 83]. Auch für das Protein Anthrax-Toxin-Rezeptor 1 ist eine verkürzte Verweildauer in der Zellmembran unter Palmitoylierungsdefizienz zu beobachten [84].

2. Ziele der Arbeit

Das für das Protein 4.1O kodierende Gen FRMD3 wurde als Kandidatengen für die Entwicklung der diabetischen Nephropathie identifiziert [40, 42]. Frühere Arbeiten, insbesondere von Ohlsson et al., belegen die Expression von FRMD3 in HEK293T-Zellen und Podozyten sowie eine Interaktion mit dem Schlitzmembranprotein Nephrin [25]. Weitere Untersuchungen zeigten darüber hinaus, dass der *Knockdown* des frmd3-Orthologs im Zebrafisch zu einem nephrotischen Syndrom führt, welches durch Reexpression des humanen Protein 4.1O teilweise kompensiert werden konnte [79]. Diese Ergebnisse unterstreichen die funktionelle Relevanz von Protein 4.1O im glomerulären Kontext.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin, insbesondere im Hinblick auf seine verschiedenen Splicevarianten, funktionell zu charakterisieren. Dadurch sollen neue Erkenntnisse zur molekularen Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie gewonnen und potenzielle Ansatzpunkte für therapeutische Interventionen identifiziert werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Interagieren die Transkriptionsvarianten 201 und 204 des Protein 4.1O ebenfalls mit Nephrin und wie stark ist die Bindung im Vergleich zur Variante 207?
2. Welchen Einfluss hat die Palmitoylierung des Protein 4.1O (Variante 207) auf die Interaktion mit Nephrin?
3. Ist die coiled-coil-Domäne des Protein 4.1O (Variante 207) an der Interaktion mit Nephrin beteiligt?

3. Material & Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Abzug ENAS 1500
Brutschränke

Bunsenbrenner
Elektrophoresekammer
Imager und Kamera

IP-Shaker

Küvetten UVette
Mikroreagenzgefäße

Mikroskop
Mikrowelle
Nitrozellulosemembran
pH-Messgerät
Photometer
Pipettenset
Pipettenspitzen

Pipettierhilfe
Rührboden
Schüttler
Spannungsquellen

Sterilbänke

Tankblot
Thermocycler
Thermomixer

Wesemann Laboreinrichtungen
Memmert Modell 200
Thermo Scientific Heraeus B12
Thermo Scientific Heraeus KS18
INTEGRA Biosciences AG FIREBOY
BIO-RAD Mini-PROTEAN Tetra Cell
Alpha Innotech FluorChem FC2
Sigma 28mm 1:1,8
Thermo Scientific LABQUAKE
SHAKER ROTISSERIE
Eppendorf
Eppendorf Safe-Lock 0,5ml
Eppendorf Safe-Lock 1,5ml
Eppendorf Safe-Lock 2ml
Eppendorf TUBES 5ml
ZEISS Axiovert 40 CFL
Panasonic NN-E202CB
Amersham Protran 0,45µm NC
Knick ph-Meter 766 Calimatic
Eppendorf Biophotometer
Eppendorf Research
10/20µl XL Graduated Filter Tip
STARLAB
20µl Filterspitzen SARSTEDT
100µl Biosphere Filter Tip SARSTEDT
200µl Biosphere Filter Tip SARSTEDT
Eppendorf Easypet
IKA-COMBIMAG RCH
INFORS HT Multitron
Pharmacia Biotech Electrophoresis
Power Supply EPS 300
Heraeus INSTRUMENTS Herasafe
HS12
BIO-RAD PowerPac Universal
Biometra Personal Cycler
Eppendorf Thermomixer comfort 5355
37485

Ultrazentrifuge	BECKMAN COULTER Optima MAX-XP Ultracentrifuge, Rotor: BECKMAN TLA-55
Vakuumpumpe	Vacuubrand CVC 3000
Vortexer	Heideldolph REAX control
Waagen	BIZERBA Max 310g Sartorius research Feinwaage
Wärmebad	P SELECTA PRECISDIG
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5910R V1.5 Eppendorf Centrifuge 5417R
Zentrifugenbehälter	Sorvall Heraeus 75006443

3.1.2. Chemikalien

100 bp-Marker #N3231L	500 µl/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
2-Propranol AnalaR NORMAPUR	100,0 %	VWR Chemicals
Agarose low melting temprature		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose NEEO Ultra-Qualität		Carl Roth GmbH, Darmstadt
Ampicillin Na-salt		SERVA 090319
APS	10 %	Biomol GmbH 1393
Bromphenolblau		E. Merck, Darmstadt
BSA Protease Free - lyophilized		H2B 1005-70
CaCl ₂	>93 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
cOmplete Mini Protease inhibitor	Cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH Version 11
D-Mannitol 1374F		ICN Biomedicals Inc.,
Dithiothreitol (DDT)	99%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA Ttriplex III	>99 %	Merck KGaA, Darmstadt
Essigsäure	100 %	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Ethanol AnalaR NORMAPUR	99,8 %	VWR Chemicals
Ethylumbromid HP47.1	250 µl/ml	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Glycerin Rotipuran	>99,5 %	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Glycin	>99 %	Carl Roth GmbH, Darmstadt
H ₂ O ₂	30 %	MERCK-Schuchardt
Hepes	>99 %	Merck KGaA, Darmstadt
HPLC Wasser HiPerSolv CHROMANORM		VWR Chemicals
KCl	99,5 %	Merck KGaA, Darmstadt
KH ₂ PO ₄		Mallinckrodt Baker B.V. Deventer

Laemmli	2x Konzentrat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Lambda-Marker #N3014L	500 µl/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
LB BROTH BASE		Invitrogen 00101131
LB Broth with agar (Lennox)		Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Luminol 09253	250 mM / 200 µl	Fluka BioChemika
Methanol AnalaR NORMAPUR	100%	VWR Chemicals
Na ₂ HPO ₄		E. Merck, Darmstadt
NaCl		Merck KGaA, Darmstadt
NaVO ₄	99,98 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Orange G		CERCISTAIN
p-Coumaric acid C9008-10G	90 mM / 90 µl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PMSF #P7626	10 mg/ml	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Protein G-Sepharose Beads	50:50	GammaBind Plus Sepharose
Protein-Marker		New England Biolabs GmbH, Frankfurt #P7712S bis 2020 #P7719L ab 2020
Rotiphorese Gel 30	37,5:1	Carl Roth GmbH, Darmstadt
SDS	pur	Biomol GmbH 1866
TEMED		Carl Roth GmbH
Tetracyclin hydrochloride 31K1763	95 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS PUFFERAN		Carl Roth GmbH
Triton X-100 #SLCF6075	> 99,9 %	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20 Polysorbate		Merck KGaA, Darmstadt

3.1.3. Puffer

2x Laemmli + DDT	100 mM Tris pH 6,8
Proteinpuffer	20 % Glycerin
	1M NaCO ₃
	4 % SDS
	0,2 % Bromphenolbau
	10 mM DDT
2x Lysispuffer	40 mM Tris HCl pH 7,5
0,5L	300 mM KCl
	2 mM EDTA
BSA	5 % BSA in Proteinwaschpuffer
IP-Lysispuffer 50 ml	1x Lysispuffer

	1 % Triton TX-100
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1 Tablette Proteaseinhibitor (cOmplete Mini)
	0,044 mM PMSF
	19,5 ml Aqua dest.
Laufpuffer	191,8 mM Glycin
1L	23,93 mM Tris Base
	3,46 mM SDS
PBS	136,89 mM NaCl
1L	4,28 mM Na ₂ HPO ₄
	2,6 mM KCl
	1,46 mM KH ₂ PO ₄
Proteinwaschpuffer	340 ml 5M NaCl
1L	170 ml 1M Tris HCl
	17 ml Tween 20
Sammelgelpuffer pH 6,9	484 mM Tris HCl
	16 mM Tris Base
	14 mM SDS
TAE-Puffer pH 8,0	10 mM EDTA pH 8,0
	0,8 mM Tris Base
	0,4 mM Essigsäure
Transferpuffer	383,6 mM Glycin
2L	49,52 mM Tris Base
	20 % Methanol
Trenngelpuffer pH 8,8	1,14 M Tris Base
	360 mM Tris HCl
	14 mM SDS

3.1.4. Polyacrylamidgele

SDS-Sammelgel	648,4 µM Rotiphorese
	6,8 mM SDS
	238,4 mM Tris-HCl
	7,9 mM Tris Base
	10,27 µM APS
	9,88 µM TEMED
SDS-Trenngel, 10 %	1,4 mM Rotiphorese
	7 mM SDS
	180 mM Tris-HCl
	570 mM Tris Base
	8,7 µM APS
	11,1 µM TEMED

3.1.5. ECL

Luminol-Lösung A	100 mM Tris Base, pH 8,5 396 µM Cumarsäure
Luminol-Lösung B	2,5 mM Luminol 100 mM Tris Base, pH 8,5 5,8 mM H ₂ O ₂

3.1.6. Antikörper

Anti-human IgG + HRP	Maus	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-M2	Maus	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Maus + HRP	Ziege	Dako Agilent Technologies, Glostrup
Anti-V5	Maus	Thermo Fischer Scientific, Waltham

3.1.7. Restriktionsenzyme & Puffer

HIND III R0104S	20000 U/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Mlu I R0198L	10000 U/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Not I R0189L	10000 U/ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Puffer 2.1 B7202S	10x konzentriert	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Puffer 3.1 B7203S	10x konzentriert	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

3.1.8. Kits

Qiagen Maxi-Prep	QIAGEN GmbH, Hilden
Qiagen Mini-Prep	QIAGEN GmbH, Hilden
Qiagen RT-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

3.1.9. Plasmide

cdm.F.4.1O 201
 cdm.F.4.1O 204
 cdm.F.4.1O 207
 cdm.F.4.1O cc_del
 cdm.sIg
 cdm.sIg.Nephrin.cyt
 pcDNA3.V5.4.1O
 pcDNA3.V5.4.1O C516A
 pcDNA3.V5.4.1O C516S
 pcDNA3.V5.4.1O C533A
 pcDNA3.V5.4.1O C533S
 pcDNA3.V5.4.1O C552A
 pcDNA3.V5.4.1O C552S

Prof. G. Walz, Freiburg
 Prof. G. Walz, Freiburg

3.1.10. Zellkultur

0,25 M CaCl ₂		
2x Hepes buffered saline (HEBS)	280,62 mM NaCl 49,83 mM Hepes 1,47 mM Na ₂ HPO ₄	
Corning Zellkulturschalen 100mm x 200 mm	Treated Nonpyrogenic Polystyrene 20/Sleeve	Corning
Dulbecco's MEM w/o Calcium w/o Magnesium	3,7 g/L NaHCO ₃ 4,5 g/L D-Glucose Stabiles Glutamin Na-Pyruvat Sehr wenig Endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin PAN BIOTECH, Aidenbach
Dulbeccos's PBS w/o Calcium w/o Magnesium	200 mg/L KCl 200 mg/L KH ₂ PO ₄ 8000 mg/L NaCl 1150 Na ₂ HPO ₄	Biochrom GmbH, Berlin PAN BIOTECH, Aidenbach
Fetal bovine serum (FBS)		Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin/EDTA	0,05 % / 0,02 % in PBS	Biochrom GmbH, Berlin
w/o Calcium w/o Magnesium		

3.1.11. Software

Software	Anbieter	Funktion
Alphafold2: ColabFold v1.5.5	EMBL-EBI, Wellcome Genome Campus	Strukturberechnung und Modellierung von Proteinen
PCOILS, Version 1.0.1.	MPI Bioinformatics Toolkit	Voraussage einer coiled-coil- Domäne in Proteinen

GraphPad PRISM 10, 10.2.3. Cell BioSciences, Inc. AlphaView 3.3.1.0 CSS-Palm 3.0, Version 20110318	GraphPad Software, Inc alfaview gmbh GPS	Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse Bilderstellung der Blots Voraussage der Palmitoylierung in Proteinen
---	--	---

3.2. Methoden

3.2.1. Zellkultur

Die Versuche wurden an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293T) durchgeführt. Sie inkubieren im DMEM-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) bei 37 °C, 5 % CO₂. Die Passagierung erfolgt alle 48 Stunden. Hierzu werden die Zellen unter dem Mikroskop hinsichtlich ihrer Dichte begutachtet und je nach Zelldichte ein Splitverhältnis in der Regel zwischen 1:6 und 1:8 gewählt.

Erst wird das Medium abgesaugt, dann mit PBS-Puffer gespült. Durch das Spülen wird die Trypsinierung ermöglicht, da sonst das FCS im Medium diesen Vorgang durch Hemmung des Trypsins stört. Durch die Zugabe von 1ml Trypsin/EDTA und einer Inkubationszeit von 5 Min. bei 37 °C lösen sich die adhärenenten Zellen vom Boden der Zellschale und voneinander ab. Anschließend verdünnt man die Zellsuspension mit Zellmedium und überführt das gewünschte Volumen in die neuen Zellkulturschalen.

Die Aussat für die ausgeführten Versuche erfolgt nach demselben Prinzip. Für alle Versuche gilt, dass 2 Zellschalen (10 cm im Durchmesser) pro Datenpunkt verwendet wurden, um eine ausreichende Proteinmenge zu gewährleisten.

3.2.2. Transfektion

Die am Vortag ausgesäten Zellen werden nach etwa 12 - 14 Stunden transient gentechnisch verändert, indem man die cDNA in Form eines Plasmids des gewünschten Proteins einschleust. Hierzu wurde die Calcium-Phosphat-Methode verwendet [85]. Dabei wird die Plasmid-DNA in 500µl Calciumchlorid-Lösung gelöst. Bei der Co-Immunpräzipitation werden zwei unterschiedliche Plasmide transfiziert. Unter kontinuierlichem Vortexen wird dasselbe Volumen einer 2xHEPES-Lösung, pH 7,07 hinzugefügt. Dadurch entstehen Calcium-Phosphat-Kristalle, die als Träger für die Plasmide dienen. Die entstandene Suspension wird gleichmäßig auf die Oberfläche der Zellen verteilt. Die ausgefallenen Kristalle werden von den HEK-Zellen mitsamt Plasmid endozytiert, so dass die gewünschten Proteine exprimiert werden können.

3.2.3. Zellernte

Die Zellernte erfolgt am Folgetag der Transfektion (maximal 24 Stunden nach Transfektion). Da die HEK-293T-Zellen als semi-adhärenz gelten, ist eine mechanische Ablösung ausreichend. Dies geschieht, indem man das Zellmedium absaugt und unter visueller Begutachtung die Zellen mit kaltem PBS vom Schalenboden mit einer Pasteur-Pipette auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension kann somit für Experimente weiterverarbeitet werden.

3.2.4. Co-Immunpräzipitation

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu untersuchen, wurde bei dieser Fragestellung die Co-Immunpräzipitation genutzt. Hierzu wird die Zellsuspension aus der Zellernte bei 956 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und mit dem 1 %-Triton-Lysispuffer resuspendiert. Das Volumen des Lysispuffers hängt von der Pelletgröße der Zellen ab und schwankt bei zwei Zellschalen zwischen 200 µl und 400 µl. Es folgt eine Inkubation von 15 bis 30 min auf Eis zur vollständigen Lyse der Zellen. Um Proteine vom Zelldetritus zu trennen, wird die Mischung im Mikoreagenzgefäß bei 20817 g, 15 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Den Überstand überführt man in ein neues 1,5 ml Reagenzgefäß. Um weitere unspezifische Bindungen zu minimieren, wird eine Ultrazentrifugation bei 100000 g bei 4 °C für 30 min durchgeführt. Wieder wird mit dem Überstand weitergearbeitet, 10 % des Lysats werden äquivalenter Menge 2x Laemmli + DDT versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. 90 % der Lysatmenge werden für die Immunpräzipitation benötigt.

Der Lysatprobe für die IP werden 30 µl Protein-G-Sepharose hinzugefügt, welche an die sIg-Sequenz (s. Kapitel 3.1.9). Diese Mischung zwischen Proteinlösung und Beads inkubiert 1 h lang bei 4 °C auf einem Rotationschüttler. In dieser Zeit binden die sIg-Moleküle an den Beads.

Es folgt 3-maliges Waschen, indem die IP-Proben bei 956 g bei 4 °C zentrifugiert werden, der Überstand absaugt und erneut mit 800 µl IP-Waschpuffer resuspendiert wird. Unspezifische Bindungen werden durch diese Waschschrirte gelöst. Nach dem letzten Waschvorgang wird das Pellet schließlich mit 30 µl 2x Laemmli + DDT versetzt und bei 95 °C für 5 min gekocht. Hierbei trennen sich die Proteine von den Beads und können

durch Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur mittels Gelelektrophorese nach der Größe aufgetrennt werden. Vor dem Laden in die Geltaschen muss diese Lösung bei 17949 rpm bei 4 °C zentrifugiert werden, um die Beads zu trennen.

3.2.5. SDS-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese [86] angewendet. Hierzu wurden die 0,75 mm dicken, 10 %-igen SDS-Gele nach dem obigen Protokoll (erst das Trenngel, dann das Sammelgel) gegossen. Nachdem diese auspolymerisiert waren, wurden sie in die Elektrophoresekammern eingespannt, die mit Laufpuffer befüllt wurde. Vom Proteinmarker wurden 10 µl entnommen, während von den Proben 15µl geladen wurde. Pro Kammer sind 2 Gele eingespannt. Erst wurde eine konstante Spannung von 70 V für 30min eingestellt, wodurch die Proben durch das Sammelgel bewegt werden. In der zweiten Phase zur Proteinauftrennung wurde eine konstante Stromstärke von 40 mA für 90 min angelegt. In diesem elektrischen Spannungsfeld liefen die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe nach ihrer molekularen Masse durch das Trenngel. Da die entstehenden Komplexe ihre Gesamtladung hauptsächlich durch die hohe Anzahl des SDS erhielten, hing die Laufgeschwindigkeit der Proteine lediglich von ihrer Masse ab.

3.2.6. Western-Blot

Um die Proteine aus dem Gel auf eine Membran zu überführen, ist nach der Tankblot-Methode verfahren worden [87]. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele vorsichtig aus der Apparatur entnommen und umgehend in Transferpuffer mit 20% Methanol überführt.

Die Blotvorrichtung, bestehend aus Blotting-Schwamm, Filterpapier, Nitrozellulosemembran und dem SDS-Gel (ohne das Sammelgel), wird zwischenzeitlich aufgebaut und unter Berücksichtigung der angeschlossenen Polarität innerhalb der Kammer in die Kassetten der Blotkammer eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur während des Transfers wurde ein Eisblock in die Kammer gegeben. Die Kammer wurde vollständig mit dem 20 % methanolhaltigen Transferpuffer

befüllt und das Blotting gestartet. Die Stromstärke wurde auf konstante 200 mA eingestellt und der Transfer für eine Dauer von 90 min durchgeführt.

3.2.7. Immunologischer Nachweis

Nach dem Blotting wurde die Membran in 5 % Bovinem Serum Albumin (BSA) in Protein-Waschpuffer über Nacht bei 4 °C oder für eine Stunde bei 37 °C eingelegt. Damit wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt und unspezifische Bindungen blockiert. Nun folgte die Bindung mit dem Antikörper gegen den *tag* des Proteins. Hierzu wurde der gewählte Antikörper in den oben beschriebenen Konzentrationen in Protein-Waschpuffer verdünnt und die Membran darin eingelegt. Für eine Stunde auf dem Horizontalschüttler bei 50 Bewegungen pro Minute inkubierte die Membran in diesem Antikörper. Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran einer Waschprozedur unterzogen, um unspezifisch gebundene Antikörpermoleküle zu entfernen. Hierzu wurde die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in Protein-Waschpuffer gewaschen, wobei eine Schüttelfrequenz von 60 Bewegungen pro Minute verwendet wurde. Dann wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper, der wiederum an den primären bindet, für eine Stunde bei 50 Bewegungen pro Minute inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran erneut nach demselben Prinzip gewaschen und kann für die Entwicklung benutzt werden. Die Entwicklung der Bilder wurde mit selbst hergestelltem ECL mit *horseradish peroxidase* (HRP) durchgeführt. Das ECL reagiert mit der Meerrettich-Peroxidase und sendet ein chemisches Signal, das im speziellen Entwickler mit einer Kamera (Blende vollständig geöffnet) detektiert wurde. Das Bild wurde im .tif Format gespeichert und densitometrisch mit der Software AlphaView analysiert. Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit Graphpad Prism.

3.2.8. Transformation

Damit ausreichend Plasmide für die Experimente zur Verfügung stehen, müssen diese regelmäßig amplifiziert werden. Dafür werden die zu vervielfältigenden Plasmide in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien transformiert. Für Plasmide mit einer Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenz werden die Stämme MC1061 P3 und für Plasmide mit lediglich der Ampicillinresistenzkassette den Stamm der MC1061 verwendet. Diese

kompetenten Zellen können frei vorliegende DNA via Endozytose aufnehmen. So wurde zu 100 ng des Plasmids 50 µl Bakteriensuspension in einem Mikroreagenzgefäß hinzugegeben und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 37 °C in einem Thermoblock und eine kurze Phase wieder auf Eis. Dann wurden die Proben auf eine Agarplatte mit der zugehörigen Resistenz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C aufbewahrt.

Bevor mit der Präparation der DNA begonnen werden kann, müssen die Bakterien stark vervielfältigt werden. Hierzu wurde eine solitäre Kolonie auf der Agarplatte gepickt und 3ml LB-Medium mit zugehörigem Antibiotikum (100 mg/ml Ampicillin bzw. 25 mg/ml Ampicillin und 7,5 mg/ml Tetrazyklin) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen beimpft. Diese Minikultur wird 8 - 12 Stunden lang bei 37 °C mit locker aufgedrehtem Deckel geschüttelt. Von der erfolgreich vermehrten Minikultur entnimmt man dann 200 µl und beimpft 200 ml desselben LB-Mediums mit Antibiotikum (Konzentrationen werden beibehalten) und lässt die Mischung über Nacht bei 37 °C bei 220 rpm Schütteln. Die amplifizierte Bakterienkultur stand anschließend der Plasmid-DNA Isolierung zur Verfügung.

3.2.9. DNA-Isolierung und Aufreinigung

Um die Plasmid-DNA aus den Bakterien zu gewinnen, wurde das DNA-Präparations-Kit von Qiagen benutzt [88]. Die vom Hersteller zur Verfügung gestellte Anleitung wurde eingehalten. Methodisch handelt es sich um die Lyse der Bakterien mit den beiliegenden Puffern, die Isolierung der DNA mithilfe von DNA-Säulen und die Fällung mit Isopropanol [89].

Das resultierende DNA-Pellet wurde nach Trocknung mit 200 µl HPLC-Wasser aufgelöst. Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten Plasmid-DNA wurden die Proben einer photometrischen Messung unterzogen.

3.2.10. Restriktionsenzymverdau

Der enzymatische Verdau der hergestellten Plasmide dient als Kontrollinstrument zur Verifikation der Übereinstimmung zwischen Ausgangsplasmid und Produkt.

Für den Verdau selbst wurde 1,25 µg des Plasmids in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und

mit den Enzymen (Mlu I, Not I oder HIND III) und dem jeweils effizientesten Puffer gemischt worden. Das Endvolumen von 20 µl wird durch Ergänzung von HPLC-Wasser erreicht.

Werden zwei Enzyme mit demselben Puffer gemischt, dann darf diese Mischung bei 37 °C für eine Stunde inkubieren. Hat man 2 unterschiedliche Puffer, erfolgt der Verdau in zwei getrennten Schritten. Es wird das erste Enzym mit jeweiligem Puffer hinzugegeben und eine Stunde bei 37 °C verdaut und anschließend das zweite Enzym mit dem anderen Puffer hinzugegeben und wieder eine Stunde bei 37 °C verdaut.

3.2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese findet die Auftrennung der DNA-Fragmentgrößen statt. Für das DNA-Gel wird 1 % - 1,5 % Polysaccharid Agarose abgewogen und in TAE-Puffer aufgelöst. Da die vollständige Auflösung Energie benötigt, wurde die Lösung in einer Mikrowelle erhitzt, bis sie kochte und eine homogene Masse entstand. Dem kochenden Gel wurden 4 Tropfen pro 100 ml Gel des Ethyliumbromids hinzugegeben. Ethyliumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und ermöglicht die Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht. Das heiße Gel wurde in eine Vorrichtung gegossen und polymerisierte in etwa 30 min bei Raumtemperatur aus. Die Proben wurden in die vorgesehenen Aussparungen beladen.

Von dem Lambda-Marker und den Proben wurde 10 µl beladen, während dem 100 bp-Marker 7 µl entnommen wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 90 - 95 V für eine Dauer von 35 - 40 min durchgeführt. Die Entwicklung erfolgte mit derselben Kamera (Blende bei 5,6) und demselben Programm wie bei der SDS-Gelelektrophorese.

4. Ergebnisse

4.1. Interaktion von 4.1O Splicevarianten mit Nephrin

Die Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion zwischen den Splicevarianten des Protein 4.1O und dem zytosolischen Anteil des Nephrins wurde mittels einer Co-Immunpräzipitation durchgeführt.

In den Blots in Abbildung 11a ist eine deutliche Interaktion zwischen den untersuchten drei Transkriptionsvarianten des Protein 4.1O 201, 204 und 207 mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin zu erkennen, wohingegen die Kontrollen (sIg) nicht interagieren. Die densitometrische Auswertung der Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin sind für alle drei Transkriptionsvarianten signifikant (s. Abb. 11b). Hier wird erstmals der Beweis für die Protein-Protein-Interaktion von den Varianten 201 und 204 des Protein 4.1O mit Nephrin nachgewiesen.

Verglichen mit der Variante 207 liegt bei der Interaktion zwischen 201 und Nephrin eine nicht signifikante Verminderung der Interaktionsstärke um 28,5 % vor. Bei der Variante 204 besteht eine um 23 % stärkere Interaktion als es bei 207 der Fall ist, ebenfalls statistisch nicht signifikant.

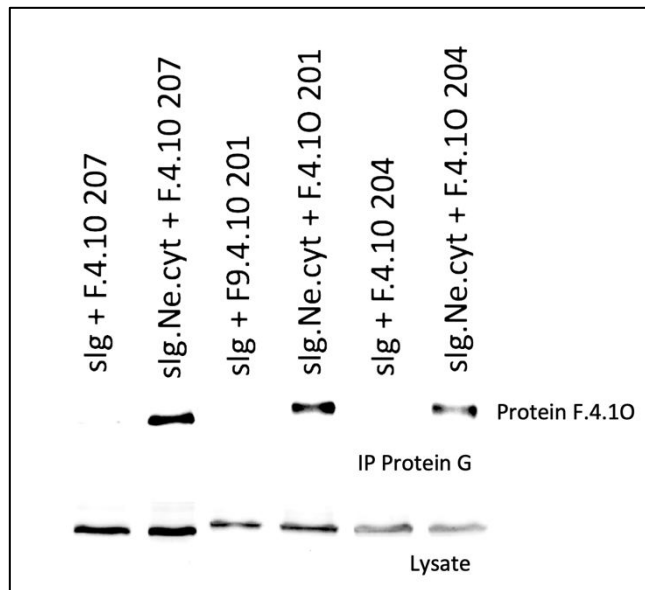


Abbildung 11a: Protein 4.10 201, 204 und 207 interagieren mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin.

Z.n. HEK293T exprimierten Transkriptionsvarianten 201, 204 und 207 des Protein 4.10 mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin. Durch Co-Immunpräzipitation mit Protein G wurde die Interaktion aller Transkriptionsvarianten des Protein 4.10 mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein primärer Antikörper gegen das Flag-Epitop in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Als Kontrolle diente slg. Die Lysate belegen die Expression des Flag-markierten Protein 4.10 in allen Proben.

Z.n.: Zustand nach; slg: surface immunglobine; F: Flag; Ne.cyt: zytolsolischer Anteil des Nephrins

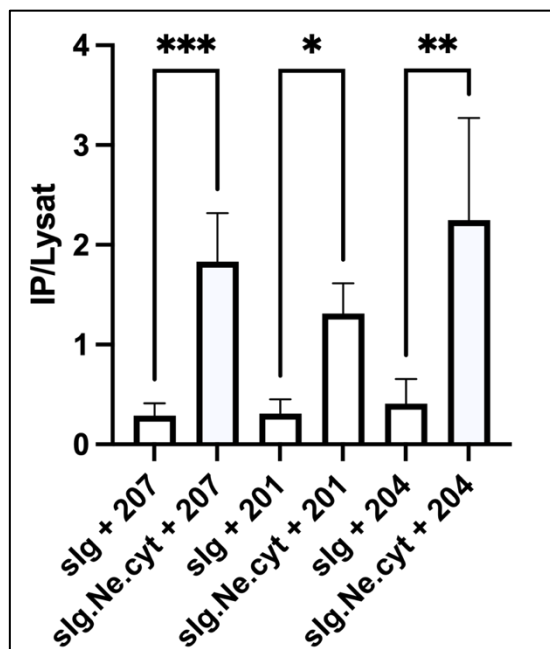


Abbildung 11b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.

Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt sich bei $n=8$ eine signifikante Interaktion von zytosolischem Nephrin gegenüber Protein 4.10 der Variante 207 ($p=0,0005$), der Variante 201 ($p=0,0390$) und der Variante 204 ($p=0,001$). Die relativ zur Variante 207 schwächere Interaktion der Variante 201 sowie die stärkere Interaktion von Variante 204 gegenüber dem Nephrin ist nicht signifikant ($p>0,99$).

IP: Immunpräzipitation; slg: surface immunglobine; Ne.cyt: zytolsolischer Anteil des Nephrins

4.2. Interaktion von 4.1O Punktmutanten mit Nephrin

Zur Untersuchung der Rolle der Palmitoylierung des Protein 4.1O wurden Co-Immunpräzipitationen mit Punktmutanten des Protein 4.1O der Variante 207 und dem zytosolischen Abschnitt des Nephrins nach der Methode in Kapitel 3.2.4 durchgeführt worden. Mittels prädiktiver Algorithmen konnten die Cysteine C516, C533 und C552 als wahrscheinliche Palmitoylierungsziele für die Palmitinsäure-Transferasen ausfindig gemacht werden. Durch DNA-Modifikation wurden zwei Punktmutanten für jede der o.g. Cysteine erstellt. Dabei wurde Cystein in Alanin und Serin mutiert. Die Mutation des Cysteins in eine Alanin-Aminosäure (C516A, C533A, C552A) entfernt lediglich die Thiolgruppe in der Seitenkette, sodass die Palmitoylierung durch Palmitinsäure-Transferasen nicht erfolgen kann. Die Mutationsvarianten mit Serin (C516S, C533S, C552S) hat statt einer Thiolgruppe eine funktionelle Alkoholgruppe in der Seitenkette. Durch den resultierenden Verlust der Palmitoylierung soll der Einfluss dieser posttranslationalen Modifikation in der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin untersucht werden.

4.2.1. Protein 4.1O C516A/S

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12a dargestellt. Die Punktmutanten C516A und C516S des Protein 4.1O interagieren signifikant mit zytosolischem Nephrin. Die densitometrische Auswertung ist in Abbildung 12b dargestellt ($n = 4$, $p = 0,0286$, Abb. 12b). Beide Punktmutanten zeigen eine ähnliche Intensität in der Interaktion zum Nephrin verglichen mit der Wildtypvariante des Protein 4.1O Transkriptionsvariante 207 (für C516A: Anstieg der densitometrisch ermittelten Signalintensität um etwa 0,81 %, $p > 0,999$; für C516S: Verringerung um etwa 4,47 %, $p=0,657$).

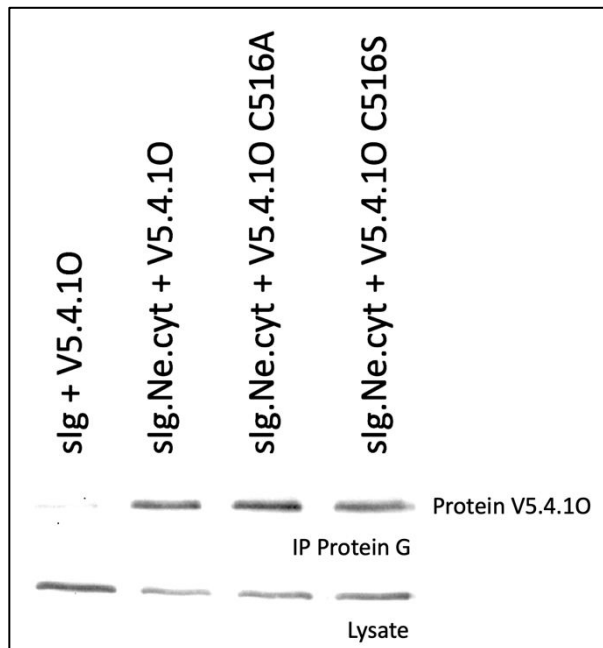


Abbildung 12a: Die Punktmutanten C516A und C516S des Protein 4.10 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.

Z.n. HEK293T exprimierten Punktmutanten des Protein 4.10 (Variante 207) C516A und C516S mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin. Durch Co-Immunpräzipitation mit Protein G wurde die Interaktion beider Punktmutanten des Protein 4.10 mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein primärer Antikörper gegen das V5-Epitop in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Kontrolle diente slg. Die Lysate belegen die Expression des V5-markierten Protein 4.10 in allen Proben.

IP: Immunpräzipitation; slg: surface immunglobine;
Ne.cyt: zytosolischer Anteil des Nephrins

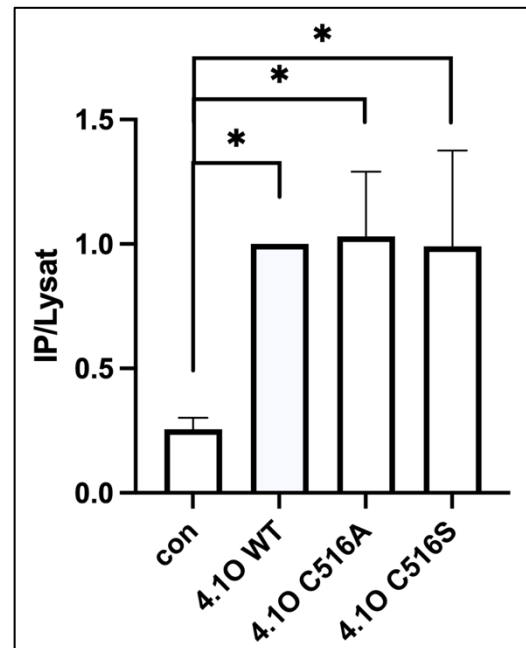


Abbildung 12b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.

Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt sich bei $n=4$ eine signifikante Interaktion von zytosolischem Nephrin gegenüber Protein 4.10 der Variante C516A ($p=0,0286$) und der Variante C516S ($p=0,0286$). Die relativ zum Wildtyp schwächere Interaktion beider Varianten gegenüber dem Nephrin ist nicht signifikant ($p=0,69$ bzw. $p>0,99$). Die Messwerte sind normiert auf die Wildtyp-Interaktion.

IP: Immunpräzipitation; con: Kontrolle; WT: Wildtyp

4.2.2. Protein 4.10 C533A/S

Die Ergebnisse in Abbildung 13a belegen eine erhaltene Interaktion der Punktmutanten C533A und C533S des Protein 4.10 mit dem zytosolischen Abschnitt des Nephrins. Die Ergebnisse sind statistisch signifikant ($n = 5$, $p = 0,0079$, s. Abb. 13b). Beide Punktmutanten zeigen eine ähnliche Intensität in der Interaktion zum Nephrin verglichen mit der Wildtypvariante des Protein 4.10 Transkriptionsvariante 207 (für C533A: Anstieg der densitometrisch ermittelten Signalintensität um etwa 7,8 %, $p = 0,395$; für C533S: Verringerung um etwa 13,45 %, $p = 0,395$).

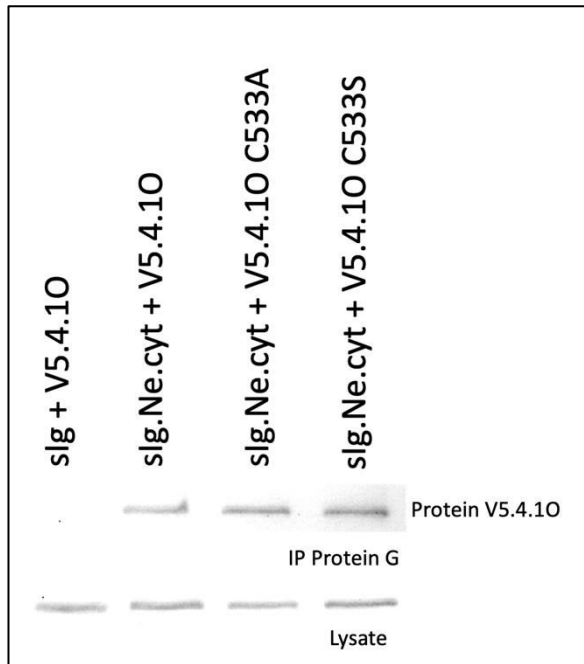


Abbildung 13a: Die Punktmutanten C533A und C533S des Protein 4.10 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.

Z.n. HEK293T exprimierten Punktmutanten des Protein 4.10 (Variante 207) C533A und C533S mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin. Durch Co-Immunpräzipitation mit Protein G wurde die Interaktion beider Punktmutanten des Protein 4.10 mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein primärer Antikörper gegen das V5-Epitop in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Kontrolle diente slg. Die Lysate belegen die Expression des V5-markierten Protein 4.10 in allen Proben.

IP: Immunpräzipitation; slg: surface immunglobine; Ne.cyt: zytosolischer Anteil des Nephrins

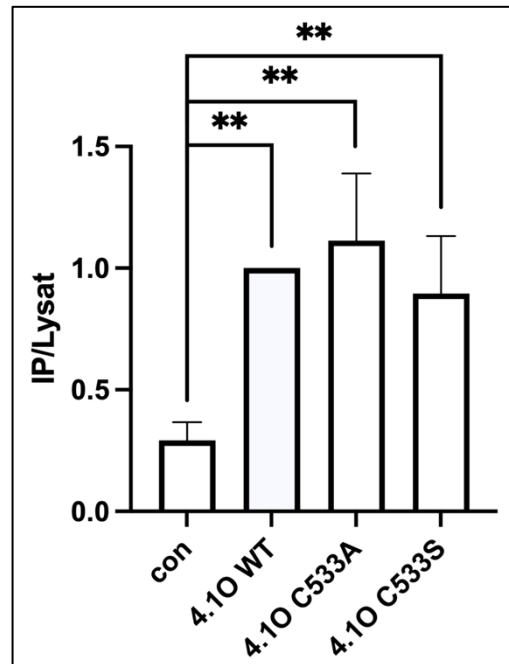


Abbildung 13b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.

Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt sich bei $n=5$ eine signifikante Interaktion von zytosolischem Nephrin gegenüber Protein 4.10 der Variante C533A und der Variante C533A ($p=0,0079$). Die relativ zum Wildtyp gering schwächere Interaktion der Mutante C533A und die gering stärkere Interaktion der Mutante C533S gegenüber dem Nephrin ist nicht signifikant ($p=0,9372$). Die Messwerte sind normiert auf die Wildtyp-Interaktion.

IP: Immunpräzipitation; con: Kontrolle; WT: Wildtyp

4.2.3. Protein 4.10 C552A/S

Analog zu den vorangegangenen Ergebnissen bleibt die Protein-Protein-Interaktion zwischen den Cystein-552-Mutanten (C552A und C552S) des Protein 4.10 Transkriptionsvariante 207 und dem zytosolischen Abschnitt von Nephrins erhalten (s. Abb. 14a). Statistische Auswertungen der Densitometrie bestätigen diese signifikante Beobachtung mit hoher Signifikanz ($n = 6$, $p = 0,0022$, s. Abb. 14b).

Die Punktmutanten weisen in der Densitometrie eine vergleichbare Interaktionsintensität zum Nephrin im direkten Vergleich zur Wildtypvariante des Protein 4.1O Variante 207 (für C552A: Abnahme der densitometrisch ermittelten Signalintensität um etwa 1,8 %, $p = 0,9372$; für C533S: Abnahme um etwa 2,29 %, $p = 0,9372$).

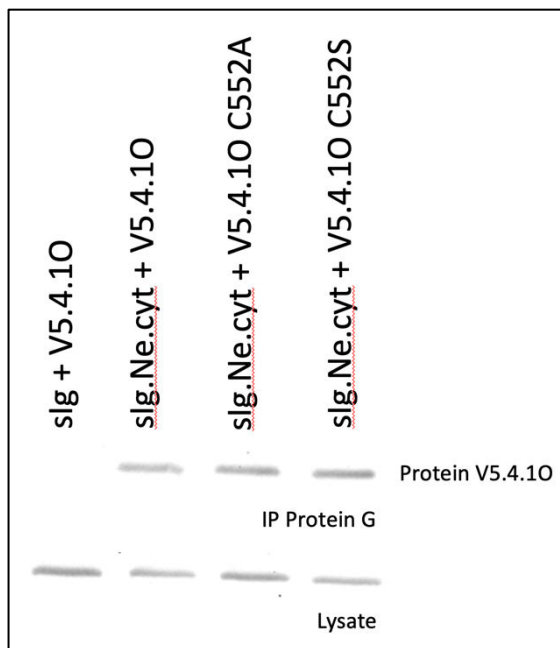


Abbildung 14a: Die Punktmutanten C552A und C552S des Protein 4.1O 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.

Z.n. HEK293T exprimierten Punktmutanten des Protein 4.1O (Variante 207) C552A und C552S mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin. Durch Co-Immunpräzipitation mit Protein G wurde die Interaktion beider Punktmutanten des Protein 4.1O mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein primärer Antikörper gegen das V5-Epitop in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Als Kontrolle diente slg. Die Lysate belegen die Expression des V5-markierten Protein 4.1O in allen Proben.

IP: Immunpräzipitation; slg: surface immunglobine;
Ne.cyt: zytosolischer Anteil des Nephrins

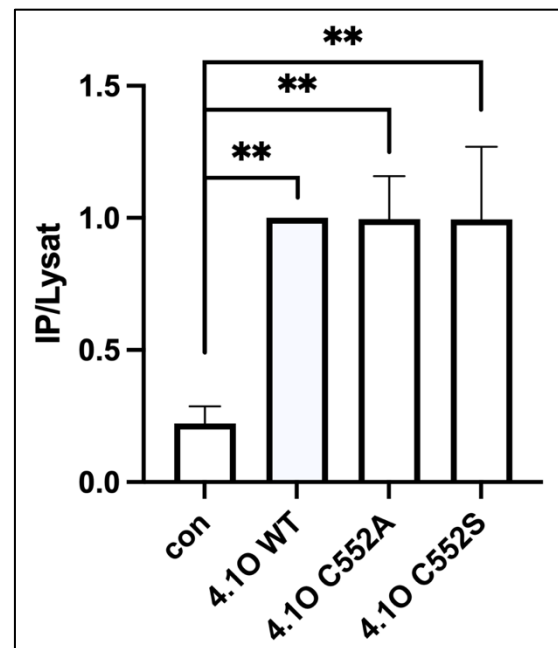


Abbildung 14b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.

Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigt sich bei $n=6$ eine signifikante Interaktion von zytosolischem Nephrin gegenüber Protein 4.1O der Varianten C552A und C552S ($p=0,0022$). Die Interaktionsintensität für beide Mutanten ist vergleichbar mit der Wildtypvariante ($p=0,9372$). Die Messwerte sind normiert auf die Wildtyp-Interaktion.

IP: Immunpräzipitation; con: Kontrolle; WT: Wildtyp

4.3. Interaktion von 4.1O Mutante cc_del mit Nephrin

Das Protein 4.1O Transkriptionsvariante 207 besitzt laut prädiktiver Algorithmen [45, 90] (s. Kapitel 1.2.3) eine strukturgebende coiled-coil Domäne in der Aminosäuresequenz 445 - 472 (Abb. 5). Um den Einfluss dieser Domäne zu untersuchen, wurde mittels DNA-Modifikation eine Deletionsmutante generiert, in der die 84 bp, die für die coiled-coil-Domäne kodieren, entfernt wurden. Im Anschluss ist die Protein-Protein-Interaktion zwischen dieser Mutante des Protein 4.1O Transkriptionsvariante 207 (4.1O cc_del) und dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Co-Immunpräzipitation (s. Kapitel 3.2.4) untersucht worden.

Im Vergleich mit der Wildtypvariante des Protein 4.1O Variante 207 zeigt sich durch die Deletionsmutante eine Interaktion mit zytoplasmatischem Nephrin (Abb. 15a). Die densitometrische Auswertung zeigt eine signifikante ($p = 0,0002$) Interaktion der Mutante cc_del mit Nephrin im Vergleich zur Negativkontrolle (Abb. 15b). Darüber hinaus kommt es zu einem signifikanten Anstieg im densitometrisch ermittelten Signal um etwa 89,54 % im Vergleich zur Wildtyp-Variante von Protein 4.1O ($n = 8$, $p = 0,0019$).

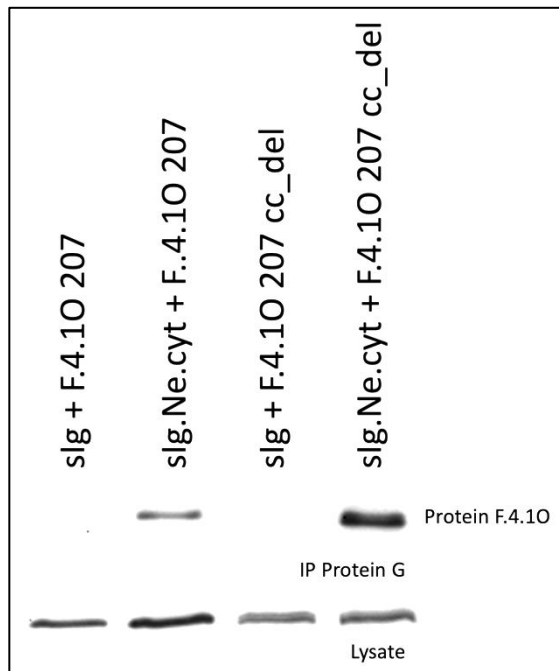


Abbildung 15a: Nachweis der Interaktion von der Mutationsvariante 4.1O cc_del mit dem zytosolischen Teil Nephrens mittels Co-Immunpräzipitation.

Z.n. HEK293T exprimierte Punktmutante des Protein 4.1O (Variante 207) cc_del mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin. Durch Co-Immunpräzipitation mit Protein G wurde die Interaktion der Deletionsmutante cc_del des Protein 4.1O mit dem zytosolischen Anteil von Nephrin mittels Western Blot nachgewiesen. Zur Detektion des Zielproteins wurde ein primärer Antikörper gegen das Flag-Epitop in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt. Als Kontrolle diente slg. Die Lysate belegen die Expression des Flag-markierten Protein 4.1O in allen Proben.

IP: Immunpräzipitation; slg: surface immunglobine;
Ne.cyt: zytosolischer Anteil des Nephrens; cc_del:
coiled-coil deletierte Mutationsvariante

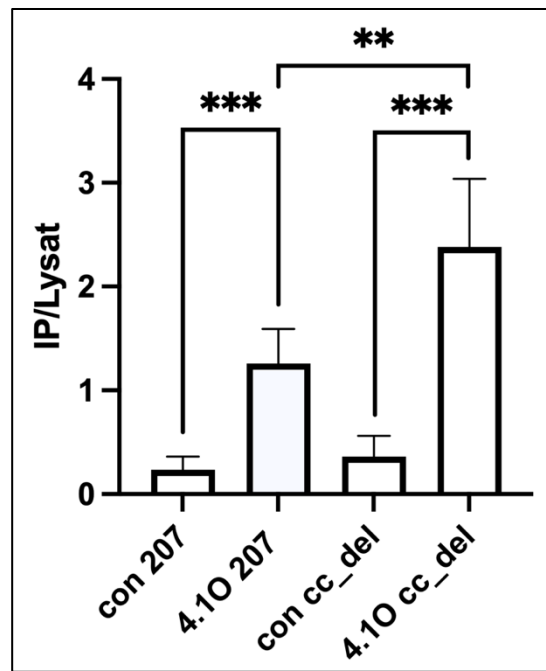


Abbildung 15b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.

Mittels Mann-Whitney-U-Test zeigt sich bei $n = 8$ eine signifikante Interaktion von zytosolischem Nephrein gegenüber Protein 4.1O 207 und der Mutationsvariante cc_del ($p=0,0002$). Die Mutationsvariante cc_del weist eine signifikant stärkere Interaktion zum zytosolischen Nephrein auf um etwa 89,54% ($p=0,0019$).

IP: Immunpräzipitation; con: Kontrolle; cc_del:
coiled-coil deletierte Mutationsvariante

5. Diskussion & Schlussfolgerungen

Pezzelozi et al. konnten FRMD3 als Kandidatengen für die diabetische Nephropathie identifizieren [40]. Angesichts dieser Erkenntnisse kann angenommen werden, dass Protein 4.1O eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortschreiten der diabetischen Nephropathie spielt. Wie bereits erwähnt, ist bisher die molekulare Funktion von Protein 4.1O nicht geklärt. Ergebnisse der Arbeitsgruppe Sellin zeigen eine Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin, einem Hauptbestandteil der glomerulären Schlitzmembran und Barriere gegen einen Verlust von Plasmaproteinen in den Urin. Die Interaktion von Protein 4.1O mit Nephrin ist, ist daher für die Stabilität der glomerulären Schlitzmembran vermutlich von wichtiger Bedeutung.

Die potenzielle klinische Bedeutung von Protein 4.1O macht es zu einem wichtigen Ziel wissenschaftlicher Untersuchungen. Eine der Hypothesen zur Rolle von Protein 4.1O in der Pathogenese der diabetischen Nephropathie ist die Modulation der Bindung von Protein 4.1O zu Nephrin. Durch eine reduzierte Bindung von Protein 4.1O könnte die Stabilität und Funktion der glomerulären Schlitzmembran beeinträchtigt und auf diesem Weg die Krankheitsentwicklung begünstigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Einflussfaktoren hinsichtlich dieser Hypothese untersucht. Diese Untersuchungen zielten darauf ab, die Mechanismen zu verstehen, durch die Protein 4.1O und Nephrin interagieren mit dem Ziel ein besseres Verständnis der molekularen Prozesse zu erlangen und potenzielle therapeutische Ansätze zur Prävention oder Behandlung der diabetischen Nephropathie zu identifiziert.

5.1. Einfluss des alternativen Splicings von Protein 4.1O auf die Interaktion zu Nephrin

Für das paraloge Protein 4.1B konnten verschiedene Transkriptionsvarianten identifiziert werden [52]. Insbesondere das Protein 4.1R zeigt eine strukturelle Vielfalt aufgrund der vielen alternativ gespleißten Exone. Für Protein 4.1R wurde gezeigt, dass alternatives Spleißen die mechanische Stabilität von Zellen beeinflusst. Hierbei ist Exon 16 des Protein 4.1R als relevanter Einflussfaktor identifiziert worden, welches die Bindungsfähigkeit von 4.1R zu Spektrin und Aktin erhöht, ergo die Stabilität des erythrozytären Membranskeletts verbessert [91]. Eine analoge Erhöhung der Bindung an Nephrin konnten wir für das

Protein 4.1O und ihre *splicing*-Varianten nicht beobachten. Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen jedoch, dass alle untersuchten Transkriptionsvarianten von Protein 4.1O (201, 204 und 207) mit dem zytosolischen Abschnitt von Nephrin interagieren. Dieses Erkenntnis erweitert das bisherige Verständnis, da die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin zuvor nur für die Transkriptionsvariante 207 dokumentiert war [25]. Mit diesen Untersuchungen konnten wir erstmals nachweisen, dass auch die Varianten 201 und 204 eine Interaktion mit Nephrin aufweisen. (s. Kapitel 4.1.). Die densitometrisch ermittelte Interaktionsintensität von zytosolischem Nephrin zu beiden Varianten 201 und 204 ist vergleichbar zur Variante 207. Aus diesem Grund wirkt das alternative Splicing zumindest nicht inhibitorisch auf die Interaktion von Protein 4.1O und Nephrin. Vielmehr könnten die Splicingvarianten synergistisch wirken und zur Erhaltung der Stabilität der glomerulären Schlitzmembran beitragen, indem sie als Adapterproteine Nephrinmoleküle an das podozytäre Aktinzystoskelett verankerten.

Interessant ist hier das Interaktionsverhalten von der Transkriptionsvariante 204 hervorzuheben. Ein detaillierter Vergleich der Aminosäuresequenzen der Varianten zeigt, dass die Variante 204 im Gegensatz zur Variante 207 durch das Fehlen des C-terminalen Endes gekennzeichnet ist. Ordnet man die Varianten nach ihrer AA-Sequenz fehlen der Variante 204 die AA 513-554 gezählt nach der Variante 207 (s. Abb. 9). Ohlsson et al. konnten mittels Truncation-Versuchen zeigen, dass die Bindungsstelle für Nephrin in der Transkriptionsvariante 207 im Bereich AA 506-554 lokalisiert ist [25]. Da dieser Bereich der Variante 204 größtenteils fehlt, könnte die Interaktionsdomäne des 4.1O 204 in der AA-Sequenz 506-513 liegen. Um die Interaktionsdomäne in Protein 4.1O 204 zu bestimmen, müsste ein Truncationmapping erfolgen, welcher Zustand zukünftiger Forschungsprojekte sein könnte.

Ein möglicher Erklärungsansatz könnte der Protein 4.1O N-Terminus liefern. Protein 201 und 204 besitzen dieselbe N-terminale Domäne, welche der FERM-Domäne vorgeschaltet ist. Die Interaktionsstudien von Ohlsson et al. haben sich mit der Variante 207 beschäftigt, in welchem sie von der Variante „4.1O short“ sprechen. Diese Bezeichnung ist einfach auf die kürzere Aminosäuresequenz im Vergleich zur Variante 201 zurückzuführen. Genauer fehlt die N-terminale Domäne, welche bei Variante 201 und 204 vorzufinden ist. Dieser Fakt lässt die Möglichkeit zu, dass eine zusätzliche Bindungsdomäne im N-terminus der Varianten 201 und 204 vorliegen könnte. Damit könnte ggf. erklärt werden, dass die

Transkriptionsvariante 204 trotz kleinerer C-terminaler Bindungsdomäne, dennoch eine Interaktion zum Nephrin aufweist. Weitergehende Experimente sind notwendig, um diese These zu untersuchen.

In bisherigen Arbeiten wurden Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Protein 4.1O an glomerulären Prozessen im Rahmen der diabetischen Nephropathie beschrieben [79]. Die bisherigen Ergebnisse der AG Sellin deuten auf eine protektive Rolle von Protein 4.1O für den Podozyten hin. Im Widerspruch steht jedoch die vermehrte renale Protein 4.1O Expression im Rahmen einer diabetischen Nephropathie [79]. So stellte sich die Frage, ob Protein 4.1O Splicevarianten unterschiedliche Funktionen im Rahmen der diabetischen Nephropathie haben könnten. Die Forschungsergebnisse der vorgelegten Arbeit widersprechen der Annahme, dass die Entwicklung der Nephropathie durch verschiedene Splicevarianten aufgrund unterschiedlicher Interaktionen mit Nephrin verursacht wird. Die untersuchten 4.1O-Splicevarianten zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Fähigkeit, mit Nephrin zu interagieren.

Aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen den Transkriptionsvarianten konnte bisher unterschiedliche Funktion von Königshausen et al. herausgestellt werden [92-94]. Die unterschiedlichen Splicevarianten wirkten sich jeweils unterschiedlich auf die Aktivierung von c-myc, YAP/TAZ und die Zellmigration aus [92-94]. Daraus resultiert eine Reduktion der Zellmigration der Podozyten. Weitergehende Experimente sind notwendig, um potentielle Unterschiede innerhalb der Funktion der Splicevarianten des Protein 4.1O aufzudecken.

5.2. Einfluss der Palmitoylierung von Protein 4.1O auf die Interaktion zu Nephrin

Die Ergebnisse der Co-IP für alle Punktmutanten zeigen alle eine erhaltene Interaktion trotz aufgehobener S-Palmitoylierung in den Lokalisation C516, C533 und C552. Da die Bindung von Protein 4.1O an Nephrin über diese C-terminale Domäne vermittelt wird[25], war es wissenschaftlich sinnvoll, Palmitoylierungsstellen in diesem Bereich gezielt zu mutieren, um deren Einfluss auf die Interaktion zu untersuchen. Die Interaktion des Protein 4.1O zum Nephrin bleibt nicht nur erhalten, die Interaktion bleibt in der Intensität auch weitgehend vergleichbar zur Wildtypvariante. Dies deutet darauf hin, dass die S-Palmitoylierung dieser spezifischen Cysteinreste (C516, C533 und C552) keinen direkten

Einfluss auf die Bindungsaffinität zwischen Protein 4.1O und Nephrin ausübt. Diese Beobachtung ist insofern von Bedeutung, als *lipid rafts* eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von Nephrin spielen (s. Kapitel 1.1.2.2). Die Palmitoylierung von Proteinen führt u.a. zur Lokalisierung dieser in *lipid rafts* [95-97]. Somit wäre palmitoyliertes Protein 4.1O vermehrt in *lipid rafts* vorzufinden, genau wie Nephrin in Verbindung mit Podocin und es resultiere die Förderung der Schlitzmembranstabilität. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen.

Die Palmitoylierung wurde in der Literatur bisher auch als negativer Regulator bestimmter Protein-Protein-Interaktionen berichtet. Hayashi et al. konnten belegen, dass durch die C-terminale Palmitoylierung des AMPA-Rezeptors die Bindung zum Protein 4.1N verhindert wird. Dadurch wird die Verbindung des AMPA-Rezeptors mit F-Aktin/Spektrin über das 4.1N-Protein gelöst und es kommt zur Internalisierung der Ligand-Rezeptor-Komplexes [81]. Ähnliche negativ-regulatorische Effekte durch die S-Palmitoylierung konnte für die Proteine TEM8 und LRP6 beobachtet werden [83].

Nebst der Erklärung, dass die Palmitoylierung keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen Protein 4.1O und zytoplasmatischem Nephrin aufzuweisen scheint, gibt es eine alternative Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse. Da in der aktuellen Arbeit jeweils nur einzelne Aminosäuren mittels Mutagenese untersucht wurden, könnte eine kompensatorische Palmitoylierung an anderen Cysteinresten stattgefunden haben. Selbst wenn jeweils die Palmitoylierungseffekte in einer einzelnen Lokalisation bspw. C516 ausbleiben, stehen der Palmitinsäure-Transferase weiterhin die anderen Cysteine bspw. C533 oder C552 zur Palmitoylierung zur Verfügung. Damit wäre eine vollständige Palmitoylierungsdefizienz in keinem der durchgeführten Experimente erreicht und der potenzielle, eigentliche Effekt maskiert. Eine weiterführende Studie mit einer Mehrfachmutante von 4.1O, bei der alle relevanten Palmitoylierungsstellen eliminiert sind, könnte diese Hypothese überprüfen. Schließlich ist zu beachten, dass die experimentelle Grundlage dieser Experimente auf Vorhersagen von Palmitoylierungsstellen durch bioinformatische Algorithmen beruht. Es besteht die Möglichkeit, dass Protein 4.1O (Variante 207) *in-vivo* nicht palmitoyliert wird und daher kein Effekt beobachtet werden konnte. Eine definitive Klärung dieser Frage würde eine experimentelle Validierung der Palmitoylierungsstellen erfordern.

5.3. Einfluss der coiled-coil Domäne von Protein 4.1O auf die Interaktion zum Nephtrin

Die Deletion der coiled-coil Domäne führt zu einer signifikant stärkeren Protein-Protein-Interaktion von Protein 4.1O zu zytoplasmatischem Nephtrin, um nahezu den doppelten Wert in der Messung (+ 89 %). Coiled-coil Domänen tragen zur strukturellen Integrität und Stabilität von Proteinen bei und fördern die Interaktion zwischen Proteinen, indem sie die Bildung von Dimeren ermöglichen. Im Kontext von 4.1O ist die coiled-coil-Domäne von besonderem Interesse, da sie möglicherweise an der Verknüpfung des Zytoskeletts mit der Plasmamembran beteiligt ist, was für die Aufrechterhaltung der Zellform und -funktion entscheidend ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten jedoch auf einen hemmenden Einfluss der coiled-coil-Domäne auf die Interaktion zwischen 4.1O und Nephtrin hin. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise durch direkte und indirekte Auswirkungen der Domänen deletion erklären.

Der Verlust von 28 AA innerhalb eines Proteins von insgesamt 554 AA könnte eine relevante strukturelle Veränderung bewirken. Aufgrund der Länge dieser Deletion und der Nähe zu vorhergesagten sekundärstrukturierten Bereichen ist eine Konformationsänderung des Proteins plausibel. Diese veränderte Konformation könnte die C-terminal gelegene Bindungsstelle von Protein 4.1O für Nephtrin freilegen oder zugänglicher machen, was zu der beobachteten verstärkten Bindung führen würde.

Als indirekter Faktor könnten andere Interaktionspartner an der coiled-coil Domäne eine mögliche Antwort liefern. Gestützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse von Vienken et al., die zeigen konnten, dass die coiled-coil-Domäne von Protein 4.1O gemeinsam mit der FERM-Domäne entscheidend für die Interaktion mit Polycystin-1 ist, wodurch eine Anbindung von Polycystin-1 an das Aktin-Zytoskelett vermittelt werden könnte [98]. Obwohl Polycystin-1 nicht im Podozyten exprimiert wird und somit keine direkte Konkurrenz zur Nephtrinbindung besteht, unterstreicht dieser Befund die Bedeutung der coiled-coil-Domäne für die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen und für die strukturelle Integration von Protein 4.1O in zelluläre Stabilitätsnetzwerke. Über vergleichbare Interaktionsmechanismen könnten auch in Podozyten bislang unbekannte Interaktionspartner an der coiled-coil-Domäne binden und so die Dynamik der Schlitzmembran beeinflussen. Die Deletion der coiled-coil-Domäne würde dieses

Hindernis beseitigen und somit die Bindung zwischen 4.1O und Nephrin erleichtern. Damit kann der c-terminalen coiled-coil Domäne im Bereich der AA 445 - 472 eine regulatorische Funktion für die Bindung zwischen 4.1O und Nephrin zugesprochen werden, da diese Interaktion abhängig von der coiled-coil Domäne wäre. Grundsätzlich wird die Modulation einer Protein-Protein-Interaktion häufig durch die Bindung eines Proteins erreicht. Beispielsweise führt die Homodimerisierung von extrazellulären Nephrinmolekülen zur deren Phosphorylierung des intrazellulären Anteil und somit zur Unterbrechung der Bindung von Nephrin mit β -Arrestin2 [25]. Es ist von Bedeutung zu erwähnen, dass die Wildtypvariante 207 mit coiled-coil Domäne mit Nephrin interagiert (s. Kapitel 4.3). Dies deutet darauf hin, dass die coiled-coil Domäne eine negative regulatorische Funktion im Sinne einer allosterischen Inhibierung besitzen könnte, die Bindung in der Gesamtschau jedoch, zumindest in den vorliegenden Überexpressionsversuchen, nicht vollständig verhindert. Diesem Verständnis zufolge kann die coiled-coil Domäne im Bereich der AA 445 - 472 als allosterisches Zentrum hinsichtlich der Verankerungsfunktion des Protein 4.1O gewertet werden.

Ordnet man diese Erkenntnis in das bisherige Bild der dynamisch regulierten Schlitzmembran ein (Kapitel 1.1.2), so lässt sich dieses um eine mögliche strukturelle und interaktive Rolle der coiled-coil-Domäne erweitern. Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erläutert, vermitteln coiled-coil-Domänen Protein-Protein-Interaktionen und tragen so zur Bildung und Stabilisierung multiproteinärer Komplexe bei. Es ist daher denkbar, dass die coiled-coil-Domäne von Protein 4.1O als Plattform für zusätzliche, bislang unbekannte Interaktionspartner dient, deren Bindungsaffinität oder Expression sich im Rahmen einer diabetischen Nephropathie verändern könnte. Eine solche veränderte Interaktionsdynamik könnte die Integrität der Schlitzmembran beeinträchtigen und somit zur Pathogenese der diabetischen Nephropathie beitragen.

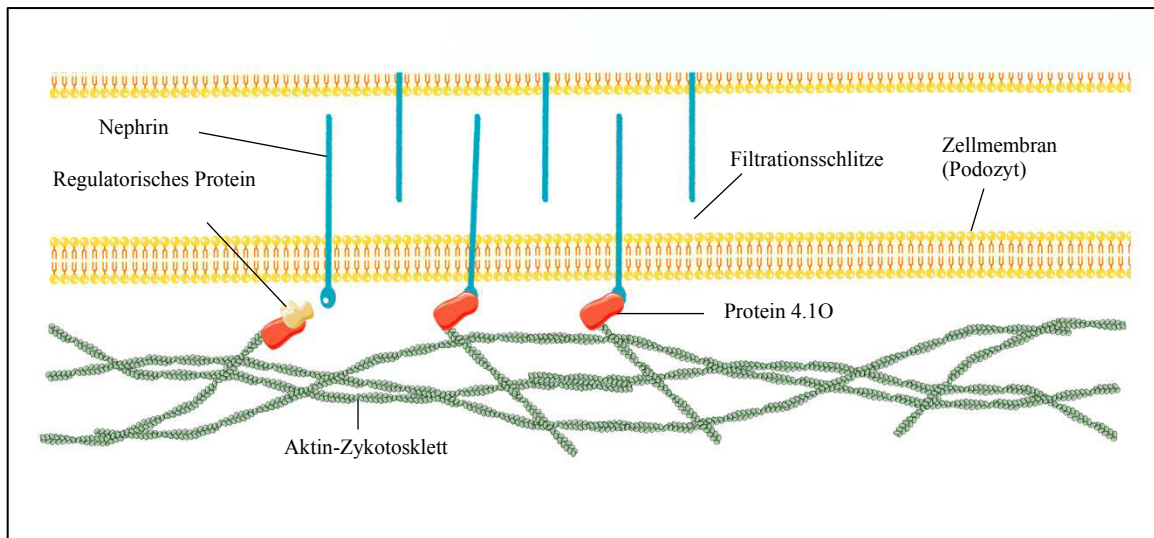


Abbildung 16: Der Effekt der coiled-coil Domäne in Protein 4.1O hinsichtlich der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin.

Bindet ein Protein an die regulatorische coiled-coil Domäne in Protein 4.1O, kommt es zur Dissoziation von Protein 4.1O und Nephrin. Nephrin wird damit vermehrt destabilisiert. Damit führt die coiled-coil Domäne in Gesamtschau zur Schwächung der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin.

Die Abbildung wurde erstellt mithilfe Servier Medical Art unter: <https://smart.servier.com/>, letzter Zugriff 10.07.2024. Die benutzten Bildelemente wurden teilweise in Größe und Seitenverhältnis modifiziert. Die Urheberrechte sind unter der Seite: <https://smart.servier.com/citation-sharing/> nachzulesen.

5.4. Limitationen

Zur Einordnung der beobachteten Ergebnisse und Schlussfolgerungen sind wichtige Limitationen zu beachten.

Bei den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich um *in-vitro*-Experimente. Das bedeutet, dass die Ergebnisse durch *in-vivo* Versuche bestätigt werden sollten, um die Mechanismen und Effekte unter *in-vivo* Bedingungen zu validieren. Zudem wurden die verwendeten HEK-293T-Zellen im vorliegenden Zellkulturmodell zur Überstimulation geführt. Die entspricht nicht den natürlichen Gegebenheiten in den Zellen und kann daher die Ergebnisse beeinflussen. Ein etabliertes *in-vitro*-Modell zur Untersuchung der glomerulären Schlitzmembran steht bislang nicht zur Verfügung. Auch aktuelle Organoid-basierte Systeme sind derzeit noch limitiert. Zudem zeigen primäre Podozyten in Kultur

eine nur sehr geringe oder fehlende Nephtrin-Expression, was funktionelle Untersuchungen zusätzlich erschwert.

Weiterhin ist der mehrfache Einsatz von prädiktiven Rechenmodellen zu unterstreichen. PCOILS, CCS-Palm und Alphafold sind Algorithmen, die auf Studien basieren und die Wahrscheinlichkeit eines Ereignisses berechnen. Auch wenn viele Algorithmen nah an die Wahrheit kommen, bilden sie nicht die Realität ab und können falsch-positive Ergebnisse liefern. Da ein Teil der Experimente auf diesen Berechnungen basiert, sollten ihre Aussagen zukünftig durch weitergehende Studien validiert werden.

5.5. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit liefert neue Einblicke in die molekularen Mechanismen, die der Interaktion des Proteins 4.1O mit Nephtrin zugrunde liegen, und deren mögliche Bedeutung für die Pathogenese der diabetischen Nephropathie. Entgegen der bisherigen Annahme, dass posttranslationale Modifikationen wie die Palmitoylierung oder alternatives Splicing die Bindungsaffinität von 4.1O zu Nephtrin beeinflussen könnten, wurde in den vorgelegten Untersuchungen kein Hinweis gefunden. Alle untersuchten Splicevarianten von 4.1O waren gleichermaßen in der Lage, mit Nephtrin zu interagieren, was auf eine funktionelle Redundanz dieser Isoformen hindeutet. Es müssen jedoch weitergehende Studien erfolgen, um die Palmitoylierung des ganzen Proteins 4.1O zu untersuchen.

Die Deletion der coiled-coil-Domäne von 4.1O verstärkt die Interaktion mit Nephtrin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die coiled-coil-Domäne eine regulatorische Rolle in der 4.1O-Nephtrin-Interaktion spielen könnte, möglicherweise durch Modulation der Bindung an andere Proteine oder durch Konformationsänderungen.

Anhang

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der glomerulären Filterbarriere.....	2
Abbildung 2: Molekulare Architektur der glomerulären Schlitzmembran.....	3
Abbildung 3: Übersicht der Signalkomplexe an der Schlitzmembran	5
Abbildung 4: Domänen des Protein 4.1O Variante 207 basierend auf SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) und der Vorarbeit [7] unserer Arbeitsgruppe	10
Abbildung 5: Wahrscheinlichkeit einer coiled-coil Domäne im Protein 4.1O Transkriptionsvariante 207 basierend auf der PCOILS Analyse-Software [3-6]	9
Abbildung 6: Tertiärstruktur der Proteine 4.1O modelliert mit AlphaFold [1, 2] der Variante 201.....	11
Abbildung 7: Tertiärstruktur der Proteine 4.1O modelliert mit AlphaFold [1, 2] der Variante 204.....	11
Abbildung 8: Tertiärstruktur der Proteine 4.1O modelliert mit AlphaFold [1, 2] der Variante 207.....	12
Abbildung 9: Alignment der 3 Transkriptionsvarianten des Protein 4.1O mithilfe Unitprot-Align unter: https://www.uniprot.org/align , letzter Zugriff am 01.06.2024.	13
Abbildung 10: Vorausberechnete FERM-Domäne des Protein 4.1O Variante 207.....	14
Abbildung 11a: Protein 4.1O 201, 204 und 207 interagieren mit dem zytoplasmatischen Anteil von Nephrin.	35
Abbildung 11b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.....	35
Abbildung 12a: Die Punktmutanten C516A und C516S des Protein 4.1O 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.....	37
Abbildung 12b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.....	37
Abbildung 13a: Die Punktmutanten C533A und C533S des Protein 4.1O 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.....	38
Abbildung 13b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.....	38
Abbildung 14a: Die Punktmutanten C552A und C552S des Protein 4.1O 207 interagieren mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.....	39
Abbildung 14b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.....	39
Abbildung 15a: Nachweis der Interaktion von der Mutationsvariante 4.1O cc_del mit dem zytosolischen Teil Nephrins mittels Co-Immunpräzipitation.	41
Abbildung 15b: Densitometrie mit statistischer Auswertung.....	41

Abbildung 16: Der Effekt der coiled-coil Domäne in Protein 4.1O hinsichtlich der Interaktion zwischen Protein 4.1O und Nephrin.	48
---	----

7. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Jumper, J., et al., *Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold*. Nature, 2021. **596**(7873): p. 583-589.
2. Letunic, I. and P. Bork, *20 years of the SMART protein domain annotation resource*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D493-D496.
3. Letunic, I., S. Khedkar, and P. Bork, *SMART: recent updates, new developments and status in 2020*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D458-D460.
4. Tryggvason, K., J. Patrakka, and J. Wartiovaara, *Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria*. N Engl J Med, 2006. **354**(13): p. 1387-401.
5. New, L.A., C.E. Martin, and N. Jones, *Advances in slit diaphragm signaling*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(4): p. 420-30.
6. Rennke, H.G. and M.A. Venkatachalam, *Structural determinants of glomerular permselectivity*. Fed Proc, 1977. **36**(12): p. 2519-26.
7. Musial, K. and D. Zwolinska, *[Structure and function of the glomerular filtration barrier]*. Pol Merkur Lekarski, 2005. **18**(105): p. 317-20.
8. Satchell, S.C. and F. Braet, *Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(5): p. F947-56.
9. Jeansson, M. and B. Haraldsson, *Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(1): p. F111-6.
10. Miner, J.H., *The glomerular basement membrane*. Exp Cell Res, 2012. **318**(9): p. 973-8.
11. Kanwar, Y.S. and M.G. Farquhar, *Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(3): p. 1303-7.
12. Pavenstadt, H., W. Kriz, and M. Kretzler, *Cell biology of the glomerular podocyte*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 253-307.
13. Inoue, T., et al., *FAT is a component of glomerular slit diaphragms*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 1003-12.
14. Schnabel, E., J.M. Anderson, and M.G. Farquhar, *The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1255-63.

15. Cho, E.A., et al., *Differential expression and function of cadherin-6 during renal epithelium development*. Development, 1998. **125**(5): p. 803-12.
16. Donoviel, D.B., et al., *Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(14): p. 4829-36.
17. Gerke, P., et al., *Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(4): p. 918-26.
18. Sellin, L., et al., *NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins*. FASEB J, 2003. **17**(1): p. 115-7.
19. Boute, N., et al., *NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome*. Nat Genet, 2000. **24**(4): p. 349-54.
20. Thomas, P.E., et al., *GLEPP1, a renal glomerular epithelial cell (podocyte) membrane protein-tyrosine phosphatase. Identification, molecular cloning, and characterization in rabbit*. J Biol Chem, 1994. **269**(31): p. 19953-62.
21. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
22. Kestilä, M., et al., *Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type maps to the long arm of chromosome 19*. Am J Hum Genet, 1994. **54**(5): p. 757-64.
23. Shih, N.Y., et al., *CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain*. Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2303-8.
24. Jones, N., et al., *Nck adaptor proteins link nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes*. Nature, 2006. **440**(7085): p. 818-23.
25. Ohlsson, S.: Die Rolle des Protein 4.1O für die Funktion des Podozyten. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Klinik für Nephrologie, 2018.
26. Lahdenpera, J., et al., *Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases*. Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 404-13.
27. Tryggvason, K., V. Ruotsalainen, and J. Wartiovaara, *Discovery of the congenital nephrotic syndrome gene discloses the structure of the mysterious molecular sieve of the kidney*. Int J Dev Biol, 1999. **43**(5): p. 445-51.

28. Lenkkeri, U., et al., *Structure of the gene for congenital nephrotic syndrome of the finnish type (NPHS1) and characterization of mutations*. Am J Hum Genet, 1999. **64**(1): p. 51-61.
29. Fuchshuber, A., et al., *Mapping a gene (SRN1) to chromosome 1q25–q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis*. Human Molecular Genetics, 1995. **4**(11): p. 2155-2158.
30. Schwarz, K., et al., *Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin*. J Clin Invest, 2001. **108**(11): p. 1621-9.
31. Quack, I., et al., *beta-Arrestin2 mediates nephrin endocytosis and impairs slit diaphragm integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14110-5.
32. Wei, H., et al., *Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10782-7.
33. Andersen, J.N., et al., *Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(21): p. 7117-36.
34. Grabowski, C.: Die Funktionen von GLEPP1 im Podozyten und dessen Bedeutung für die Integrität der glomerulären Schlitzmembran. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2019.
35. Verma, R., et al., *Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20716-23.
36. Ni, X., et al., *Molecular cloning and characterization of the protein 4.1O gene, a novel member of the protein 4.1 family with focal expression in ovary*. J Hum Genet, 2003. **48**(2): p. 101-6.
37. Fagerberg, L., et al., *Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2014. **13**(2): p. 397-406.
38. Mirdita M, S.K., Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: Making protein folding accessible to all. Nature Methods, 2022, *ColabFold: AlphaFold2 using MMseqs2*. 2022.
39. Howe, K.L., et al., *Ensembl 2021*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D884-D891.
40. Pezzolesi, M.G., et al., *Genome-wide association scan for diabetic nephropathy susceptibility genes in type 1 diabetes*. Diabetes, 2009. **58**(6): p. 1403-10.

41. Buffon, M.P., et al., *rs1888747 polymorphism in the FRMD3 gene, gene and protein expression: role in diabetic kidney disease*. Diabetol Metab Syndr, 2016. **8**: p. 3.
42. Martini, S., et al., *From single nucleotide polymorphism to transcriptional mechanism: a model for FRMD3 in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2605-12.
43. Diakowski, W., M. Grzybek, and A.F. Sikorski, *Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily*. Folia Histochem Cytobiol, 2006. **44**(4): p. 231-48.
44. Zimmermann, L., et al., *A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core*. J Mol Biol, 2018. **430**(15): p. 2237-2243.
45. Gabler, F., et al., *Protein Sequence Analysis Using the MPI Bioinformatics Toolkit*. Curr Protoc Bioinformatics, 2020. **72**(1): p. e108.
46. Crick, F.H.C., *The packing of α -helices: simple coiled-coils*. Acta Crystallographica, 1953. **6**(8): p. 689-697.
47. Truebestein, L. and T.A. Leonard, *Coiled-coils: The long and short of it*. Bioessays, 2016. **38**(9): p. 903-16.
48. Mirdita, M., M. Steinegger, and J. Soding, *MMseqs2 desktop and local web server app for fast, interactive sequence searches*. Bioinformatics, 2019. **35**(16): p. 2856-2858.
49. Mirdita, M., et al., *Uniclust databases of clustered and deeply annotated protein sequences and alignments*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(D1): p. D170-D176.
50. Takakuwa, Y., *Protein 4.1, a multifunctional protein of the erythrocyte membrane skeleton: structure and functions in erythrocytes and nonerythroid cells*. Int J Hematol, 2000. **72**(3): p. 298-309.
51. Hoover, K.B. and P.J. Bryant, *The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(2): p. 229-34.
52. Ramez, M., et al., *Distinct distribution of specific members of protein 4.1 gene family in the mouse nephron*. Kidney Int, 2003. **63**(4): p. 1321-37.
53. Chishti, A.H., et al., *The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(8): p. 281-2.
54. Ceccarelli, D.F., et al., *Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 252-9.

55. Gunn-Moore, F.J., A.M. Tilston-Lunel, and P.A. Reynolds, *Willing to Be Involved in Cancer*. Genes (Basel), 2016. **7**(7).
56. Pearson, M.A., et al., *Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain*. Cell, 2000. **101**(3): p. 259-70.
57. DiNitto, J.P. and D.G. Lambright, *Membrane and juxtamembrane targeting by PH and PTB domains*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(8): p. 850-67.
58. Anderson, R.A. and R.E. Lovrien, *Glycophorin is linked by band 4.1 protein to the human erythrocyte membrane skeleton*. Nature, 1984. **307**(5952): p. 655-8.
59. Anderson, R.A. and V.T. Marchesi, *Regulation of the association of membrane skeletal protein 4.1 with glycophorin by a polyphosphoinositide*. Nature, 1985. **318**(6043): p. 295-8.
60. Gascard, P. and N. Mohandas, *New insights into functions of erythroid proteins in nonerythroid cells*. Current Opinion in Hematology, 2000. **7**(2): p. 123-129.
61. Nunomura, W., et al., *Regulation of CD44-protein 4.1 interaction by Ca²⁺ and calmodulin. Implications for modulation of CD44-ankyrin interaction*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30322-8.
62. Marfatia, S.M., et al., *Identification of the protein 4.1 binding interface on glycophorin C and p55, a homologue of the Drosophila discs-large tumor suppressor protein*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 715-9.
63. Leclerc, E. and S. Vetter, *Characterization of a calcium-dependent calmodulin-binding domain in the 135-kD human protein 4.1 isoform*. Eur J Biochem, 1998. **258**(2): p. 567-71.
64. Williams, R.L., *Handbook of Cell Signaling (Second Edition)*. 2009. **1**.
65. Delaunay, J., *The molecular basis of hereditary red cell membrane disorders*. Blood Rev, 2007. **21**(1): p. 1-20.
66. Tyler, J.M., W.R. Hargreaves, and D. Branton, *Purification of two spectrin-binding proteins: biochemical and electron microscopic evidence for site-specific reassociation between spectrin and bands 2.1 and 4.1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(10): p. 5192-6.
67. Pasternack, G.R., et al., *Interactions between protein 4.1 and band 3. An alternative binding site for an element of the membrane skeleton*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3676-83.

68. Lux, S.E.t., *Anatomy of the red cell membrane skeleton: unanswered questions*. Blood, 2016. **127**(2): p. 187-99.
69. Ohanian, V., et al., *Analysis of the ternary interaction of the red cell membrane skeletal proteins spectrin, actin, and 4.1*. Biochemistry, 1984. **23**(19): p. 4416-20.
70. Sun, C.X., V.A. Robb, and D.H. Gutmann, *Protein 4.1 tumor suppressors: getting a FERM grip on growth regulation*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 21): p. 3991-4000.
71. Fernandez-Valle, C., et al., *Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology*. Nat Genet, 2002. **31**(4): p. 354-62.
72. Morrison, H., et al., *The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44*. Genes Dev, 2001. **15**(8): p. 968-80.
73. Gutmann, D.H., et al., *Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(10): p. 1495-500.
74. Perry, A., et al., *Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases*. J Neuropathol Exp Neurol, 2000. **59**(10): p. 872-9.
75. Robb, V.A., et al., *Identification of a third Protein 4.1 tumor suppressor, Protein 4.1R, in meningioma pathogenesis*. Neurobiology of Disease, 2003. **13**(3): p. 191-202.
76. Haase, D., et al., *FRMD3, a novel putative tumour suppressor in NSCLC*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4464-8.
77. Shao, W., et al., *FRMD3 inhibits the growth and metastasis of breast cancer through the ubiquitination-mediated degradation of vimentin and subsequent impairment of focal adhesion*. Cell Death Dis, 2023. **14**(1): p. 13.
78. Kramer-Zucker, A.G., et al., *Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes*. Dev Biol, 2005. **285**(2): p. 316-29.
79. Bajraktarevic, A.: *FRMD3/Protein 4.1O ist ein neuer durch MAP-Kinasen regulierter Nephrin-Adaptor an F-Aktin und ist mit Diabetes mellitus assoziiert*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2024.
80. Resh, M.D., *Covalent lipid modifications of proteins*. Curr Biol, 2013. **23**(10): p. R431-5.

81. Hayashi, T., G. Rumbaugh, and R.L. Huganir, *Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites*. Neuron, 2005. **47**(5): p. 709-23.
82. Alvarez, E., N. Girones, and R.J. Davis, *A point mutation in the cytoplasmic domain of the transferrin receptor inhibits endocytosis*. Biochem J, 1990. **267**(1): p. 31-5.
83. Charollais, J. and F.G. Van Der Goot, *Palmitoylation of membrane proteins (Review)*. Mol Membr Biol, 2009. **26**(1): p. 55-66.
84. Abrami, L., S.H. Leppla, and F.G. van der Goot, *Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis*. J Cell Biol, 2006. **172**(2): p. 309-20.
85. F.L. Graham, A.J.v.d.E., *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**(2): p. 456-467.
86. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
87. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
88. QIAGEN, *QIAfilter Plasmid Purification Handbook*. 04/2012.
89. Zeugin JA, H.J., *Ethanol Precipitation of DNA*. FOCUS, 1985. **7**(4).
90. Zimmermann L, S.A., Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V, *A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core*. Journal of Molecular Biology, 2018. **S0022-2836(17)30587-9**.
91. Conboy, J., *The role of alternative pre-mRNA splicing in regulating the structure and function of skeletal protein 4.1*. Proc Soc Exp Biol Med, 1999. **220**(2): p. 73-8.
92. Koenigshausen, E., et al., *FRMD3/Protein 4.1O Increases Hippo Signaling in a Glucose-Dependent Manner: PO0672*. Journal of the American Society of Nephrology, 2021. **32**(10S): p. 243.
93. Koenigshausen, E., et al., *Diabetic Kidney Disease: Protein 4.1O Reduces YAP/TAZ Activation and Growth Factor-Induced Podocyte Migration: SA-PO414*. Journal of the American Society of Nephrology, 2023. **34**(11S): p. 837.

94. Koenigshausen, E., et al., *FRMD3/Protein 4.1O Splice Variants Regulate Hippo Signaling and Cell Migration: SA-PO251*. Journal of the American Society of Nephrology, 2022. **33**(11S): p. 671.
95. Huang, K. and A. El-Husseini, *Modulation of neuronal protein trafficking and function by palmitoylation*. Curr Opin Neurobiol, 2005. **15**(5): p. 527-35.
96. Resh, M.D., *Palmitoylation of ligands, receptors, and intracellular signaling molecules*. Sci STKE, 2006. **2006**(359): p. re14.
97. Linder, M.E. and R.J. Deschenes, *Palmitoylation: policing protein stability and traffic*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 74-84.
98. Vienken, T. et al.: Protein 4.1O Binds to Polycystin-1, Activates Ubiquitination, and Inhibits Polycystin-1 Signaling. In: Journal of the American Society of Nephrology 33 (2022), S. 400–400.

Danksagung

Gerne würde ich an dieser Stelle meinen Dank an alle aussprechen, die mir auf meinem Weg geholfen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank an Univ.-Prof. Dr. med. Lars Christian Rump und an Univ.-Prof. Dr. med. Roman Ulrich Müller für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik für Nephrologie des Universitätsklinikums Düsseldorf absolvieren zu dürfen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Lorenz Sellin möchte besonders für seine Ideen, seine Vorarbeit und seine fachliche Betreuung danken.

Meiner Betreuerin Dr. med. Eva Königshausen bin zum größten Dank verpflichtet. Ich bin unglaublich dankbar für ihre Unterstützung, ihren fachlichen Austausch, für die Gespräche mit ihr und Ihren Spirit, den sie mitgegeben hat.

Ebenso gilt mein besonderer Dank an Prof. Dr. Markus Butz für seine engagierte Co-Betreuung sowie seine Tätigkeit als Zweitgutachter dieser Arbeit. Ich bin ihm dankbar für seine jederzeit wertschätzende Begleitung während des Promotionsprozesses.

Außerdem möchte ich dem technischen Assistenten des Labors danken. Besonders Blanka Duvnjak, die mir viel beigebracht und das Labor organisiert hat.

Ich möchte mich bei allen wissenschaftlichen Mitarbeitern und Doktoranten, die mich während meiner Laborzeit und darüber hinaus begleitet haben, bedanken.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinem privaten Umfeld danken:

Meiner Mutter, die mich stets mit all ihren Kräften unterstützt hat. Ihre Opferbereitschaft und ihr Glaube an mich haben mich immer wieder ermutigt, meine Ziele zu verfolgen. Meinem Vater, der immer hinter mir stand und mir stets den Rücken gestärkt hat. Ich habe ihn während dieser Arbeit verloren. Ich weiß aber, dass er stolz auf mich wäre.

Meiner geliebten Frau, die mir in jeder Phase dieser Arbeit mit Geduld, Verständnis und Liebe zur Seite stand. Ihre motivierenden Worte haben mir immer wieder neue Energie gegeben und mich durch diese intensive Zeit getragen.