

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik D

(Allg. Innere Medizin sowie Nieren- und Hochdruckkrankheiten und Rheumatologie)

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt –

**Zellbiologische Studien über EPB4.1L5 und seine Beziehung zu Crumbs2 in HEK293T  
und AB8-Zellen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Brüning, Klara Kristin

aus Lübeck

– 2021 –

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weide

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Ebnet

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik D

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hermann-Joseph Pavenstädt –

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weide

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Klaus Ebnet

## **ZUSAMMENFASSUNG**

### **Zellbiologische Studien über EPB4.1L5 und seine Beziehung zu Crumbs2 in HEK293T und AB8-Zellen**

Brüning, Klara Kristin

EPB4.1L5 ist ein Protein, welches wichtige Funktionen für die Genese epithelialer Morphologie hat und eine zentrale Verbindung verschiedener zellulärer Regulationsmechanismen herstellen könnte. Es wurde als Interaktionspartner des für die Polarität von Epithelien zuständigen Crumbs (Crb)-Pals1-Komplexes beschrieben. Zudem ist EPB4.1L5 als podozytenspezifischer Bestandteil von FAs bekannt und daher an deren Adhärenz beteiligt. Diese ist für Podozyten von großer Bedeutung, da sie als Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) der Niere starken Strömungen ausgesetzt sind. Hinweise auf eine wichtige Rolle am Erhalt der Podozytenfunktion liefern EPB4.1L5-*knockout* (KO)-Mäuse, die schwere Proteinurie sowie eine fokalsegmentale Glomerulosklerose (FSGS) entwickelten.

Um mehr über die Funktionen von EPB4.1L5 sowie dessen Bezug zu Crumbs2 (Crb2) zu erfahren, wurden in dieser Arbeit erstmals stabile HEK- und Podozyten-Zelllinien mit induzierbarer Überexpression von fluoreszenzmarkiertem EPB4.1L5 und Crb2 generiert. Crb2 ist eine in Podozyten hoch exprimierte und an der Schlitzmembran der Niere beteiligte Crb-Isoform. In der Mikroskopie fiel eine starke Anreicherung von EPB4.1L5 entlang der Zellmembran und in zahlreichen Zellfortsätzen auf. Eine Interaktion zu Crb2 ließ sich nicht bestätigen. Jedoch war unter EPB4.1L5-Überexpression eine Umorganisation des *Tight Junction*-Proteins ZO1 zu beobachten. Ein Crb-unabhängiger Einfluss auf diese für die apikobasale Polarität wichtigen Zellkontakte wäre eine neue Funktion von EPB4.1L5. Insbesondere die Zellmorphologie, die Lokalisation sowie der ZO1-Einfluss deuten auf EPB4.1L5 als Proteinschnittstelle zwischen Zytoskelett- sowie Zellkontaktregulation hin.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2021

## **Erklärung**

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

### **Zellbiologische Studien über EPB4.1L5 und seine Beziehung zu Crumbs2 in HEK293T und AB8-Zellen**

in der Arbeitsgruppe Molekulare Nephrologie, Medizinische Klinik D,  
Universitätsklinikum Münster

unter Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Weide

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Klara Kristin Brüning

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung .....	1
1.1 EPB4.1L5 als Schlüsselprotein epithelialer Morphogenese .....	1
1.1.1 EPB4.1L5 und Zellpolarität.....	2
1.1.2 EPB4.1L5 und Zelldynamik .....	5
1.2 Bedeutung von EPB4.1L5 für glomeruläre Podozyten und Crb2 für die Nephrologie .....	8
1.2.1 EPB4.1L5 und seine Bedeutung für den Podozyten.....	10
1.2.2 Crb2 und seine Bedeutung für die Nephrologie .....	11
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....	12
2 Materialien .....	14
2.1 Geräte .....	14
2.2 Laborbedarf .....	15
2.3 Chemikalien.....	16
2.4 Puffer und Lösungen .....	17
2.5 Reagenziensysteme und Kits.....	18
2.6 Enzyme .....	19
2.7 Antikörper .....	19
2.8 Primer.....	21
2.9 Plasmide.....	22
2.10 Organismen .....	23
2.10.1 Bakterienstämme .....	23
2.10.2 Eukaryotische Zelllinien.....	23
2.11 Software, Datenbanken und Suchmaschinen .....	24
3 Methoden.....	25
3.1 Methoden der Molekularbiologie .....	25
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	25
3.1.2 Klonierung von DNA.....	26
3.1.3 Plasmid-DNA Isolierung .....	27
3.1.4 Sequenzierung.....	28
3.1.5 Gateway® -Klonierungen .....	28
3.2 Transformation von Bakterien.....	28
3.3 Methoden der Zellkultur .....	29

3.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien .....	29
3.3.2	Transiente Transfektion.....	29
3.3.3	Generierung von stabilen Zelllinien .....	30
3.3.4	Einfrieren von Zellen .....	31
3.3.5	Herstellung von Zelllysaten .....	31
3.4	Methoden der Proteinbiochemie .....	31
3.4.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten (SDS-PAGE)....	31
3.4.2	Western Blot (WB) .....	32
3.4.3	Immundetektion mit spezifischen Antikörpern .....	33
3.4.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	33
3.4.5	Ko-Immunpräzipitation .....	35
3.5	Das pInducer21-Puro-System.....	35
3.6	Statistische Analysen.....	36
4	Ergebnisse .....	37
4.1	Der Einfluss hoher EPB4.1L5-Level auf die Zellbiologie .....	37
4.1.1	Klonierung von Vektoren zur transienten Überexpression von EPB4.1L5.....	37
4.1.2	Generierung von Zelllinien mit induzierbarer, RFP-getaggtter Überexpression .....	38
4.1.3	EPB4.1L5 ist vermehrt membranständig, in Zellfortsätzen und in intrazellulären motilen Vesikeln lokalisiert .....	40
4.1.4	EPB4.1L5-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziiierter Proteine .....	42
4.1.5	EPB4.1L5-Überexpression weist auf eine Umordnung des <i>Tight Junction</i> -Proteins ZO1 hin .....	44
4.1.6	Überexpression von EPB4.1L5 zeigt keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Komponenten des wnt-, mTOR-, AKT- oder Hippo-Signalwegs.....	45
4.2	Der Einfluss hoher EPB4.1L5- und Crb2-Level auf die Zellbiologie.....	46
4.2.1	Ein Einfluss der Hochregulation des EPB4.1L5- oder Crb2-Levels in HEK293T-Zellen auf die Quantität des jeweils anderen Proteins ist nicht nachweisbar .....	46
4.2.2	Generierung von Zellen mit einem erhöhten Expressionslevel von EPB4.1L5 und Crb2 .....	47
4.2.3	Crb2 und EPB4.1L5 kolokalisieren nicht in doppelt überexprimierenden Zellen .....	48
4.2.4	EPB4.1L5 und Crb2 zeigen keine Interaktion in der Ko-IP .....	51
4.2.5	Unter Pals1-Defizienz ist keine EPB4.1L5-Crb2-Interaktion nachweisbar.....	52
4.3	Zusammenfassung .....	52

5	Diskussion.....	54
5.1	Generierung von Zellsystemen zur Überexpression von EPB4.1L5 .....	54
5.2	Lokalisationsstudien zu EPB4.1L5.....	55
5.2.1	EPB4.1L5 hat eine starke Zellmembran-Assoziation .....	55
5.2.2	EPB4.1L5 ist in Lysosomen und anderen intrazellulären, motilen Vesikeln lokalisiert.....	56
5.2.3	EPB4.1L5-Überexpressionssysteme sind fortsatzreich und weisen eine hohe Signalanreicherung auf.....	56
5.3	Einfluss von EPB4.1L5-Überexpression auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziiierter Proteine.....	57
5.4	EPB4.1L5 zeigt keinen regulatorischen Einfluss auf den wnt-, AKT-, mTOR- und Hippo-Signalweg.....	59
5.5	Generierung von stabilen Zelllinien zur gemeinsamen Überexpression von EPB4.1L5 und Crb2.....	59
5.6	EPB4.1L5 und Crb2 kolokalisieren nicht.....	60
5.7	EPB4.1L5 und Crb2 zeigen im Pulldown keine Interaktion.....	61
5.8	Unter Pals1-Defizienz ist keine EPB4.1L5-Crb2-Interaktion nachweisbar .	62
5.9	EPB4.1L5 stört die Lokalisation des <i>Tight Junction</i> -Protein ZO1 und könnte daher eine Crb-unabhängige Rolle bei der Zellpolarität spielen .....	63
5.10	Ausblick .....	65
	Literaturverzeichnis .....	67
	Lebenslauf.....	76
	Danksagungen .....	77

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturschema von EPB4.1L5.....	1
Abbildung 2: Der Crb-Komplex.....	4
Abbildung 3: Vergleich von EPB4.1L5-Wildtyp (WT) und -Nullallel Mäuseembryonen.....	7
Abbildung 4: Der Aufbau der Niere.....	8
Abbildung 5: Der Podozyt.....	9
Abbildung 6: EPB4.1L5 als Regulator der Aktomyosin-Kontraktilität.....	11
Abbildung 7: Schema des pInducer21-Puro-Systems.....	36
Abbildung 8: WB und Fluoreszenzbilder erfolgreicher, transienter Transfektionen zur Überexpression von EPB4.1L5.....	38
Abbildung 9: WB und IF-Bilder zum Überprüfen der induzierbaren Überexpression von RFP EPB4.1L5 in HEK293T- und AB8-Zellen.....	39
Abbildung 10: EPB4.1L5-Lokalisation in HEK293T- und AB8-Zellen im <i>live cell imaging</i> .....	41
Abbildung 11: Darstellung von EPB4.1L5 und LysoTracker®-positiven Vesikeln in HEK293T- und AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen mit dem Fluoreszenz- Mikroskop.....	42
Abbildung 12: EPB4.1L5-Überexpression zeigt keinen Einfluss auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziiierter Proteine.....	44
Abbildung 13: EPB4.1L5-Überexpression stört die Anordnung des <i>Tight Junction</i> Proteins ZO1.....	45
Abbildung 14: Überexpression von EPB4.1L5 zeigt keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Komponenten des mTOR-, wnt-, AKT- oder Hippo- Signalwegs.....	46
Abbildung 15: Endogenes Crb2-Level in HEK293T sowie der Einfluss von EPB4.1L5- Überexpression auf das Crb2-Level und von Crb2-Überexpression auf das EPB4.1L5-Level.....	47
Abbildung 16: WB und IF-Bilder zum Überprüfen der induzierbaren Überexpression von RFP-EPB4.1L5 und hCrb2-GFP in HEK293T- und AB8-Zellen,.....	48
Abbildung 17: Fluoreszenzbilder zur Verteilung von EPB4.1L5 in Kombination mit Crb2 in HEK293T- und AB8-Zellen, die diese Proteine überexprimieren.....	50
Abbildung 18: WB der Ko-IP von HEK293T RFP EPB4.1L5-Zellen.....	51
Abbildung 19: WB der Ko-IP von HEK293T $\Delta$ Pals1- Zellen.....	52
Abbildung 20: Regulation von Crb-Interaktionspartnern.....	63

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	14
Tabelle 2: Allgemeiner Laborbedarf.....	15
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien .....	16
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	17
Tabelle 5: Kommerzielle Reagenzsysteme/ Kits .....	18
Tabelle 6: Enzyme.....	19
Tabelle 7: Primäre Antikörper.....	19
Tabelle 8: Sekundäre und alexakonjugierte Antikörper und Zellgifte.....	20
Tabelle 9: Klonierungsprimer.....	21
Tabelle 10: Sequenzierungsprimer.....	21
Tabelle 11: Plasmide .....	22
Tabelle 12: Verwendeter kompetenter Bakterienstamm .....	23
Tabelle 13: Eukaryotische Zelllinien .....	23
Tabelle 14: Kultivierungsbedingungen der Zelllinien.....	24
Tabelle 15: Verwendete Software, Datenbanken und Suchmaschinen.....	24
Tabelle 16: Thermoprofil einer PCR mit der Accuprime™ Pfx DNA-Polymerase.....	25
Tabelle 17: Reaktionsansatz einer PCR zur Genamplifikation .....	25
Tabelle 18: Ansatz für den Restriktionsverdau .....	26
Tabelle 19: Ligationsansatz.....	27
Tabelle 20: LR-Reaktionsansatz.....	28
Tabelle 21: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen-Gelen für die SDS-PAGE.....	32

## Abkürzungsverzeichnis

Amp – Ampicillin

aPKC – atypische Proteinkinase C

APS – Ammoniumperoxidsulfat

BSA – bovines Serumalbumin

cm – Centimeter

cm<sup>2</sup> – Quadratcentimeter

Crb – Crumbs

Crb2 – Crumbs2

DMSO – Dimethylsulfoxid

Dox – Doxycyclin

*E. coli* – *Escheria coli*

ECM – extrazelluläre Matrix

EF1 $\alpha$  – *elongation factor 1-  $\alpha$*

EMT – Epithelial-mesenchymale  
Transition

EPB4.1L5 – Erythrocyte membrane  
protein 4.1 band like 5

ER – endoplasmatisches Retikulum

ERM – ERM-Proteinfamilie: Ezrin, Radixin  
und Moesin

FA – fokale Adhäsion

FCS – fötales Kälberserum

FSGS – Fokal segmentale  
Glomerulosklerose

g – Gewichtskraft

GAP – GTPase-Aktivierungsprotein

GBM – glomeruläre Basalmembran

GDP – Guanosindiphosphat

GEF – GTP-Austauschfaktor

GFB – glomeruläre Filtrationbarriere

GFP – grün fluoreszierendes Protein

GFR – glomeruläre Filtrationsrate

GST – Glutathion-S-Transferase

GTP – Guanosintriphosphat

h – Stunden

hCrb2 – humanes Crumbs2

HEBS – *hepes buffered saline solution*

HEK293T-Zellen – *Human Embryonic  
Kidney 293T- Zellen*

HEPES – 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1  
piperazino]-ethansulfonsäure

ICD – intrazelluläre Domäne

IF – Immunfluoreszenz

IRES – interne ribosomale Eintrittsstelle

**K**ana – Kanamycin

kb – Kilobase

kDa – Kilodalton

KO – *knockout*

Ko-IP – Ko-Immunpräzipitation

I – Liter

LB – *lysogeny broth*

**M**AGUK – membranassoziierte Guanylatkinase

MDCK – Madin-Darby Canine Kidney

mA – Milliampere

ml – Milliliter

mM – Millimolar

Moe – *mosaic eyes*

MRLC – Myosin-regulierende Leichtketten

mTOR – *mechanistic target of rapamycin*

**N**GS – *normal goat serum*

ng – Nanogramm

nm – Nanometer

**P**ATJ – Pals1-assoziertes Tight Junction Protein

PBS – *phosphate buffered saline*

PCR – *polymerase chain reaction*

PFA – Paraformaldehyd

pmol – Picomol

pInd – pInducer21- Puromycin

PVDF – Polyvinylidenfluorid

**R**BF – renaler Blutfluss

RFP – rot fluoreszierendes Protein

Rock – Rho-assozierte-Kinase

rpm – *revolutions per minute*

RT – Raumtemperatur

rtTA3 – reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator

**S**DS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

SDS-PAGE – SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

TBS-T – *tris buffered saline* mit Tween20

TEMED – Tetramethylethyldiamin

TRE – *tetracyclin response element 2*

VSVG – *vesicular stomatitis virus G*

WB – Western Blot

WT – Wildtyp

ZO1 – Zonula occludens 1

µg – Mikrogramm

µl – Mikroliter

µM – Mikromolar

°C – Grad Celsius

# 1 Einleitung

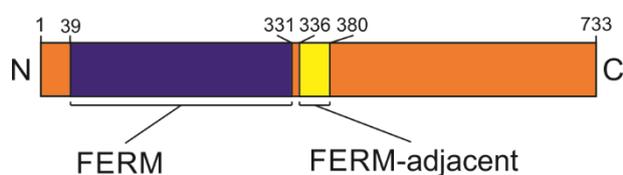
## 1.1 EPB4.1L5 als Schlüsselprotein epithelialer Morphogenese

EPB4.1L5 ist ein Protein, dem Funktionen bei der Genese von epithelialer Morphologie, den Erscheinungsformen epithelialer Zellverbände, zugeschrieben werden. Erwähnungen im Kontext von Aufbau und Erhalt der Polarität von Epithelien sowie der Koordination des Zytoskeletts und Zellkontakten (s. 1.1.1 und 1.1.2) stellen es in die Rolle eines zentralen Verbindungselements dieser verschiedenen Aufgabenfelder. Welche Funktion EPB4.1L5 übernimmt, scheint von den jeweils bindenden Interaktionspartnern sowie Zelltypen abzuhängen, die im Einzelfall vorliegen (97).

Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 (EPB4.1L5) ist ein Protein der EPB4.1-Familie und wird durch das gleichnamige Gen auf Chromosom 2q14 kodiert (47, 92).

Das Protein ist intrazellulär lokalisiert und als plasmamembranassoziiert beschrieben. Während der Embryonalentwicklung kommt es basolateral und im weiteren Verlauf zusätzlich apikal in Epithelzellen vor (22, 47).

EPB4.1L5 enthält, wie die gesamte Protein 4.1-Gruppe, eine sogenannte FERM-Domäne (s. Abbildung 1), die besagte funktionsbestimmende Interaktionen mit Zytoskelettkomponenten und Transmembranproteinen erlaubt (6, 11, 31, 53). Diese liegt nahe dem N'-Terminus des Proteins. C-terminal der FERM-Domäne ist die FERM-*adjacent*-Domäne zu finden, eine ebenfalls über mehrere FERM-Proteine hinweg konservierte Struktur, die vermutlich an der Regulation der FERM-vermittelten Interaktionen beteiligt ist (3, 92).



**Abbildung 1: Strukturschema von EPB4.1L5**

Gezeigt ist der schematische Aufbau von EPB4.1L5 mit FERM-*adjacent*- und FERM-Domäne. Als FERM-Domäne wird ein 298 Aminosäuren langer, 30kDa schwerer, konservierter Proteinabschnitt bezeichnet, der erstmals in der Superfamilie der 4.1 Proteine sowie bei Ezrin, Radixin und Moesin (FERM) beschrieben wurde und eine dreiblättrige Struktur aufweist (11, 32). Die FERM-*adjacent*-Domäne ist vermutlich an der Regulation FERM-vermittelter Interaktionen beteiligt (3).

Für die Erforschung von EPB4.1L5 werden zum einen humane Zellen genutzt. Aufgrund des Vorkommens von eng mit EPB4.1L5 verwandten Genen in der Maus, im Zebrafisch und *Drosophila melanogaster*, bieten sich diese Spezies als Modellorganismen an. In der Maus und im Zebrafisch (*Mosaic eyes* (Moe)) sind orthologe Gene zu EPB4.1L5 bekannt (33, 47). Das am nächsten verwandte Gen der Fruchtfliege trägt den Namen Yurt und stimmt N-terminal ebenfalls in großen Teilen mit der humanen Sequenz überein (45). Bei einer Übertragung von

Spezies-spezifischen Ergebnissen auf einen anderen Kontext müssen die Sequenzunterschiede jedoch beachtet werden.

Yurt und Moe sind je Orthologe für zwei bei den Säugetieren existierende Gene: zum einen EPB4.1L5 oder auch YMO1 (Yurt-Mosaic eyes-like 1), zum anderen EPB4.1L4B oder Ehm2 (Expressed in high metastatic cells 2), welches ein paraloges Gen zu EPB4.1L5 ist und mit diesem eine eigene Untergruppe innerhalb der FERM-Proteine bildet (3, 86).

Beim Menschen gibt es vier verschiedene Isoformen, von denen die Hauptisoform mit 733 Aminosäuren und 82kDa die längste und schwerste ist (26).

EPB4.1L5 ist in der embryonalen Maus unter anderem im zentralen Nervensystem, Herz- und Augenanlagen, insbesondere der Retina, sowie Niere und Lunge exprimiert (22).

### **1.1.1 EPB4.1L5 und Zellpolarität**

Als Zellpolarität bezeichnet man die Asymmetrie morphologischer Charakteristika und molekularer Bestandteile einer Zelle. Je nach Rolle des Zelltyps im Organismus, werden unterschiedliche Anforderungen an ihn gestellt, die jedoch fast immer eine Form von Polarität erfordern. Epitheliale Zellen etwa müssen ein Lumen abdichten, weshalb sie aus einer strikt voneinander getrennten apikalen und basolateralen Domäne bestehen. Diese unterscheiden sich stark in der Zusammensetzung ihrer Zellmembran voneinander. Sich fortbewegende Zellen wiederum bilden Fortsätze in Richtung der Bewegung aus während andere Teile der Zelle folgen. Einige Mechanismen werden im Organismus universell eingesetzt, um Polarität aufzubauen und zu erhalten (8).

Zu diesen zentralen Regulationselementen gehören die apikalen Proteinkomplexe Par3-Par6-atypische Proteinkinase C (aPKC) und Crb-Pals1-PATJ (Pals1-assoziiertes Tight Junction Protein, s. Abbildung 2) sowie die basolaterale Organisationseinheit Scribble-Discs Large-Lethal Giant Larvae (Scr-Dlg-Lgl), die den apikalen Komplexen antagonistisch gegenübersteht (2, 8, 54, 85). Während der Par-Komplex universell an der Ausbildung von Polarität beteiligt ist, sind der Crb- und Scribble-Komplex spezifischer für Epithelien (54, 71).

Grundsätzlich ist eine zeitlich-räumliche Koordination der Komplexe notwendig. Dies funktioniert zu einem großen Teil über die kleine Rho-GTPase Cdc42 (2, 8). Kleine GTPasen werden auch als „molekulare Schalter“ bezeichnet, da sie zwischen dem energiereichen Guanosintriophosphat (GTP)- und dem energiearmen Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand wechseln und so Signalübertragung „an- oder ausschalten“ können. Sie wiederum werden über GTP-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-Aktivierungsproteine (GAPs) reguliert (70, 71).

Im Rahmen eines Regulationsmechanismus zwischen den verschiedenen Polaritätskomplexen kann Crb beispielsweise über Pals1 Par6 rekrutieren. Par6 wiederum

kann durch aPKC und Cdc42-Aktivierung die Phosphorylierung von Par3 und Lgl bewirken, was zum Ausschluss dieser Proteine aus der apikalen Membrandomäne führt (71).

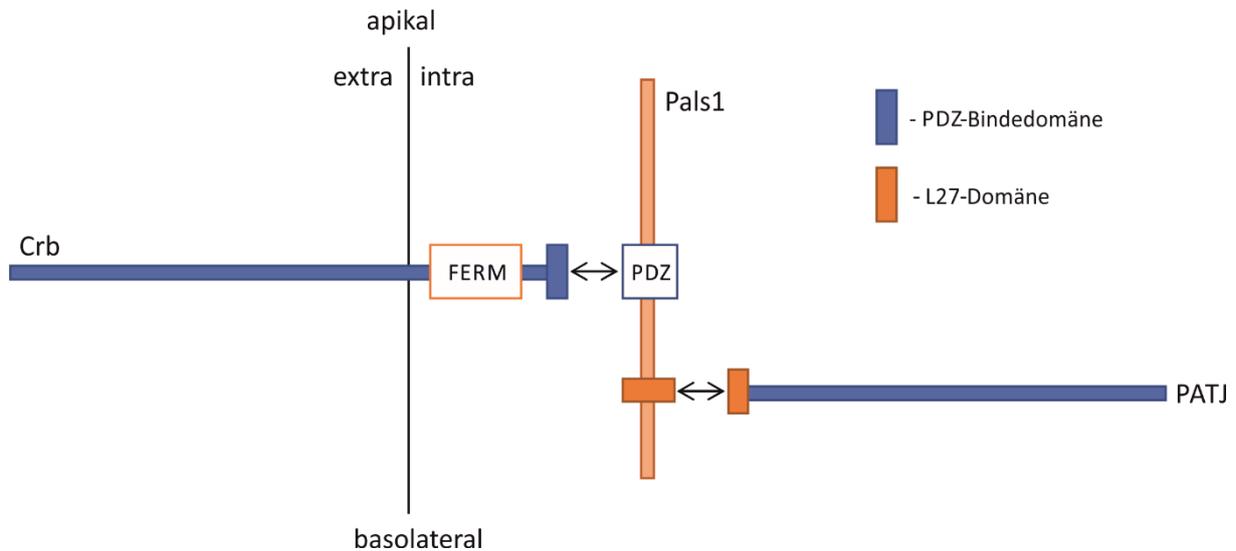
Neben diesen drei Komplexen spielen auch die Zellkontakte zu Nachbarzellen, wie die *Adherens Junctions* und die *Tight Junctions*, sowie zur extrazellulären Matrix (ECM), wie die Fokalen Adhäsionen (FAs), eine entscheidende Rolle für die Zellpolarität (1, 12, 48). Deren Bildung wird durch die Ausbildung der Polarität induziert und trägt dazu bei, die Orientierung der Zelle aufrechtzuerhalten. Die genauen Mechanismen, wie Polarität mit der Zellkontaktbildung zusammenhängt und wie welche Proteine wohin gelangen, ist häufig noch nicht genau bekannt (71).

*Tight Junctions* sind, zusammen mit den *Adherens Junctions*, subapikal lokalisiert und können aus vielen verschiedenen Proteinen, wie den Occludinen und Claudinen, bestehen. Intrazellulär sind Adapterproteine wie Zonula occludens 1 (ZO1) lokalisiert, die Kontakt zum Aktin-Zytoskelett herstellen. Ihre Hauptaufgaben sind, das Epithel nach basolateral hin abzudichten sowie als Barriere zwischen apikalen und basolateralen Membrankomponenten für die Aufrechterhaltung der epithelialen Polarität zu fungieren (1).

Auf eine Rolle von EPB4.1L5 bei der Regulation zellulärer Polarität deuteten zunächst Beobachtungen in KO-Tieren hin.

EPB4.1L5 wurde zuerst im Zebrafisch und in *Drosophila melanogaster* identifiziert, da Mutationen in dessen betreffendem Gen zu auffälligen, embryonal lethalen Phänotypen führten (32, 36, 40). Im Zebrafisch wurde unter anderem über ein perikardiales Ödem, Defekte der Hirnventrikel aber auch ein fehlerhaftes Pigmentepithel berichtet, in dem die *Tight Junction* Bildung gestört ist (33, 36, 37). In *Drosophila melanogaster* zeichnet sich der Phänotyp durch ein fehlendes dorsales Verschließen der Kutikula sowie eine Desorganisation der Polarität von Epithelien aus, die sich durch die Umverteilung typisch apikaler Proteine nach lateral bemerkbar macht (45, 46).

Zudem ähnelt der Phänotyp der Moe-defizienten Zebrafische sehr dem von Tieren, denen nok (Homo sapiens: Pals1) fehlt, also einem wichtigen Bestandteil des Crb-Polaritätskomplexes. Aufgrund dieser Ähnlichkeit wird ein Zusammenhang der beiden Proteine vermutet (37, 93). Pals1 ist als direkter Interaktionspartner von Crb Bestandteil des Crb-Pals1-Komplexes (s. Abbildung 2). Dieser ist, wie oben beschrieben, essenziell für die Ausbildung und Erhaltung epithelialer Polarität. Crb enthält eine FERM-Bindedomäne, die als mögliche Interaktionsstelle zu der FERM-Domäne von EPB4.1L5 fungieren könnte (22, 37, 94).



**Abbildung 2: Der Crb-Komplex**

Crb ist ein Transmembranprotein, das intrazellulär eine FERM-Bindedomäne aufweist. Es ist Teil des Crb-Komplexes, der hier schematisch dargestellt ist und beim Säugetier zudem aus Pals 1 und PATJ besteht. Er ist subapikal in Epithelzellen lokalisiert. Crb und Pals1 interagieren über PDZ-, Pals1 und PATJ über L27-Domänen.

Die beiden Proteine sind im Neuralrohr und der Niere von Mäusembryonen ko-exprimiert (22). Während Crb in Epithelzellen eindeutig apikal lokalisiert ist, verändert sich dies bei EPB4.1L5 im Laufe der Entwicklung, wie oben beschrieben, von ausschließlich basolateral hin zu basolateral und apikal (22, 59, 68). In Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen und Pulldown-Experimenten konnten Interaktionen zwischen EPB4.1L5 sowie allen Crb-Isoformen und Pals1 beschrieben werden, für die jeweils die FERM-Domäne zuständig ist (22, 45). Analog wurde die Interaktion auch für Moe und Yurt mit dem jeweiligen Crb-Ortholog nachgewiesen (33, 45).

Durch diese gefundenen Interaktionen von EPB4.1L5 mit Crb liegt die Vermutung der Beteiligung von EPB4.1L5 am Aufbau und Erhalt epithelialer Polarität nahe.

Die sich ändernde zelluläre Lokalisation von Yurt während der *Drosophila melanogaster*-Entwicklung, von basolateral hin zu zusätzlich apikal, könnte auf einen Wechsel der Aufgabe von Yurt bezüglich zellulärer Polarität hinweisen und damit dessen Rolle diesbezüglich konkretisieren (18). Anscheinend hat Yurt, durch Einfluss auf Crb, von seiner lateralen Position aus regulatorische Funktionen für die Ausbildung der gesamtzellulären Polarität (18, 45, 46). Nach Rekrutierung an die apikale Membran, wo es als Teil des Crb-Komplexes vorliegt (45), spielt Yurt vielmehr eine spezifische, lokale Rolle bei der Hemmung des apikalen Membranwachstums (18, 45, 46). Dies wurde auch für Moe im Zebrafisch beschrieben (33). Regulatorisch wichtig für die Lokalisation von Yurt ist die aPKC, die es als Substrat über die FERM-*adjacent*-Domäne bindet und phosphoryliert. Daraufhin löst sich Yurt von aPKC und verbleibt in der lateralen Membran. Die Phosphorylierung verhindert hierbei zu Beginn der Embryogenese, dass Yurt nach apikal wandert und dort zu diesem frühen Zeitpunkt einen

Defekt der Domäne verursacht (18). Die spätere, apikale Lokalisation geht mit einer Reduktion der Phosphorylierung einher (45).

Zudem wurde auch im Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Zellmodell eine negativ regulatorische Funktion von EPB4.1L5 auf die Ausbildung epithelialer Polarität beobachtet. Eine Überexpression führt zu einem desorganisierten Verteilungsmuster von *Tight Junction*-Markern. Darüber hinaus scheinen diese Zellen eine weniger dichte Barriere aufzubauen, wie entsprechende Assays zeigten (22). Ähnliches wurde auch über das EPB4.1L5-Ortholog Yurt in *Drosophila melanogaster* beschrieben (45).

Nicht nur die Überexpression (22), sondern auch die Depletion von EPB4.1L5 führt zu einer Veränderung der Zell-Zell-Kontakte. Diese äußert sich durch eine diskontinuierliche ZO1- und  $\beta$ -Catenin-Verteilung, was allerdings ebenfalls Hinweise auf eine gestörte *Tight* und *Adherens Junction*-Ausbildung gibt. Entgegen der Beobachtungen aus *Drosophila melanogaster* und Zebrafisch wurde hierbei ein Einfluss von EPB4.1L5 auf die Größe der apikalen Membran festgestellt, bei dem eine Hoch- statt eine Herunterregulation von Crb stattfindet (59). Das spricht gegen einen negativ-regulatorischen Einfluss auf diesen apikalen Membranregulator. Während für Yurt und Moe viele Hinweise dafürsprechen, dass sie eine Rolle bei der Zellpolarität spielen, ist diese für EPB4.1L5 jedoch nicht endgültig geklärt. Interessanterweise konnten bisher keine Polaritätsdefekte oder eine veränderte Crb-Verteilung in EPB4.1L5-mutierten Mausmodellen beobachtet werden (29, 47, 76).

### 1.1.2 EPB4.1L5 und Zelldynamik

Die Fähigkeit einer Zelle, sich verformen zu können, zu adhären und zu migrieren, erfordert ein komplexes Zusammenspiel von Zellkontakten zu ihrer Umgebung sowie dem Zytoskelett. Im Folgenden wird ein Überblick gegeben, der den Fokus auf für diese Arbeit relevante Aspekte legt.

Damit eine Zelle in ihrer Umgebung anhaften kann, benötigt sie spezialisierte Proteinkomplexe, die die Bestandteile der ECM wie Kollagene oder Laminine mit dem intrazellulären Zytoskelett verknüpfen. Ein wichtiger dieser Zell-Matrix-Kontakte sind die FAs. Diese Proteinkomplexe bestehen aus Transmembranproteinen, den Integrinen, sowie vielen Adapterproteinen, wie etwa Talin, Vinculin, Zyxin und Paxillin, die intrazellulär eine Verknüpfung mit dem Aktin-Zytoskelett herstellen (57).

FAs sind nicht nur an der Adhäsion beteiligt, sondern auch für die Vermittlung und Kommunikation von Signalen zwischen extra- und intrazellulärem Bereich verantwortlich (95). Zudem wird immer mehr darüber bekannt, dass sie zusätzlich für die Zellpolarität von Bedeutung sind (s. 1.1.1) (48).

Den Prozess des Ausbreitens und Adhärens von Zellen auf einer Oberfläche bezeichnet man als *spreading*. Nach einem Abflachen der Zelle durch die Schwerkraft binden Integrine

extrazelluläre Strukturen und sorgen daraufhin intrazellulär für eine Aktivierung von Rho-GTPasen. Diese sorgen für die Bildung und Bindung von zytoskelettalen Stressfasern sowie die Zusammensetzung der FA-Komponenten zu zunächst vorläufigen und später reifen FAs (41). Durch bisher nicht gänzlich verstandene Mechanismen bilden die Zellen in einem aktiven Prozess Fortsätze an Stellen der FAs aus, die durch F-Aktin-Polymerisierung radial auswachsen und zu neuer FA-Anhaftung führen. So ergibt sich das Bild der flachen, adhärenen Zelle mit Protrusionen (35).

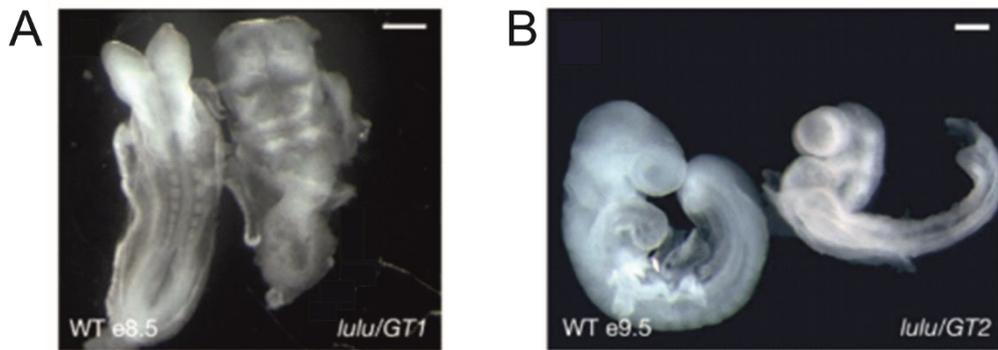
Befindet sich eine Zelle in einem Zellverband, bildet sie neben Zell-Matrix- auch Zell-Zell-Kontakte aus. Ein bekannter Vertreter sind die *Adherens Junctions*, die häufig auf dem Transmembranprotein Cadherin basieren und intrazellulär, neben etwa  $\beta$ -Catenin und p120catenin, ebenfalls mit dem Aktinzytoskelett verknüpft sind (9).

FAs und *Adherens Junctions* sind bei sessilen Zellen relativ stabil, während sie in sich fortbewegenden Zellen ständig ab- und wieder aufgebaut werden müssen. Zum koordinierten Lösen der Verbindungen der Zelle zu ihrer Umgebung ist eine Kommunikation unter den Zellkontakten nötig (29).

Bevor eine Zelle migrieren kann, muss festgelegt sein, in welche Richtung dies stattfindet. Das heißt, die Zelle muss polarisiert sein, was durch in 1.1.1 beschriebene Mechanismen geschehen kann.

Dabei schieben sich zunächst Lamellipodien, aktinreiche Zellfortsätze, vor, neue FAs entstehen und eine Aktomyosin-Kontraktion findet statt. Daraufhin bauen sich ältere FAs an der zurückliegenden Zellseite ab (13, 67, 80, 89).

Vor allem Beobachtungen an Mäuseembryonen mit EPB4.1L5-Nullallelen, die ebenfalls gravierende, während der Embryogenese letale Defekte zeigen (s. Abbildung 3) (20, 29, 47), gaben Hinweise auf eine Beteiligung von EPB4.1L5 an der Regulation von zellulären, dynamischen Prozessen. Auffällig ist die gestörte Gastrulation durch eine desorganisierte Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) sowie ein Aktin-Zytoskelett, was hochgradig fehlorganisiert ist (29, 47).



**Abbildung 3: Vergleich von EPB4.1L5-Wildtyp (WT) und -Nullallel Mäuseembryonen**

EPB4.1L5-KO Mäuseembryonen (lulu) am embryonalen Entwicklungstag (A) 8.5 und (B) 9.5. (modifiziert; nach Lee et al. (47)).

Maßstab 150 µm

Damit aus Ektoderm- Mesodermzellen werden können, ist das Lösen von Zell-Zell-Interaktionen, Cadherin-basierten *Adherens Junctions*, und die Stärkung von Integrin-basierten FAs nötig. Bei si-RNA-vermittelter EPB4.1L5-Unterdrückung bleibt die Modifikation der zellulären Proteinlevel von E-Cadherinen oder Integrinen in EMT-stimulierten Epithelzellen aus. In der sogenannten „displacement“-Theorie nimmt EPB4.1L5 post-transkriptionell Einfluss auf den Ablauf der EMT: EPB4.1L5 kann über seine FERM-Domäne an den E-Cadherin-Regulator p120catenin binden und das Cadherin so destabilisieren, während es durch C-terminale Bindung an das FA-Adapterprotein Paxillin wiederum dessen Bindung zum Integrin verstärkt (29).

Tatsächlich wurde gefunden, dass EPB4.1L5 in diversen, invasiven Tumorzellarten hoch exprimiert vorliegt. EPB4.1L5-Hochregulation scheint für invasives Wachstum, Metastasierung, aber auch erhöhte medikamentöse Resistenz in beispielsweise Brust- und Nierenkrebs von großer Relevanz zu sein, wofür zuvor beschriebene Prozesse verantwortlich sein können (25–27, 38, 62, 74).

Die Beobachtung, dass EPB4.1L5 neben Regulation von Zell-Zell- beziehungsweise Zell-ECM-Kontakten einen Einfluss auf die Organisation des Zytoskeletts haben könnte, wurde zusätzlich zu den KO-Embryonen auch im Zellmodell gemacht (59, 76). In EPB4.1L5-überexprimierenden Zellen findet sich eine apikale Konstriktion sowie laterale Elongation. Dies konnte auf die Aktivierung von Myosin-II durch EPB4.1L5 zurückgeführt werden, die hauptsächlich durch Rho-assoziierte-Kinasen (Rock)-vermittelte Phosphorylierung der Myosin-regulierenden Leichtketten (MRLC) abzulaufen scheint (59).

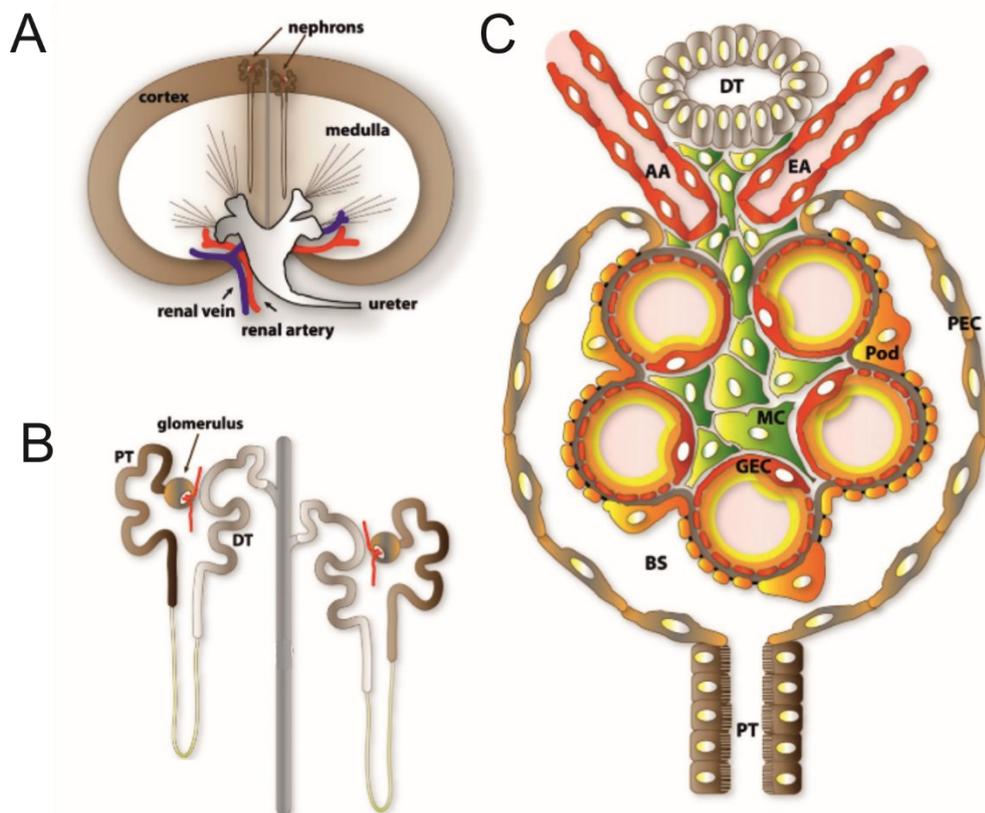
In einem Screen nach Podozyten-spezifischen Proteinen, die mit den FAs assoziiert sind, wurde EPB4.1L5 als besonders relevant und hoch exprimiert gefunden. KO-Podozyten weisen eine wesentlich geringere Dynamik als WT-Zellen auf und zeichnen sich durch ein desorganisiertes Aktin-Zytoskelett aus (76). Zudem zeigen EPB4.1L5-defiziente Zellen einen verzögerten Wundverschluss, schlechte Adhärens auf Fibronectin und eine verminderte

Motilität, wohingegen EPB4.1L5-überexprimierende Zellen vermehrt Protrusionen und Zellmembranausstülpungen ausbilden (29).

## 1.2 Bedeutung von EPB4.1L5 für glomeruläre Podozyten und Crb2 für die Nephrologie

Podozyten sind hochspezialisierte Epithelzellen und einer der Hauptbestandteile des Filtrationssystems der Niere.

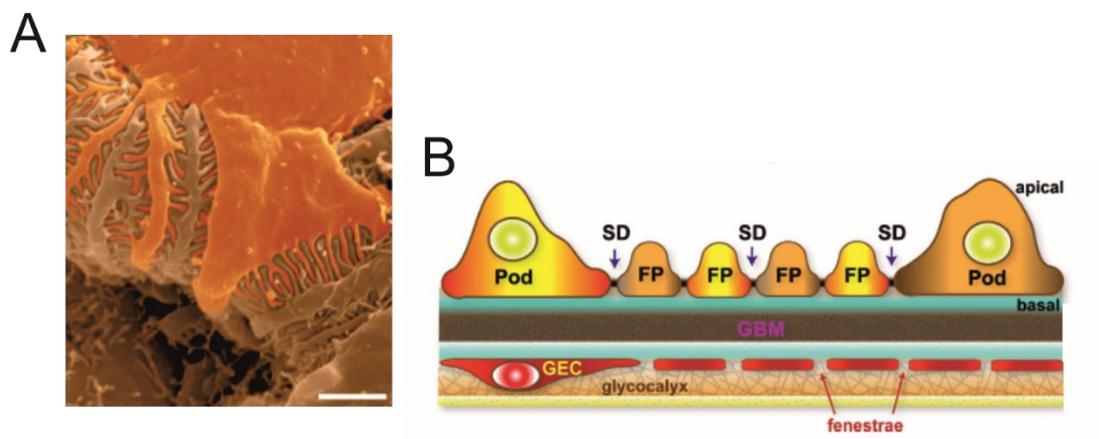
Die Niere besteht aus etwa 1-2,5 Millionen funktionellen Untereinheiten, den sogenannten Nephronen. Der Teil eines Nephrons, in dem das Blut in einem ersten Schritt filtriert wird, wird Corpusculum renale genannt und ist in der Nierenrinde lokalisiert. Teil dessen ist das Glomerulum mit seiner afferenten und efferenten Arteriole, umgeben von der Bowman'schen Kapsel. Das hier aufgefangene, filtrierte Blut wird Primärharn genannt und zur Modifikation und Konzentration in das Tubulussystem geleitet. Dort entsteht der sogenannte Sekundärharn, der letztendlich ausgeschieden wird (s. Abbildung 4) (79).



**Abbildung 4: Der Aufbau der Niere**

Die Abbildung aus Scott et al., 2015, (79) zeigt Schemata des Aufbaus (A) der Niere sowie (B) eines einzelnen Nephrons mit Tubulussystem bestehend unter anderem aus proximalem (PT) und distalem Tubulus (DT). (C) bildet ein Corpusculum renale mit afferenter (AA) und efferenter Arteriole (AE), Podozyten (Pod), Mesangiumzellen (MC), glomerulären (GEC) und parietalen Epithelzellen (PEC), Bowman'schem Raum (BS), DT und PT ab. Der Bowman'sche Raum fängt den an der GFB filtrierten Primärharn auf und leitet ihn in das Tubulussystem weiter, wo er zum Sekundärharn modifiziert wird.

Die Kapillarschlingen des Glomerulums sind von der GFB umgeben, die von dort ausgehend aus drei Schichten aufgebaut ist: dem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Podozyten (21). Wasser und darin gelöste Moleküle können die Barriere passieren, während Proteine und Zellen zurückgehalten werden. Die Podozyten sitzen der GBM auf und ummanteln die Kapillarschlingen, indem sie primäre, Mikrotubuli-basierte, und sekundäre, Aktin-basierte, Fußfortsätze ausbilden (81). Sie sind hochgradig spezialisiert, postmitotisch und weisen eine stark vergrößerte apikale Membran auf. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten können sich ineinander verzahnen, was man interdigitieren nennt (21). An den Zell-Zell-Kontakten zwischen den Fußfortsätzen benachbarter Podozyten wird die einzigartige Schlitzmembran gebildet, die sich durch spezifische Proteine wie etwa Nephrin und Podocin auszeichnet (s. Abbildung 5) (79).



**Abbildung 5: Der Podozyt**

Zu sehen sind die dem Kapillarknäuel aufsitzenden Podozyten (Pod), deren Fußfortsätze (FP) miteinander interdigitieren (A, 1  $\mu\text{m}$ ). Schematisch ist die Lokalisation der Schlitzmembran (SD) zwischen den FP der Podozyten dargestellt, die der GBM sowie den glomerulären Epithelzellen (GEC) aufsitzen und gemeinsam die GFB bilden (B) (modifiziert; nach Scott et Quaggin (79)).

Die Filterkapazität der Niere wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) angegeben und bezeichnet die Menge filtrierte Primärharns pro Zeit, die beim Erwachsenen durchschnittlich 180 l pro Tag beträgt. Der renale Blutfluss (RBF), also das Volumen, das die Niere pro Zeiteinheit durchfließt, beträgt in etwa 1,2 l pro Minute (90).

Die Strömung und die Volumina, der die GFB und somit die Podozyten ausgesetzt sind, sind dementsprechend groß – so auch die Anforderungen an den Aufbau einer intakten Schlitzmembran. Dies erfordert eine sehr stabile Adhärens der Podozyten über Zell-Zell-Kontakte, die hier als Schlitzmembran ausgeprägt sind, sowie insbesondere über Zell-Matrix-Kontakte zur GBM (51). Die Störungsanfälligkeit dieser Spezialisierungen zeigt sich im Rahmen von Nierenerkrankungen durch Proteinurie, dem Verlust von Proteinen in den Urin, und Glomerulosklerose, die häufig durch Podozytenablösung (*Foot process effacement*) von der GBM bedingt ist (21, 42, 82). Durch die speziellen Charakteristika dieser Zellen sind sie

insbesondere interessant bei der Betrachtung der zellbiologischen Rolle von EPB4.1L5 im Zusammenhang mit Crb2, der im Podozyten besonders hoch exprimierten Isoform von Crb (24).

### **1.2.1 EPB4.1L5 und seine Bedeutung für den Podozyten**

Die Expression von EPB4.1L5 in der Niere wurde für die Maus und den Zebrafisch beschrieben (22, 37). Zudem weisen EPB4.1L5-defiziente Zebrafische Ödeme auf, die auf die Relevanz von EPB4.1L5 für die Funktion der Niere hinweisen könnten (37).

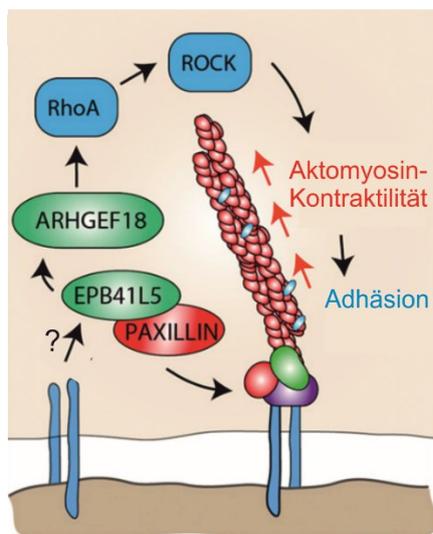
Da die Adhärenz von Podozyten an der GBM von großer Bedeutung für die physiologischen Abläufe der Niere ist (42, 51, 72), ist es zum besseren Verständnis von Nierenerkrankungen essenziell, deren molekularen Hintergrund zu begreifen. Da EPB4.1L5 in murinen Zellen per Massenspektrometrie-Screen als FA-assoziiertes, angereichertes Podozytenprotein entdeckt wurde, kann es diesbezüglich eine Schlüsselrolle einnehmen. mRNA-in-situ-Hybridisierung zeigt insbesondere an Tag E14.5 eine starke Anreicherung von EPB4.1L5 in der murinen Niere, die auf zellulärer Ebene basolateral, wie die FAs, lokalisiert ist. Zudem kann im Pull-down-Experiment eine direkte Interaktion mit Paxillin, einem FA-Adapterprotein, beobachtet werden (76).

Mäuse mit Podozyten-spezifischem KO von EPB4.1L5 weisen dilatierte Glomeruli, kongenitale Proteinurie sowie frühe Letalität auf. Die Fußfortsätze der Podozyten, die normalerweise von der Schlitzmembran getrennt werden, erscheinen hier verschmolzen. Sowohl bei Mäusen mit einem podozytenspezifischem KO von Geburt an als auch bei Mäusen mit einem induzierbaren KO vier Wochen nach Geburt kommt es zum Bild einer progressiven FSGS. Histologische Untersuchungen von Biopsien von Patienten mit dieser Erkrankung oder diabetischer Nephropathie zeigen, analog zu diesen Beobachtungen, ein verändertes Verteilungs- und Intensitätsverhalten von EPB4.1L5 in Podozyten (76).

Da FAs für die Zell-ECM-Interaktion zuständig sind, ist von Bedeutung, dass die Adhäsion und Fortbewegung von EPB4.1L5-KO-Podozyten gegenüber WT-Zellen aufgrund einer misregulierten Aktomyosin-Kontraktilität gestört ist. Der GEF ARGHEF18 ist als in Podozyten stark angereichert sowie als Interaktionspartner der EPB4.1L5-FERM-Domäne charakterisiert. In EPB4.1L5-KO-Podozyten liegt er vermindert vor und kann so nicht in vollem Ausmaß den Austausch von GDP zu neuem GTP katalysieren, der zur Aktivierung des Aktomyosin-Zytoskeletts notwendig ist. Grund könnte hierbei eine fehlende Rekrutierung von ARHGEF18 durch EPB4.1L5 zu den FAs sein, wo die Fortbewegung der Zelle initiiert wird. Analog ist auch der zelluläre Gehalt der GTPase RhoA in EPB4.1L5-mutierten Podozyten reduziert, die bekanntermaßen von ARHGEF18 beeinflusst wird und *downstream* des GEF für die Aktomyosin-Aktivierung zuständig ist (s. Abbildung 6) (76).

Weiterhin wurde eine durch EPB4.1L5 vermittelte Signalübermittlung bezüglich der Zusammensetzung der ECM identifiziert. So scheint EPB4.1L5 insbesondere für die korrekte Adhäsion und Fortbewegung auf Kollagen-IV von Bedeutung zu sein. Die Integrine, die die Bindung zwischen Kollagen und intrazellulärem Zytoskelett vermitteln, sind in EPB4.1L5-defizienten Podozyten-FAs in verminderter Menge vorliegend (76).

Durch die Rolle der Podozyten im Organismus werden gerade solche Anforderungen an sie gestellt, die EPB4.1L5, mit seinen bisher ihm zugeschriebenen Funktionen, für diesen Zelltyp besonders interessant machen.



**Abbildung 6: EPB4.1L5 als Regulator der Aktomyosin-Kontraktilität**

EPB4.1L5 ist in Podozyten-FAs hoch angereichert und interagiert mit dem FA-Adapterprotein Paxillin sowie dem GEF ARHGEF18. Dieser könnte EPB4.1L5-abhängig rekrutiert werden, um von der GTPase RhoA dephosphoryliertes GTP auszutauschen. Das ist für die Aktomyosin-Aktivierung essenziell. Möglich ist zudem eine Rolle von EPB4.1L5 bei der Kollagen-IV-vermittelten Adhäsion, dessen Mechanismus bisher nicht verstanden ist (76). (modifiziert; nach Schell et Huber (75))

### 1.2.2 Crb2 und seine Bedeutung für die Nephrologie

Die Crb-Familie wurde erstmals in *Drosophila melanogaster* beschrieben, wobei ein KO von Crb zum Phänotyp einer „krümeligen“ (engl.: *crumbly*) Kutikula führte und dem Gen und Protein seinen Namen gab (40, 87). Im Säugersystem gibt es hingegen drei homologe Crb Proteine (Crb1, Crb2, Crb3). Crb2 wird unter anderem im Gehirn, in der Retina und in der Niere (34), jedoch besonders stark im Podozyten exprimiert und ist daher im Fokus dieser Arbeit (24).

Wie in 1.1.1 beschrieben, ist Crb Bestandteil des sogenannten Crb-Komplexes (s. Abbildung 2), der zudem aus den Proteinen Pals1 und PATJ besteht, subapikal lokalisiert ist und neben dem Par- und Scribble-Komplex eine wichtige Rolle beim Aufbau und Erhalt der epithelialen Polarität spielt (2, 7, 88).

Crb-Proteine sind Transmembranproteine mit einer kurzen, hochkonservierten intrazellulären (40 Aminosäuren), einer Transmembrandomäne sowie, im Fall von Crb2, großen

extrazellulären Domäne (1245 Aminosäuren) (34). Während der intrazellulären Domäne Funktionen bei der Bindung von Interaktionsproteinen sowie bei zellulären Signalwegen zugeschrieben werden, ist die extrazelluläre Domäne zur Ausbildung homophiler Interaktionen imstande (7, 24, 65, 83, 88).

Crb2-KO in Mäusen führt zu embryonaler Letalität, was, ähnlich wie bei EPB4.1L5-KO-Tieren, auf eine gestörte EMT zurückgeführt wird (69, 96). Zugrundeliegend ist wohl auch hier ein fehlendes Lösen von Adherens Junctions (69). Zudem kommt es beim KO in Maus, Zebrafisch und *Drosophila melanogaster* zur Ablösung der Fußfortsätze beziehungsweise Auflösung der Schlitzmembran in den Nephrozyten (16, 24, 30, 58). Dies deutet auf die Relevanz von Crb2 für die physiologischen Funktionen der Podozyten hin (15, 16).

Darüber hinaus wurden bei Patienten mit einem Steroid-resistentem nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ verschiedene Crb2-Mutationen festgestellt (15, 44, 83, 84). Diese glomeruläre Erkrankung kommt bei Mutationen im Nephrin-Gen vor, das als Hauptbestandteil der Schlitzmembran bekannt ist, und äußert sich durch Ödeme und massive Proteinurie bereits im Uterus (4, 84).

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

Der derzeitige Forschungsstand zu EPB4.1L5 lässt weiterhin viele Fragen über dessen zellbiologische Funktionen und Aufgaben zu - im Speziellen für die Biologie des Podozyten. Ziel dieser Arbeit ist daher, stabile und transiente Zellsysteme zu generieren, die eine induzierbare Überexpression von EPB4.1L5 allein oder gemeinsam mit Crb2 erlauben und als Werkzeug zur Untersuchung zellbiologischer Fragestellungen verwendet werden können. Genutzt wird die Standardzelllinie *Human Embryonic Kidney 293T* (HEK293T), die sich durch ihr einfaches Handling gut für die erste Etablierung von Experimenten eignet, während die Verwendung der immortalisierten humanen Podozyten-Zelllinie AB8 ein besonderes Augenmerk auf die Bedeutung von EPB4.1L5 für diese hochspezialisierten Nierenzellen erlaubt.

Eine Fluoreszenzmarkierung von EPB4.1L5 und Crb2 soll die Echtzeit-Beobachtung in lebendigen Zellen ermöglichen. Ziel ist zudem, die generierten Zelllinien mittels WB und Immunfluoreszenz (IF)-Färbungen auf Regulationen hinsichtlich relevanter Proteine aus zellulären Signalwegen sowie Zell-ECM- und Zell-Zell-Kontakten zu untersuchen.

Die Zusammenhänge der verschiedenen, bekannten Funktionen von EPB4.1L5 und Crb2 zu begreifen, wäre für das zellbiologische Verständnis von großer Bedeutung. Durch die Charakterisierung von EPB4.1L5 als podozytenspezifische FA-Komponente sowie Crb2 als wichtigen Faktor zum Erhalt der Schlitzmembran in der Maus stellt die Beziehung dieser beiden Proteine eine wichtige Schnittstelle zum Verständnis insbesondere nephrologischer Vorgänge dar (24, 58, 76). Die unvollständig geklärte Funktionsweise der Podozyten, gerade

hinsichtlich des Aufbaus der glomerulären Filtrationsbarriere, bedarf weiterer Aufklärung, da podozytenspezifische Defekte bei nephrologischen Krankheitsbildern von entscheidender Bedeutung sind. Der Frage, ob EPB4.1L5 eine Verknüpfung zwischen den zentralen, für den Podozyten funktionserhaltenden Anforderungen Adhäsion, Polarität und Schlitzmembranaufbau darstellen kann, soll daher in dieser Arbeit nachgegangen werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Analysenwaagen	Scout™ Pro, Explorer® Pro	Ohaus, New Jersey, USA
Autoklaven	Varioklav	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim
Brutschrank (Bakterien)	Systec VX-75 B5050	Systec GmbH, Linden Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Gasprofi 1 SCS micro	WDL-Tec, Göttingen
Eismaschine	Ziegra ZBE 70-35	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Elektrophoresekammer (SDS-PAGE)	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	Model B1	PEQLAB Biotechnologies GmbH, Erlangen
Filmentwickler	Optimax X-Ray Film Processor	Protec GmbH & Co KG, Oberstenfeld
Geldokumentations-systeme	Lumi-Imager F1 FluorChem® FC2	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Cell Biosciences, Inc., Santa Clara, USA
Magnetrührer	Combimag RCT	IKA® Werke GmbH & Co KG, Staufen
Mikroskop	Observer Z1, Apotome, HXP120, Axiocam MRm	Zeiss AG, Jena
<i>polymerase chain reaction</i> (PCR)-Cycler	Biometra TRIO Kombi	Analytik Jena AG, Jena
pH-Meter	Consort C864	Consort bvba, Turnhout, Belgien
Photometer	Smart Spec™ 3000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reinstwasseranlage (für ddH <sub>2</sub> O)	Ultra Clear	SG Wasseraufbereitung & Regenerierstation GmbH, Barsbüttel
Schüttelinkubator	Certomat® IS Innova® 40	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen Eppendorf AG, Hamburg
Sicherheitswerkbänke (Zellkultur)	HERAsafe BIOWIZARD Silver Line	Heraeus, Hanau Kojair Tech oy, Vilpulla, Finnland
Spannungsquellen	Power Pac HC™, Power Pac Universal Standard Power Pack P25	Bio-Rad Laboratories GmbH, München Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer Tischzentrifuge	Thermomixer comfort Micro Centrifuge ProFuge	Eppendorf AG, Hamburg Agilent Technologies Inc., Santa Clara

	MiniStar Silverline	VWR International GmbH, Darmstadt
Ultraschallbad	SONOREX TK30	Bandelin, Berlin
UV-Transilluminator	IL-200-M	H. Saur Laborbedarf, Reutlingen
Vakuumpumpe	VP 86	VWR International GmbH, Darmstadt
Vortexer	VortexGenie	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Western Blot Imager	Azure c600	Azure Biosystem Inc., Dublin, CA, USA
Western Blot Kammer	Semidry Transfercell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Whatman Fastblot B34	Biometra GmbH, Göttingen
Zellkultur-Inkubator	Heracell 240	Heraeus, Hanau
	MCO-20AIC	Sanyo Electric Co., Ltd., Japan
Zentrifugen	Mikro 22 R	Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
	Multifuge 3S-R	Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5430R	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Laborbedarf

Tabelle 2: Allgemeiner Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA <i>ladder</i>	Promega GmbH, Mannheim
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
6 x Blue Orange Loading Dye Solution (Laufpuffer)	Promega GmbH, Mannheim
Clarity Western ECL Substrate/ Clarity Max Western ECL <i>Substrate</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Deckgläschen	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
DMEM	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
dNTPs	Promega GmbH, Mannheim
ECL-X-Ray Filme	Fuji Foto Film GmbH, Düsseldorf
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Flexi-Strip Schaber	GEPE-BiWeX N.V., Breda, Niederlande
Handschuhe (Latex/Nitril)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1 piperazino]- ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Hoechst 33342 nucleic acid stain	Thermo Fisher Scientific
Ibidi $\mu$ -Dish 35mm, high Glasboden	Ibidi GmbH, Martinsried
Kanülen (Safety 0,9 x 0,38 mm)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kälberserum mit Eisenzusatz (Cs/Fe)	Cell Concepts GmbH, Umkirch
Kryo-Röhrchen	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Kulturröhrchen, Bakterien	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lumi-Light®/ Lumi-Light®PLUS	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
LysoTracker® Deep Red	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Natriumpyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Objektträger	VWR International GmbH, Darmstadt
Oligo-dT Primer	Promega GmbH, Mannheim
Page Ruler™ Plus Prestained Protein ladder	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS), 1x, steril	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PCR-Reaktionsgefäße (8er Streifen)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Petrischalen für Mikrobiologie	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikwaren für die Zellkultur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polyvenyldifluorid (PVDF)-Immobilon Membran (0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2+3	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Reaktionsgefäße 0,5-2,0 ml	Eppendorf, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Skalpell	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit <i>supplement</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore GmbH, Schwalbach
Stripetten	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, NL
Superfrost Plus-Menzel Gläser-Objektträger	Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Trypsin EDTA (10x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Wasser, RNase frei	B. Braun GmbH, Melsungen
Western Blotting Papier	Whatman Schleicher & Schüll GmbH, Dassen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

## 2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
2-Propanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
30% Acrylamidlösung (Rotiphorese Gel 30)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampicillin (Amp)	AppliChem GmbH, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
D (+) Glukosemonohydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
D (+) Saccharose	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Doxycyclin (Dox) hyclate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10mg/ml)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Gelatine	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Glycerin (Glycerol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Hepes	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycinsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
LB-Broth (für LB-Medium)	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Milchpulver	Ferma- Granovita GmbH, Heimertingen
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdiphosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Normal goat serum</i> (NGS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Puromycindihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Salzsäure (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt

## 2.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
0,25 M CaCl <sub>2</sub>	10,8 g CaCl <sub>2</sub> ad 160 ml H <sub>2</sub> O lösen, steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C
10x PBS	0,038 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,162 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 M NaCl ad H <sub>2</sub> O; pH 7,4
1 M Tris/HCl, pH von 6,8 - 8,8	121,14 g Tris in 1 l H <sub>2</sub> O, Einstellen des pH-Wertes mit konz. HCl
<i>2x hepes buffered saline solution</i> (HEBS)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 12 mM Glukose ad H <sub>2</sub> O; pH 7,05
Antikörperlösung für IF	98 % (v/v) Waschpuffer IF 2 % (v/v) <i>normal goat serum</i> (NGS)
<i>Blocking</i> Lösung für IF	90 % (v/v) Waschpuffer IF 10 % (v/v) <i>normal goat serum</i> (NGS)

IP-Puffer	20 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4) 20 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM NaF 15 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 1 % (v/v) Triton X-100 ad H <sub>2</sub> O
Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris 0,05 % (w/v) SDS 0,2 M Glycin ad H <sub>2</sub> O
LB-Medium Platten mit Amp, mit Kanamycin (Kana)	20 g/l LB-Broth, ad ddH <sub>2</sub> O + 20 g/l Agar autoklavieren + 1 ml/l Ampicillin + 350 µl/l Kanamycin
Permeabilisierungslösung (IF)	10 % (v/v) 10x PBS 0,2 % (v/v) Triton X-100 ad H <sub>2</sub> O
Ponceau S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau S 3 % Essigsäure ad H <sub>2</sub> O
Probenpuffer nach Laemmli (SDS)	20 % (v/v) Glycerol 125 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % (w/v) SDS 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 5 % β-Mercaptoethanol ad H <sub>2</sub> O
Supplements als Zusatz für die Zellkultur (je 4 ml Portionen für 500mL RPMI)	0,5 ml nicht-essentielle Aminosäuren 0,5 ml Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit (10 mg/ml) 0,5 ml Natriumpyruvat (100mM) 2,5 ml Hepes (1 M)
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl 1 mM EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz 40 mM Essigsäure ad H <sub>2</sub> O; pH 8,2
TBS-T	10 mM Tris-HCl (Stammlösung 1 M, pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 ad 1 l H <sub>2</sub> O
Transferpuffer (WB)	25 mM Tris (Stammlösung 1M, pH 8,3) 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol ad H <sub>2</sub> O
Waschpuffer IF	10 % (v/v) 10x PBS 0,2 % (w/v) Gelatine 0,2 % (v/v) Triton X-100 ad H <sub>2</sub> O

## 2.5 Reagenziensysteme und Kits

Tabelle 5: Kommerzielle Reagenziensysteme/ Kits

Bezeichnung	Hersteller
Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Plasmid Minipräparation)	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
MidiPräp Kit	Qiagen GmbH, Hilden

PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep (Plasmid Maxipräparation)	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Agarose-Gelaufreinigung)	Zymo Research Corporation, Irvine, USA
Grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Trap	Chromotek

## 2.6 Enzyme

Tabelle 6: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Accuprime™ Pfx DNA Polymerase und Puffer	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Antarctic Phosphatase und Puffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Restriktionsendonukleasen, Puffer und BSA	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., Promega GmbH, Mannheim
T4 DNA Ligase und Puffer	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gateway® LR Clonase™ enzyme mix	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden

## 2.7 Antikörper

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Primäre Antikörper gegen Zielprotein	Spezies	Hersteller	Eingesetzte Verdünnung
Paxillin	Maus	BD	IF: 1:100 WB: 1:1000
ZO1	Maus	Invitrogen	IF: 1:50
Zyxin	Maus	Synaptic Systems	IF: 1:100 WB: 1:1000
Talin	Ziege	Santa Cruz	WB: 1:1000
Vinculin	Maus	Santa Cruz	WB: 1:1000
β-Tubulin	Maus	Sigma	WB: 1:1500
EPB4.1L5	Maus	Santa Cruz	WB: 1:1000
	Kaninchen	Atlas	WB: 1:1000
p-β-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
β-Catenin	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p-GSK3 α/β	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
GSK3 α	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p-mTOR	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
mTOR	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p-p70S6K	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p70S6K	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p-S6 ribosomal protein	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
S6 ribosomal protein	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
α-Actinin 4	Kaninchen	Alexis/Enzo	WB: 1:750
p-LATS 1	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
LATS 1	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
p-YAP	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
YAP	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
TAZ	Kaninchen	Santa Cruz	WB: 1:1000
p-AKT	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
AKT	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000

p-ERK 1/2	Kaninchen	Santa Cruz	WB: 1:1000
ERK	Kaninchen	Cell Signaling	WB: 1:1000
Crb2	Kaninchen	ThermoFisher	WB: 1:1000
GFP	Maus	Clontech	WB: 1:1000
Pals1	Kaninchen	ProteinTech	WB: 1:1000

**Tabelle 8: Sekundäre und alexakonjugierte Antikörper und Zellgifte**

<b>Sekundäre Antikörper gegen Zielprotein</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
Alexa Fluor® 488 konjugiertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Huhn	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:1000
Alexa Fluor® 488 konjugiertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:1000
Alexa Fluor® 488 konjugiertes $\alpha$ -Maus IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:1000
Alexa Fluor® 488 konjugiertes $\alpha$ -Meerschweinchen IgG	Esel	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:1000
Alexa Fluor® 594 konjugiertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Fluor® 594 konjugiertes $\alpha$ -Maus IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Alexa Fluor® 594 konjugiertes $\alpha$ -Ziege IgG	Esel	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Alexa Fluor® 647 konjugiertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Alexa Fluor® 647 konjugiertes $\alpha$ -Maus IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Alexa Fluor® 647 konjugiertes $\alpha$ -Meerschweinchen IgG	Esel	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
Alexa Fluor® 647 konjugiertes $\alpha$ -Meerschweinchen IgG	Ziege	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:500
DAPI	-	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt	IF: 1:5000
HRP konjugiertes $\alpha$ -Kaninchen IgG	Ziege	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Suffolk, England	WB: 1:2000

HRP konjugiertes $\alpha$ -Maus IgG	Ziege	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Suffolk, England	WB: 1:2000
HRP konjugiertes $\alpha$ -Meerschweinchen IgG	Ziege	Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Suffolk, England	WB: 1:2000

## 2.8 Primer

Tabelle 9: Klonierungsprimer

Primername	Sequenz (5'-3')	Verwendung
MluI-RFP_fwd	TTTACGCGTCACCATGGC CTCCTCCGAGGACGTCAT C	Amplifikation der DNA-Sequenz des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) mit dem Vektor pRFP L-Plastin als Template
MCS-Pacl-RFP_rev_woSTOP	TTAATTAAGCTTGGATC CCTCGAGGAATTCGGCG CGCCCGGCGCCGGTGGA GTGGCGGCCCTCGGC	Amplifikation der RFP-DNA mit dem Vektor pRFP L-Plastin als Template
hEPB4.1L5_Asc_XhoI_fwd	CACCGGGCGCGCCCTCG AGATGCTGAGTTTCTTCC G	Amplifikation der EPB4.1L5-DNA mit dem Vektor pCMV-Sport6 EPB4.1L5 als Template
hEPB4.1L5_Pac_wSTOP_rev	TCTTAATTAATCAGAGCTC AGTGGTCAGTAAACTT CTGC	Amplifikation der EPB4.1L5-DNA mit Stopcodon mit dem Vektor pCMV-Sport6 EPB4.1L5 als Template

Tabelle 10: Sequenzierungsprimer

Primername	Sequenz (5'-3')	Verwendung
MluI-RFP_fwd	TTTACGCGTCACCATGGC CTCCTCCGAGGACGTCAT C	Sequenzierung von pRFP EPB4.1L5 fwd Sequenzierung von pENTR RFP EPB4.1L5 fwd Sequenzierung von pENTR RFP fwd Sequenzierung von plnd RFP EPB4.1L5 fwd
EGFP-C-rev	AGCTGCAATAACAAGTT	Sequenzierung von pRFP EPB4.1L5 rev
M13r	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenzierung von pENTR RFP EPB4.1L5 rev
mRFPseq_rev	GCCCTCGCCCTCGCCCT C	Sequenzierung von pENTR RFP rev Sequenzierung von plnd RFP EPB4.1L5 rev
hEPB4.1L5_seq1rev	CTGATCAAACAACCTTTG TCC	Sequenzierung von plnd RFP EPB4.1L5 rev

## 2.9 Plasmide

Tabelle 11: Plasmide

Plasmidname	Beschreibung/Eigenschaften	Herstellerreferenzen
pCMV-Sport6 EPB4.1L5	Expressionsplasmid	Dharmacon
pRFP L-Plastin	Überexpressionsvektor für N-terminales RFP-getaggtetes L-Plastin (PLS3); Kana	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster
pRFP EPB4.1L5	Überexpressionsvektor für N-terminales RFP-getaggtetes EPB4.1L5; Kana	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pDONOR211 syCrb2+SNAP	<i>Entry</i> -Vektor mit SNAP-markierter syCrb2-DNA	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster, Invitrogen
pENTR RFP	<i>Entry</i> -Vektor mit RFP-DNA	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pENTR RFP EPB4.1L5	<i>Entry</i> -Vektor mit RFP-markierter EPB4.1L5-DNA	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pInducer21-Puro RFP EPB4.1L5	Destination-Vektor des Gateway® -Klonierungen Systems, Dox-induzierbarer Vektor mit Puromycin-Resistenzgen zur Herstellung stabiler, induzierbarer N-terminal RFP-markiertes EPB4.1L5 exprimierender Zelllinien; Amp	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
pInducer21-Puro hCrb2 GFP WT	Destination-Vektor des Gateway® -Klonierungssystem, Dox-induzierbarer Vektor mit Puromycin-Resistenzgen zur Herstellung stabiler, induzierbarer zentral GFP-markiertes Crb2 exprimierender Zelllinien; Amp	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster
pInducer21-Puro hCrb2 GFP ΔICD	Destination-Vektor des Gateway® -Klonierungssystem, Dox-induzierbarer Vektor mit Puromycin-Resistenzgen zur Herstellung stabiler, induzierbarer zentral GFP-markierter Δintrazelluläre Domäne (ICD) Crb2 exprimierender Zelllinien; Amp	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster
psPAX2	packaging Plasmid zur Produktion von Lentiviren, kodiert für virale Strukturgene; Amp	Didier Trono (Addgene plasmid #12260)

pMD2- vesicular stomatitis virus G (VSVG)	envelope Plasmid zur Produktion von Lentiviren, exprimiert Hüll-Glykoprotein des VSVG; Amp	Didier Trono (Addgene plasmid #12259)
---	--	---------------------------------------

## 2.10 Organismen

### 2.10.1 Bakterienstämme

Tabelle 12: Verwendeter kompetenter Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escheria coli</i> DH10B ( <i>E. coli</i> )	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15Δlac X74recA1endA1araD139Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ-rpsL nupG/pMON14272/pMON7124	Invitrogen Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.10.2 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 13: Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
HEK293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen ( <i>Human Embryonic Kidney</i> )	ATCC® CRL-1573™
HEK293T pInducer21-Puro RFP EPB4.1L5	stabile HEK293T-Zellen, die unter Dox-Induktion RFP-EPB4.1L5 überexprimieren	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
HEK293T pInducer21-Puro RFP EPB4.1L5 hCrb2 GFP	stabile HEK293T-Zellen, die unter Dox-Induktion RFP-EPB4.1L5-humanes Crb2 (hCrb2)-GFP überexprimieren	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
HEK293T ΔPals1	stabile HEK293T-Zellen, die einen Pals1- <i>knockdown</i> vorweisen	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster
HEK293T pInducer21-Puro hCrb2 GFP	stabile HEK293T-Zellen, die unter Dox-Induktion Crb2-GFP überexprimieren	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster
AB8	Immortalisierte humane Podozytenzellen	Prof. Dr. Moin Saleem Royal Hospital for Children, Bristol, UK (Saleem et al. 2002)
AB8 pInducer21-Puro RFP EPB4.1L5	stabile AB8-Zellen, die unter Dox-Induktion RFP-EPB4.1L5 überexprimieren	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
AB8 pInducer21-Puro RFP EPB4.1L5 hCrb2 GFP	stabile AB8-Zellen, die unter Dox-Induktion RFP-EPB4.1L5-Crb2-GFP überexprimieren	hergestellt im Rahmen dieser Arbeit
HEK293T pInducer21-Puro hCrb2 GFP	stabile AB8-Zellen, die unter Dox-Induktion Crb2-GFP überexprimieren	AG Pavenstädt Universitätsklinikum Münster

Tabelle 14: Kultivierungsbedingungen der Zelllinien

Zelllinie	Bedingungen	Medium
HEK293T	37°C, 5% CO <sub>2</sub>	DMEM 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin
AB8 humane Podozyten	33°C, 5% CO <sub>2</sub>	RPMI 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin 1% <i>supplements</i>

## 2.11 Software, Datenbanken und Suchmaschinen

Tabelle 15: Verwendete Software, Datenbanken und Suchmaschinen

Programmname	Hersteller	Verwendung
AlignX	Invitrogen Corporation	Sequenzierungs-Alignment
BLAST ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )	NCBI ( <i>National Center for Biotechnology Information</i> )	Sequenz-Alignment
CorelDRAW Graphics Suite X6	Corel Corporation© 2012	Graphiken erstellen
FIJI	Wayne Rasband (NIH)	Bildbearbeitung; Auswertung WB und Live Imaging/ Zellfläche
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation©, Redmond, USA	Word, Excel, PowerPoint
MultAlin	F. CORPET, 1988, Nucl. Acids Res.	Vergleich von Aminosäuresequenzen
PubMed ( <i>U.S. National Library of Medicine/ National Institutes of Health</i> )	NCBI, Bethesda MD, USA	Paper Datenbank
Reverse Complement	Paul Stothard, 2000	Vorbereitung für das Sequenz-Alignment
Universal Protein Resource	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>	Nukleotid-/Proteinsequenzen
SnapGene	GSL Biotech LLC	Erstellen von Vektorkarten, Alignment sowie Simulation von Restriktionsverdaus
ZENBlue	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH, Jena	Aufnahme und Bearbeitung von Mikroskopiebildern
WB Imager Programm	Azure Biosystems	Azure c600
Gel Elektrophorese Bilder (Lumi Analyst 3.1)	Innotech	FluorChem FC2

### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden der Molekularbiologie

##### 3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur Amplifikation von DNA-Abschnitten. Sie startet mit der Denaturierung des DNA-Doppelstrangs bei 95°C, wonach sich die zugegebenen spezifischen Primer an die komplementären Sequenzen der nun einzeln vorliegenden DNA-Stränge anlagern können. Dies erfolgt in der Phase der Primärhybridisierung (*Annealing*), das je nach Länge und Basenzusammensetzung der Primer bei 55-65°C stattfindet. Anschließend folgt die Elongation, also die Verlängerung der Primersequenz, komplementär zum vorliegenden Einzelstrang. Dies wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert, die ausgehend vom 3'-OH-Ende anfangs zugegebene Nukleotide über Phosphodiesterbindungen an den bestehenden Strang knüpft. In dieser Arbeit wurde die Accuprime™ Pfx DNA-Polymerase genutzt, die ihr Temperaturoptimum bei 68°C hat und eine 3'-5' *proofreading*-Funktion vorweist. Sie arbeitet mit einer Geschwindigkeit von einer Minute pro 1000 Basenpaare Elongation.

Die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Elongation werden zyklisch wiederholt, um eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz zu erreichen.

Eine Übersicht über das Temperaturprofil mit jeweiliger Dauer ist in Tabelle 16 zu finden.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Vervielfältigung der RFP- sowie EPB4.1L5-Sequenz genutzt, die als Template bereits in weiteren in der AG Pavenstädt vorhandenen Plasmiden vorlagen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 16: Thermoprofil einer PCR mit der Accuprime™ Pfx DNA-Polymerase

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	2 Minuten	1
Denaturierung	95°C	15 Sekunden	} 35
Annealing	55-64°C	30 Sekunden	
Elongation	68°C	1 Minute pro kb	
Finale Elongation	68°C	10 Minuten	1

Tabelle 17: Reaktionsansatz einer PCR zur Genamplifikation

Komponenten	Volumen
DNA	2 µl
Primer fwd (10 µM)	1 µl
Primer rev (10 µM)	1 µl

Accuprime™ Reaktion Mix Puffer (10x) mit dNTPs	5 µl
Accuprime™ Pfx Polymerase	0,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	40,5 µl

### 3.1.2 Klonierung von DNA

Als Klonierung bezeichnet man die identische Vervielfältigung von DNA-Sequenzen in Bakterien. Es ermöglicht das Einbringen und Kombinieren von DNA-Sequenzen in Plasmiden z.B. über passende Restriktionsenzymststellen. Bei der Ligation wird nach Anlagerung von Plasmid und Insert eine kovalente Bindung der Schnittstellen durch das Enzym Ligase katalysiert. Anschließend erfolgt die Transformation in *E. coli*.

#### 3.1.2.1 Restriktionsenzymverdau der DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die an für sie charakteristischen DNA-Erkennungssequenzen DNA in entweder *blunt* oder *sticky ends* schneiden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich letztere verwendet. Für den Restriktionsverdau des Vektors und des DNA-Inserts müssen solche Enzyme genutzt werden, die an zueinander passenden Erkennungssequenzen schneiden. So entstehen an diesen Stellen überhängende Enden einzelsträngiger DNA, die sich mit der jeweils komplementären überhängenden DNA-Sequenz des Vektors oder Inserts zusammenlagern können.

Der Ansatz eines Restriktionsverdaus ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Ansatz für den Restriktionsverdau

Komponente	Volumen
DNA	1,5 µg
Enzyme	je 1 µl
Puffer	3 µl
H <sub>2</sub> O	ad 30 µl

#### 3.1.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wird verwendet, um DNA-Fragmente unter Anlegen von Spannung ihrer Größe und somit ihres Gewichts nach aufzutrennen.

Aufgrund ihrer nativen negativen Ladung wandern die Desoxyribonukleinsäuren bei Anlegen einer elektrischen Spannung zur positiven Anode. Durch den Gehalt des Polysaccharids

Agarose kann die Porengröße des Gels und somit das Auftrennverhalten der DNA-Fragmente variiert werden.

In dieser Arbeit wurden Gele mit 1%-igem Agarosegehalt genutzt. Zudem wird Ethidiumbromid hinzugegeben, das die DNA durch Interkalieren im UV-Licht sichtbar macht. Zur Orientierung wird eine DNA-*ladder* aufgetragen, die DNA-Banden bekannter Größe aufzeigt.

Um die gewünschten DNA-Fragmente nach Auftrennen auf dem Agarose-Gel wieder aufzureinigen, muss die entsprechende Bande mithilfe eines Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten werden. Für die weitere Prozessierung wurde das kommerziell erworbene ZymoClean Gel DNA Recovery Kit verwendet. Zum Abschluss fand eine Elution in 12 µl ddH<sub>2</sub>O statt.

### 3.1.2.3 Ligation von DNA

Nach Anlagerung der komplementären DNA-Einzelstrangsequenzen von Vektor und Insert katalysiert das Enzym Ligase die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen den Enden der Stränge; dadurch werden sie kovalent miteinander verbunden. Eine Religation des geöffneten Vektors kann durch den Einsatz zwei verschiedener Restriktionsenzyme und darauffolgende Aufreinigung über ein Agarosegel vermieden werden.

Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 19 aufgeführt. Dieser wird eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 19: Ligationsansatz

Komponente	Volumen
Vektor-DNA	3 µl
Insert-DNA	5 µl
T4-Ligase	1,5 µl
T4-Ligase-Puffer	1,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 15 µl

### 3.1.3 Plasmid-DNA Isolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien werden selektionierte Kolonien von der Agarplatte gepickt und in entsprechend zum resistenzvermittelnden Plasmid passendes antibiotikahaltiges *lysogeny broth* (LB)-Nährmedium gegeben. In dieser Arbeit wurden Amp und Kana zur Selektion verwendet. Je nach zu isolierender Menge können unterschiedliche Bakterienkulturvolumina eingesetzt werden, die in den kommerziell erworbenen Mini-, Midi- und Maxipräp-Kits angegeben sind. Diese Flüssigkultur wird über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wird je nach Herstellerangaben des Kits die Plasmid-DNA aus den Bakterien über Chromatographiesäulen isoliert. DNA-Konzentrationen können anschließend photometrisch durch die Extinktion bei 260 nm bestimmt werden.

### 3.1.4 Sequenzierung

Zur Bestätigung der Basenabfolge einer im Restriktionsverdau für korrekt befundenen DNA-Sequenz wurde die Sequenzierung durch Kettenabbruchmethode nach Sanger genutzt. Diese wurde durch den Anbieter Microsynth SeqLab durchgeführt, der ein Plasmid-DNA-Gehalt von 40-100 ng/µl in einem Volumen von 12 µl fordert. Hinzu kommen 3 µl Primer (4 pmol/µl), die entweder aus dem eigenen Bestand oder vor Ort vom Dienstleister hinzugegeben werden.

### 3.1.5 Gateway® -Klonierungen

In dieser Arbeit wurde das Gateway-Klonierungssystem von Invitrogen™ zur Herstellung von pInducer21-Puro (pInd)-Konstrukten verwendet.

Nach Klonierung der erwünschten Konstrukte im sogenannten *entry*-Vektor (pENTR™) kann das zu transferierende Gen ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen oder Ligase in den Destination-Vektor gebracht werden. Dies geschieht mittels eines Enzymmixes, der eine sogenannte LR-Reaktion katalysiert. Durch Erkennung von attL-Sites im entry-Vektor, die das Insert flankieren, und attR-Sites im Akzeptorvektor kann über eine Exzisionfunktion eine Überführung stattfinden.

Der Reaktionsansatz ist Tabelle 20 zu entnehmen. Dieser wird eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend in *E. coli*-Bakterien transformiert.

Tabelle 20: LR-Reaktionsansatz

Komponente	Menge
<i>Entry</i> -Vektor	4 µl, 50-150 ng
<i>Destination</i> -Vektor	1 µl, 150 ng/µl
LR-Enzymmix	1 µl

## 3.2 Transformation von Bakterien

Transformation bezeichnet die Aufnahme von freier DNA durch kompetente Bakterien, wodurch Plasmide in ihnen vervielfältigt werden können. Die chemische Kompetenz erfolgt durch eine CaCl<sub>2</sub>-Behandlung. In etwa 50 µl eines auf Eis aufgetauten *E. coli* DH10B- Aliquots wird die einzuschleusende Plasmid- DNA gegeben, wie beispielsweise 5 µl eines Ligationsansatzes. Die Probe wird auf dem Vortexer gemischt. Es folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, ein einminütiger Hitzeschock bei 42°C sowie weitere fünf Minuten

Inkubation auf Eis. Daraufhin werden 200 µL LB-Medium hinzugegeben und das Eppendorf Gefäß eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wird die Probe zur Selektion mit der Impföse auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **3.3 Methoden der Zellkultur**

#### **3.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien**

Für diese Arbeit wurden die humanen Zelllinien HEK293T und AB8 genutzt. Sie wurden in 10 cm-Durchmesser-Schalen in einem Volumen von 10 ml Medium kultiviert und bei einer Konfluenz von maximal 90% ausgedünnt umgesetzt. Das Nährmedium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Dessen Zusammensetzung sowie die Bedingungen im Zellkulturschrank sind in Tabelle 14 aufgeführt. HEK293T-Zellen können durch einfaches Auf- und Abpipettieren vom Boden der Kulturschalen gelöst werden und in gewünschter Verdünnung auf eine neue Halteschale gegeben beziehungsweise für Experimente ausgesät werden. Da die AB8-Zellen deutlich adhärenter wachsen, muss nach Abnehmen des Nährmediums 500 µl 10x Trypsin-EDTA zum Lösen der Zellen genutzt werden. Nach fünf Minuten Inkubation bei 37°C lassen sie sich in frischem Medium mit FCS, welches die Trypsinreaktion stoppt, durch Auf- und Abpipettieren ebenfalls abspülen und in gewünschter Dichte aussäen.

#### **3.3.2 Transiente Transfektion**

Die transiente Transfektion bezeichnet das vorübergehende Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Diese wird dabei nicht stabil ins Genom integriert und geht daher wieder verloren. Der Erfolg der Transfektion kann anhand eines WB analysiert werden, da sich durch das Vorliegen der zusätzlichen genetischen Information das Proteinexpressionsprofil der Zelle ändern sollte. Im Fall des Einbringens kodierender Sequenzen für ein fluoreszierendes Protein, kann die Expression auch in der IF-Mikroskopie überprüft werden.

Die Calciumphosphat-Methode ist eine mögliche Variante für eine transiente Transfektion. In dieser Arbeit wurde sie für HEK293T-Zellen genutzt, die eine hohe Transfektionsrate aufweisen. Für ein Volumen von 10 ml Medium werden 500 µl CaCl<sub>2</sub> sowie 10 µg der Plasmid DNA in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend werden, unter vorsichtigem Vortexen, 500 µl 2x HEBS-Puffer hinzupipettiert. Der Reaktionsansatz inkubiert 20 Minuten bei RT und wird dann auf ca. 60-70% konfluente Zellen gegeben. Nach 8-10h findet ein Mediumwechsel statt und im Anschluss an weitere 24h-30h können die transfizierten Zellen weiterverwendet werden.

Zusätzlich wurden auch AB8-Zellen transfiziert, bei denen allerdings die Lipofectamine-Methode eine höhere Effizienz zeigt. Dazu wurde das Protokoll des Produktes Lipofectamine™

2000 nach Herstellerangaben durchgeführt. Vier Stunden später findet ein Mediumwechsel statt und nach weiteren 24h ist eine Expression der transient transfizierten DNA zu erwarten.

### **3.3.3 Generierung von stabilen Zelllinien**

Es wurden AB8- und HEK293T-Zellen mit induzierbarer Überexpression von RFP-markiertem EPB4.1L5 sowie doppelter, induzierbarer Überexpression von RFP EPB4.1L5 und Crb2 GFP generiert. Das Ziel ist die Integration besagter DNA in das Genom der Zellen; dazu wurde in dieser Arbeit der lentivirale Gentransfer genutzt.

Zunächst müssen das zu transduzierende Plasmid sowie die Helferplasmide psPAX2 (kodiert für Strukturproteine zur Verpackung der DNA) und pMD2-VSVG (kodiert für die Virushülle), die zur Produktion des Virus nötig sind, in HEK293T-Zellen transfiziert werden. Diese werden in Zellkultur-Flaschen (250 ml) ausgesät und müssen am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70% aufweisen. Es wurde die Calciumphosphat-Methode (s. 3.3.2) genutzt, für die der Ansatz pro Flasche 6,5 µg psPAX2, 3,5 µg pMD2-VSVG und 10 µg zu überexprimierende DNA enthält. Nach 6-8h wird das Medium abgenommen und 12 ml des Zielzell-Mediums hinzugegeben, womit die Zellen drei Tage inkubieren (S2-Arbeit), um Virus in den Zellkulturüberstand zu produzieren. Die zur Virusproduktion genutzten Plasmide haben die Eigenschaften zur intrazellulären Replikation verloren, was ein unkontrolliertes Vermehren verhindert.

Der virushaltige Überstand der HEK293T-Zellen wird abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter gegeben. Pro Schale werden 5 ml virushaltiges Medium sowie 5 ml virusfreies Medium auf die 40-60% konfluenten Zielzellen gegeben. Hinzu kommen 0,8 µl/ml Polybrene, die durch Neutralisierung von Ladungsabstoßungen zwischen Virionen und Sialinsäuren der Zelloberfläche die Transduktionseffizienz erhöhen. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank (erster Infektionszyklus) werden 10 ml ausschließlich virusfreies und nach abermals 24-stündiger Inkubation (Regenerationszeit) wiederum zu 50% virushaltiges Medium hinzugegeben. Im Anschluss an weitere 24 h Inkubation (zweiter Infektionszyklus) sowie eine zweite Regenerationsphase folgt die Selektion mit Puromycin (2-4 µg/ml). Diejenigen Zellen, die erfolgreich mit dem pInd transduziert wurden, weisen eine Resistenz gegen das Antibiotikum auf. Nach zweimaligem Passagieren können die Zellen auf S1-Bedingungen runtergestuft werden. Zur Kontrolle wird über die Infektions- und Regenerationszyklen je eine Kontrollschale mit der Zielzelllinie mitgeführt, die keine Resistenz aufweisen soll.

In diesem besonderen Fall der Transduktion von zwei verschiedenen Plasmiden wurde das virushaltige Medium in den Infektionszyklen 1:1 aus den beiden unterschiedlichen Überständen zusammengesetzt.

### **3.3.4 Einfrieren von Zellen**

Um Zellen langfristig aufzubewahren sowie im Fall einer Kontamination über eine Reserve zu verfügen, wurden junge Passagen der generierten Zelllinien eingefroren. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von um die 90% in 10 ml Medium aufgenommen, in ein Falcon überführt und bei 1000 g fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 5 ml 1x PBS gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation von fünf Minuten bei 1000 g. Im nächsten Schritt wird das Zellpellet in 900 µl Medium resuspendiert und mit 100 µl DMSO, das die Bildung von schädigenden Eiskristallen verhindert, in ein 1 ml Kryoröhrchen gegeben. Dieses wird nach 3 Stunden bei -20°C und weiteren 12 Stunden bei -80°C in einen Stickstofftank überführt.

### **3.3.5 Herstellung von Zelllysaten**

Um mithilfe von WB oder Ko-Immünpräzipitation (Ko-IP) das Proteinspektrum von Zellen zu untersuchen, müssen diese lysiert werden. In dieser Arbeit wurden dafür HEK293T-Zellen verwendet.

Je nach erwünschter Zellmenge kann eine entsprechende Kulturschale genutzt werden. Bei einer Konfluenz von circa 90% wird zunächst das Medium abgenommen, mit kaltem 1x PBS gewaschen und das Gefäß auf Eis gestellt. Daraufhin wird für WB-Lysate Ripa-Puffer, für eine Ko-IP Lysis-IP-Puffer genutzt. In beiden Fällen werden die Puffer zuvor mit Phosphatase- und Protease-Inhibitoren versetzt. Das Puffervolumen richtet sich nach der zu lysierenden Zellmenge, bei einer 6 cm-Schale 250 µl Ripa-Puffer, bei einer 10 cm-Schale für eine Ko-IP 600 µl Lysis-IP-Puffer. Nach etwa zweiminütiger Einwirkzeit werden die Zellen auf Eis mithilfe eines Zell-Schabers mechanisch vom Gefäßboden gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Über 30 Minuten wird dieses alle fünf Minuten gevortext. Lysate für eine Ko-IP werden durch zehnmaliges Auf- und Abziehen der Zellen durch eine Kanüle (20G) und Ripa-Lysate durch 10-minütige Inkubation im Ultraschallbad mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss werden die Proben 15 Minuten bei 20 000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 2x Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben für den WB werden bei -20°C, die Proben für die Ko-IP bei -80°C gelagert.

## **3.4 Methoden der Proteinbiochemie**

### **3.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten (SDS-PAGE)**

Zur Analyse des Proteinspektrums von Zelllysaten wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) nach Laemmli genutzt. Vor Auftragen der Proben werden die Proteine durch Zugabe von SDS und β-Mercaptoethanol denaturiert und verlieren ihre Tertiär- und Quartärstruktur. SDS überdeckt als Anion die

Eigenladung des Proteins, sodass lediglich die Größe Einfluss auf dessen Laufgeschwindigkeit in Richtung Anode im Polyacrylamidgel hat. Je größer der Acrylamidanteil des Gels, desto höher ist der Grad der Vernetzung des Gels, was für das Auftrennen von kleineren Proteinen von Vorteil sein kann. In dieser Arbeit wurden 8-, 10, und 13,5%-Gele verwendet.

Vor dem Auftragen der Proben werden diese fünf Minuten auf 95°C erhitzt, gevortext und herunterzentrifugiert. Als Marker wurden 3 µl des Page Ruler™ Plus Prestained Protein *ladder* verwendet.

Zunächst wird das Sammelgel von den Proteinen durchwandert. Das geschieht durch seine geringe Vernetzung und den neutralen pH relativ zügig und konzentriert diese, vor Eintritt in das basischere Trenngel, auf. Für das Durchqueren des Sammelgels wird eine Spannung von 150 Volt, für das Trenngel eine Spannung von 200 Volt gewählt, bis die Proben komplett durch das Gel gewandert sind.

Die Zusammensetzung der verschiedenen genutzten Polyacrylamidgele ist in Tabelle 21 aufgeführt. Sie wurden in 1,5 mm Gekassetten (BioRad) entsprechend der Herstellerangaben gegossen und laufen gelassen.

**Tabelle 21: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen-Gelen für die SDS-PAGE**

<b>Komponente</b>	<b>Trenngel (8%, 5 ml)</b>	<b>Trenngel (10%, 5 ml)</b>	<b>Sammelgel (5%, 2 ml)</b>
ddH <sub>2</sub> O	2,8 ml	2,0 ml	1,4 ml
Acrylamid (Rotiphorese® Gel30)	1,3 ml	1,7 ml	0,33 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	-
1 M Tris, pH 6,8	-	-	0,25 ml
SDS (10%)	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
APS	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,003 ml	0,003 ml	0,002 ml

### 3.4.2 Western Blot (WB)

Mithilfe eines WB können die in der SDS-PAGE nach Größe aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen werden, um sie so zu immobilisieren und mittels Antikörpern spezifische Proteine nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde ein *semidry-blotting*-Verfahren durchgeführt. Hierbei wandern die Proteine unter Anlegen von 72 mA/pro Gel (1,5 mA/cm<sup>2</sup>) in Richtung Anode auf eine PVDF-Membran, dessen Oberfläche zuvor über eine Minute in Methanol

(absolut) aktiviert wurde. Je zwei in Transferpuffer getränkte *Whatman*-Filterpapiere werden anoden- und kathodenwärts platziert. Beim Aufbau ist darauf zu achten, den Einschluss von Luftblasen zu vermeiden. Nach 90 Minuten ist die Übertragung der Proteine abgeschlossen, was durch eine Ponceau-S-Proteinfärbung kontrolliert werden kann. Dazu wird die PVDF-Membran für etwa zwei Minuten mit einer solchen Lösung bedeckt und darin geschwenkt. Kurzes Waschen mit *Tris buffered saline* mit Tween20 (TBS-T) entfernt unspezifische Ponceaufärbung und übertragene Proteinbanden sollten dargestellt sein.

### **3.4.3 Immundetektion mit spezifischen Antikörpern**

Die PVDF-Membran wird zum Blocken unspezifischer Proteine 30 Minuten bei 37°C beziehungsweise 60 Minuten bei RT in 5% Milchpulver in TBS-T geschwenkt. Membranstücke mit den zu erwartenden Proteingrößen werden nach Waschen in TBS-T über Nacht bei 4°C mit dem jeweils entsprechenden primären Antikörper inkubiert. Diese wurden zuvor in 5% BSA TBS-T (Verdünnung s. Tabelle 7) gelöst. Am darauffolgenden Tag wird die Inkubation zunächst 20 Minuten bei RT und 80 rpm fortgesetzt, bevor gründliches Waschen in TBS-T von dreimal 15 Minuten folgt. Schließlich findet der Protein-Antikörper Nachweis durch einen *horseradish*-Peroxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000 in 5% Milchpulver, 60 Minuten RT, Tabelle 8) statt.

Zum Entwickeln wird je nach Stärke des Antikörpers und Menge des detektierten Proteins das Substrat *Clarity* beziehungsweise *Clarity Max* verwendet und nach Herstellerangaben auf die Membran gegeben. Das Substrat wird durch die Peroxidase in ein Lumineszenzsignal umgesetzt, das mithilfe des Azure Imager c600 detektiert werden kann. Für das Bearbeiten der Bilder wurde die entsprechende Firmensoftware, Image J sowie CorelDraw genutzt.

### **3.4.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie, bei der sich die Eigenschaft fluoreszierender Stoffe und Proteine zunutze gemacht wird, nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge, ein Lichtsignal kürzerer Wellenlänge zu emittieren. In dieser Arbeit diente die Methode zur Darstellung der Lokalisation von spezifischen Proteinen in einem Zellkulturverband.

Beim *Live Cell Imaging* exprimieren die mikroskopierten Zellen entweder ein fluoreszierendes Protein oder sie werden mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt, die sich an spezifische Zielstrukturen der Zelle anlagern. Bei fixierten Zellen hingegen kann, wie beim WB, die IF-Färbung mittels spezifischer Antikörper genutzt werden.

#### **3.4.4.1 Live Cell Imaging von lebenden Zellen**

Um lebende Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie betrachten zu können, müssen sie fluoreszierende Proteine exprimieren oder mit eigens für das *live cell imaging* vorgesehenen Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert werden. Die Expression von Fluoreszenzproteinen findet nach transienter Transfektion (s. 3.3.2) oder in entsprechenden Zellen stabil statt.

In dieser Arbeit wurden vor allem induzierbare Konstrukte mit dem pInd (s. 3.5) verwendet. Für eine adäquate Expression der entsprechenden Proteine wurde nach Dox-Induktion 48h gewartet, bis die HEK293T- und AB8-Zellen mikroskopiert wurden. Dazu wurden diese auf 2 cm sowie 8-well Ibidi-Mikroskopie-Zellkulturschalen mit Glasboden ausgesät. Um Zell-Zell-Kontakte beurteilen zu können, ist eine Konfluenz von 80-90% wünschenswert. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen zusätzlich nach Herstellerangaben mit dem Farbstoff Hoechst von Thermo Scientific inkubiert. Für das Anfärben der Lysosomen im *live cell imaging* wurde der Farbstoff LysoTracker® Deep Red nach Herstellerangaben verwendet.

#### **3.4.4.2 IF-Färbung von fixierten Zellen**

Die gewünschte Zelllinie wird entweder auf Deckgläschen von 8-15mm Durchmesser oder in ibidi-Mikroskopie-8-wells mit Glasboden ausgesät. Die Fixierung findet bei einer Konfluenz von etwa 90% statt; zuvor erfolgen je nach Bedarf und Protokoll transiente Transfektionen und/oder Induktionen.

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend 20 Minuten bei RT mit 4% PFA fixiert. Es folgen drei fünfminütige Waschschrte mit PBS, 10 Minuten quenchen mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl in 1x PBS) sowie weiteres dreimaliges Waschen in PBS für je fünf Minuten. Im Anschluss werden die Zellen mit 0,2% Triton-100 in 1x PBS permeabilisiert. Dies sowie alle folgenden Schritte finden im 8-well oder, wenn sie auf Deckgläschen ausgesät sind, in 20-50 µl-Tropfen auf Parafilm statt. Dazu werden die Deckgläser mit Seite der Zellen in die Tropfen gelegt. Die Inkubation beträgt fünf Minuten bei RT gefolgt von dreimaligem Waschen mit IF-Puffer. Bevor die erste Antikörperfärbung stattfindet, müssen unspezifische Bindungsstellen durch mindestens 20-minütige Inkubation bei RT mit Blocking-Lösung gebunden werden. Die gewünschten ersten Antikörper werden je nach Stärke des Antikörpers (s. Tabelle 7) in Antikörperlösung verdünnt. Die Inkubation findet mindestens 120 Minuten bei RT statt. Im Anschluss an dreimaliges Waschen mit dem IF-Puffer folgt die zweite Antikörperfärbung. Diese benötigt in etwa 30 Minuten bei RT. Die Antikörper werden wie in Tabelle 8 aufgeführt ebenfalls in AK verdünnt. Für das darauffolgende Waschen wird PBS verwendet. Die 8-wells sind nun bereit zum Mikroskopieren, die Deckgläschen hingegen werden kurz in zweifach destilliertem Wasser geschwenkt, bevor sie in 5-10 µl Mowiol auf dem Objektträger luftblasenfrei eingedeckelt werden. Das Aushärten kann 10-15 Minuten bei 37°C oder über Nacht bei RT stattfinden.

### 3.4.5 Ko-Immünpräzipitation

Die Ko-IP kann zum Untersuchen von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden. In dieser Arbeit wurden dafür *Beads* verwendet, die das GFP als Antigen erkennen und binden (GFP-Trap, Chromotek). Durch Präzipitation sollen diejenigen Proteine nachgewiesen werden, die direkt oder auch indirekt damit interagieren.

Zunächst müssen IP-Lysate der Zellen hergestellt werden (s. 3.3.5), die die Proteine enthalten, die von Interesse sind. Für den Input werden nach Herunterzentrifugieren der Zellreste 70  $\mu$ l der Lysate mit 70  $\mu$ l 2x Laemmli-Puffer versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Pro IP-Lysat müssen 20  $\mu$ l Beads vorbereitet werden. Diese werden zweimal in 500  $\mu$ l kaltem PBS und ein weiteres Mal in 500  $\mu$ l ebenfalls gekühltem Dilutionspuffer gewaschen. Je nach Stärke der nachzuweisenden Bindung kann dabei die Salzkonzentration des Puffers zwischen in dieser Arbeit genutzten 150 mM NaCl für eine hohe Sensitivität bis hin zu 500 mM variiert werden. Nach jedem Waschschrift werden die Reaktionsgefäße invertiert, anschließend bei 9000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Es werden 400  $\mu$ l des Lysats sowie 200  $\mu$ l Dilutionspuffer auf die vorbereiteten Beads gegeben. Danach müssen die Proben mindestens vier Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotieren, um ein effizientes Binden des GFPs an die Beads zu gewährleisten. Im Anschluss folgen zwei Minuten Zentrifugation bei 9000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der Überstand kann als sogenannte „ungebundene Fraktion“ aufbewahrt oder verworfen werden. Die Beads werden viermal in 1 ml kaltem Dilutionspuffer gewaschen. Nach den ersten beiden Durchgängen folgen je 10 Minuten Rotieren, bei den zwei darauffolgenden Durchgängen werden die Proben jeweils kurz invertiert, bevor sie bei 9000 rpm zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen wird. Letzlich werden die Beads in 40-60  $\mu$ l 2x Laemmli-Puffer resuspendiert, fünf Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  aufgekocht und herunterzentrifugiert. Die Aufbewahrung kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  stattfinden.

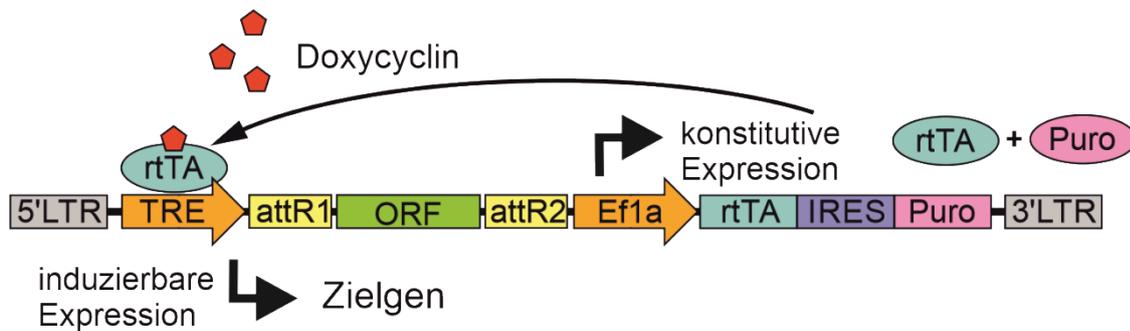
### 3.5 Das pInducer21-Puro-System

Mithilfe des pInd-Systems nach Meerbrey et al. (56) können temporär Dox-abhängige Überexpressionen und *knockdowns* von Proteinen erreicht werden (s. Abbildung 7). Es wurde in dieser Arbeit genutzt, um durch transiente Transfektion oder lentivirale Transduktion eine Überexpression von RFP-markiertem EPB4.1L5 sowie GFP-markiertem Crb2 in AB8 und HEK293T-Zellen zu erreichen. In Vorarbeiten der AG Pavenstädt wurde das *eGFP*-Reportergen durch eine Puromycin-Resistenkassette ersetzt (77). Dadurch ist eine Selektion zugunsten der erfolgreich transduzierten Zellen möglich.

Durch den konstitutiv aktiven Promotor *elongation factor 1- $\alpha$*  (EF1 $\alpha$ ) kommt es zu einer stetigen Transkription des reversen Tetracyclin-kontrollierten Transaktivators 3 (rtTA3) und der

Puromycin-Resistenzkassette. Letzteres geschieht mithilfe einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES).

Unter Zugabe des Koaktivators Dox, einem Tetracyclin-Derivat, aktiviert rtTA3 den Promotor *tetracyclin response element 2* (TRE). Dieser induziert die Expression der von attR-Sites flankierten cDNA von Interesse, die *downstream* von dem Promotor liegt und zuvor über die LR-Reaktion (s. 3.1.5) in das Konstrukt eingebracht wurde.



**Abbildung 7: Schema des pInducer21-Puro-Systems**

Dargestellt ist ein Schema des pInd-Systems (modifiziert; nach von Meerbrey et al. (56)). Zur Selektion dient die konstitutive Expression der Puromycin-Resistenz. Unter Zugabe des Koaktivators Dox, einem Tetracyclin-Derivat, aktiviert rtTA3 den Promotor TRE2. Dieser induziert die Expression der cDNA im ORF. LTR: *long terminal repeats*, TRE2: *tetracyclin response element 2* Promotor, attR1/2: Rekombinationsstellen der Gateway®-Klonierung, ORF: *open reading frame*, EF1a: *elongation factor 1 α* Promoter, rtTA3: *reverse tetracycline transactivator 3*, IRES: *internal ribosomal entry site*, Puro: Puromycin-Resistenzkassette

### 3.6 Statistische Analysen

In dieser Arbeit wurden qualitative Analysen durchgeführt, die für die Aussage dieser Dissertation keiner statistischen Auswertung bedürfen. Die Experimente wurden wiederholt durchgeführt, was durch die Angabe der Anzahl kenntlich gemacht ist. Zur Verifizierung der Ergebnisse sind in Folgestudien statistische Auswertungen nötig.

## **4 Ergebnisse**

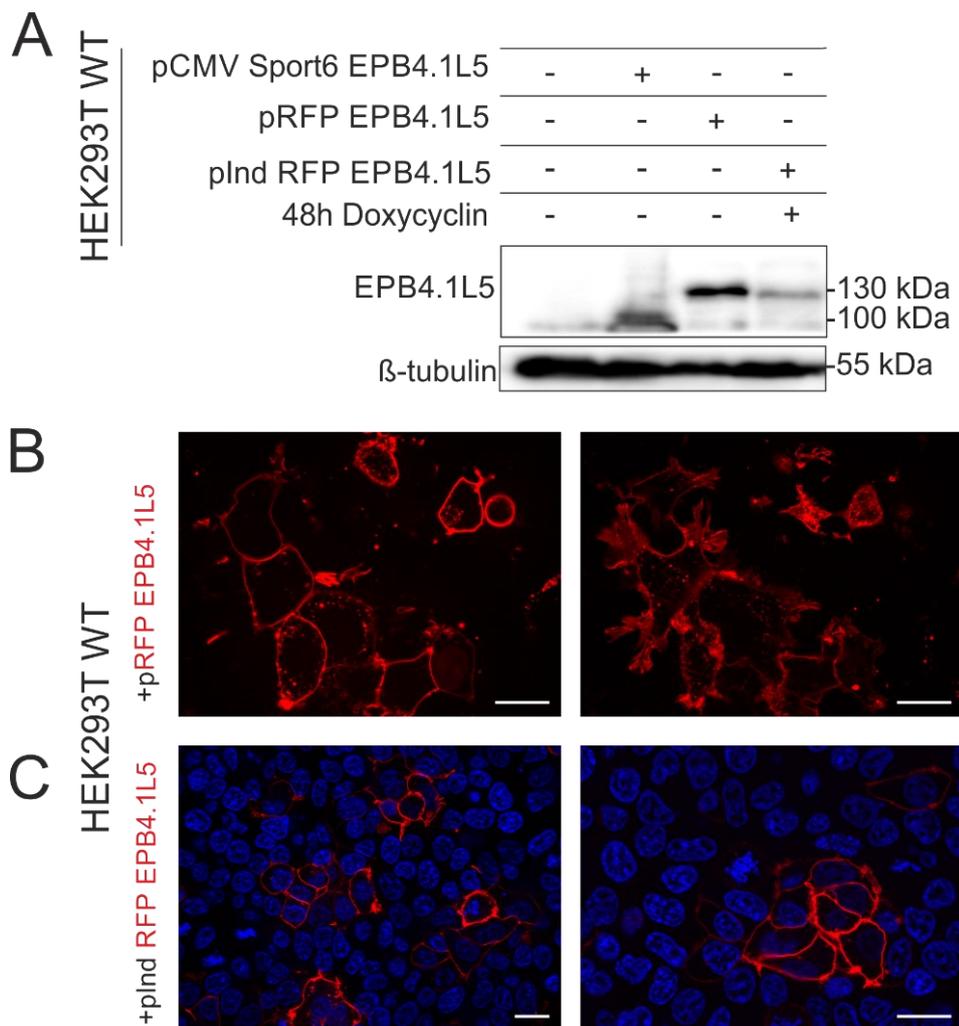
### **4.1 Der Einfluss hoher EPB4.1L5-Level auf die Zellbiologie**

#### **4.1.1 Klonierung von Vektoren zur transienten Überexpression von EPB4.1L5**

Sowohl HEK293T- (s. Abbildung 8) als auch AB8-Zellen weisen endogen ein niedriges Expressionslevel von EPB4.1L5 auf. Um Zellmodelle zu etablieren, in denen sich dieses Protein gut untersuchen lässt, wurden Zellen mit EPB4.1L5-Überexpression generiert.

Eine Möglichkeit, eine erhöhte Expression eines Proteins zu erreichen, ist die transiente Transfektion eines Vektors, der das gewünschte Gen beinhaltet. Dafür wurde als Ausgangskonstrukt der kommerziell erworbene Vektor pCMV Sport 6 EPB4.1L5 (s. Tabelle 11) genutzt. Darüber hinaus war es Bestandteil dieser Arbeit, Vektoren zu klonieren, die zur Expression einer RFP-markierten EPB4.1L5-Version führen, um eine Beobachtung in der Echtzeit-Mikroskopie lebendiger Zellen zu ermöglichen. Gemäß den in 3.1 beschriebenen Schritten wurden die Vektoren pRFP EPB4.1L5, der bei Vorliegen in der Zelle konstitutiv abgelesen wird, sowie pInd RFP EPB4.1L5, der nach Induktion mit Dox zur Proteinexpression führt (s. 3.5), hergestellt. Die Ergebnisse wurden mittels Sequenzierung verifiziert.

Die Vektoren sind mithilfe der Calciumphosphat-Methode (s. 3.3.2) in HEK293T-Zellen transfiziert worden und die Expression von (RFP-)EPB4.1L5 wurde im WB sowie, im Fall des pRFP EPB4.1L5- und pInd RFP EPB4.1L5-Vektors, in der Fluoreszenzmikroskopie bestätigt (s. Abbildung 8). Es ließ sich eine EPB4.1L5-Lokalisation in der Zellperipherie nahe der Zellmembran und in Zellfortsätzen beobachten.



**Abbildung 8: WB und Fluoreszenzbilder erfolgreicher, transientscher Transfektionen zur Überexpression von EPB4.1L5**

Die klonierten Plasmide wurden auf ihre EPB4.1L5-Expression hin im WB (A) beziehungsweise der IF (B,C) überprüft. (A) Endogen ist in HEK293T WT-Zellen kaum EPB4.1L5 vorliegend. Nach transientscher Transfektion sowie Induktion, im Fall des pInd-Konstrukts, lassen sich erhöhte Level dieses Proteins nachweisen. Gut zu erkennen ist, dass die RFP-fusionierte EPB4.1L5-Form 30 kDa größer ist. (B,C) Fluoreszenzprotein-gekoppeltes EPB4.1L5 ist in der IF durch ein RFP-Signal zu lokalisieren. (C) Die Zellkerne sind mit dem Marker *Hoechst* hervorgehoben. Maßstab 20µm

#### 4.1.2 Generierung von Zelllinien mit induzierbarer, RFP-getaggtter Überexpression

Eine weitere Möglichkeit, erhöhte zelluläre Expressionslevel eines Proteins zu erhalten, ist die Generierung von stabilen Zelllinien. Dies kann hilfreich sein, da im Gegensatz zur transienten Transfektion nicht nur einzelne Zellen das gewünschte Protein überexprimieren.

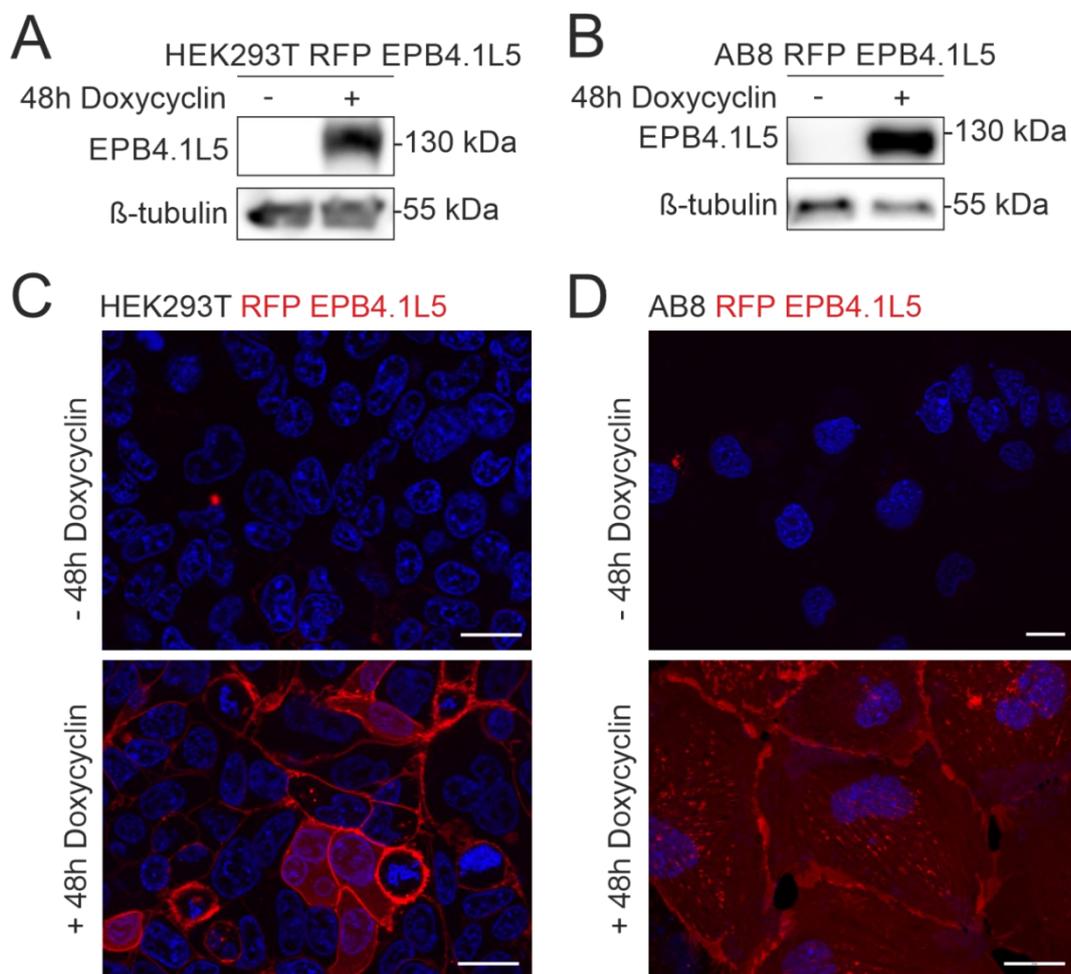
Bei der Generierung stabiler Zelllinien werden Promotor und Zielgen ins Genom integriert, die zu einer vermehrten Produktion des Proteins von Interesse führen und im Gegensatz zu transfizierten DNA-Abschnitten nicht wieder verloren gehen.

Innerhalb dieser Arbeit wurden stabile HEK293T und AB8-Zellen generiert, die die Möglichkeit einer Dox-induzierbaren Überexpression von EPB4.1L5 bieten. Hierfür wurde der zuvor

klonierte pInd RFP EPB4.1L5-Expressionsvektor genutzt (s. 4.1.1) und mittels in 3.3.3 beschriebenem Vorgehen in das Genom eingebracht.

Anschließend konnte im WB erfolgreich die Expression von EPB4.1L5 auf einem höheren Level nachgewiesen werden, wenn die Zellen 48h vor Lyse mit Dox induziert wurden (s. Abbildung 9).

Eine Bestätigung unter dem Fluoreszenzmikroskop war ebenfalls erfolgreich; EPB4.1L5 war, wie bei der transienten Transfektion, in der Zellperipherie nahe der Zellmembran und in Zellfortsätzen zu finden (s. Abbildung 9).



**Abbildung 9: WB und IF-Bilder zum Überprüfen der induzierbaren Überexpression von RFP EPB4.1L5 in HEK293T- und AB8-Zellen**

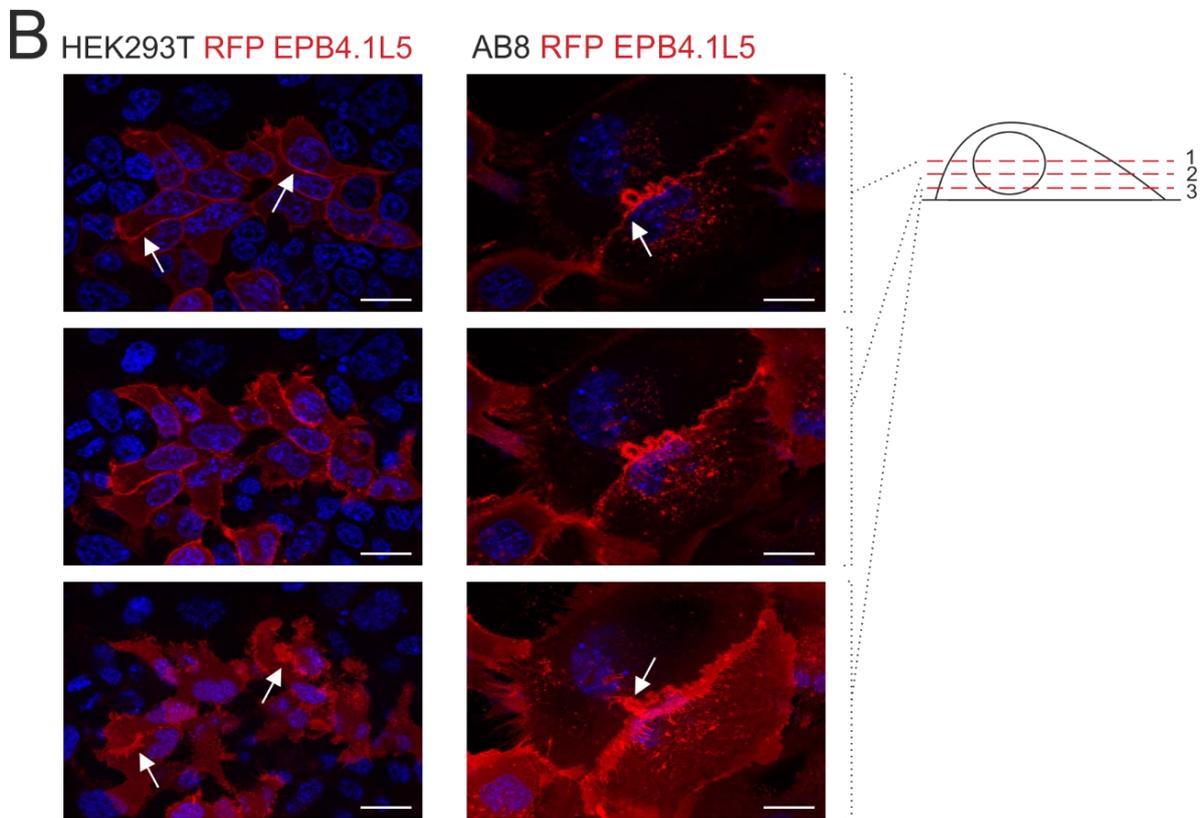
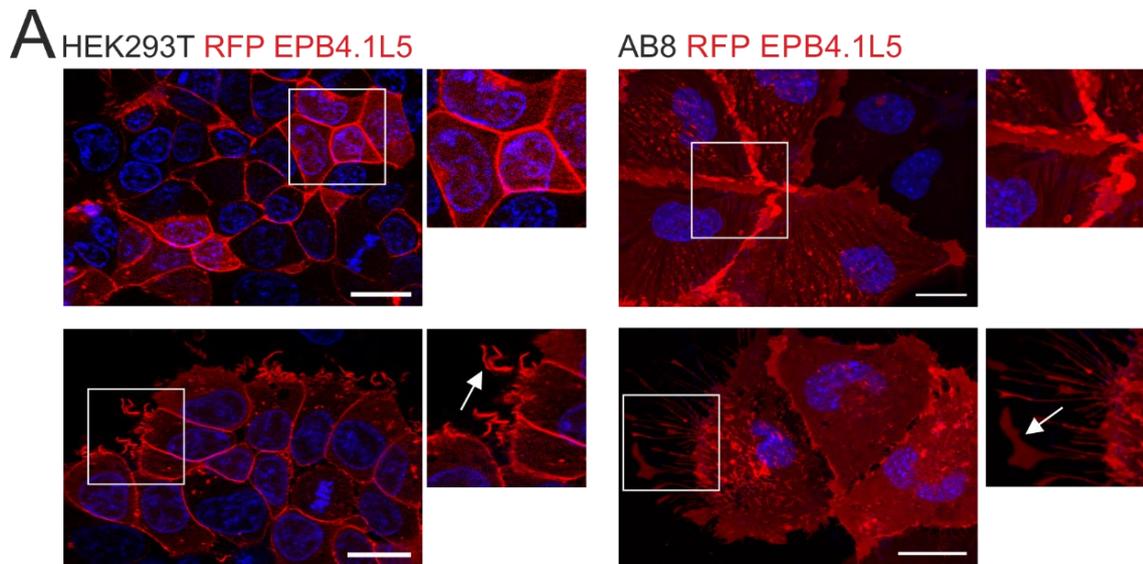
Im WB sind in Lysaten von (A) HEK293T- und (B) AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen erhöhte EPB4.1L5-Proteinlevel nachzuweisen, wenn sie zuvor 48h mit Dox inkubiert wurden. Auch in der Live-Fluoreszenzmikroskopie ist eine Überexpression von EPB4.1L5 nach Induktion in (C) HEK293T- und (D) AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen am roten Farbsignal zu erkennen. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen zuvor mit *Hoechst* inkubiert. Maßstab 20µm

#### **4.1.3 EPB4.1L5 ist vermehrt membranständig, in Zellfortsätzen und in intrazellulären motilen Vesikeln lokalisiert**

Nach 48-stündiger Inkubation mit Dox zeigten die generierten Zelllinien eine charakteristische Verteilung von rotem Fluoreszenzsignal, das die Lokalisation von EPB4.1L5 angibt.

Sowohl in HEK293T- als auch AB8-Zellen gibt es verschiedene Lokalisationspools. So findet sich besonders starkes Signal membranständig sowie in den Zellfortsätzen (s. Abbildung 10). Zytoplasmatisch hingegen scheint eher weniger Protein vorzuliegen, allerdings sind RFP-EPB4.1L5-angereicherte Vesikel zu sehen (s. Abbildung 11). Damit decken sich die Beobachtungen zur EPB4.1L5-Lokalisation in stabilen Zelllinien mit denen in transfizierten HEK293T-Zellen.

Beim Vergleich verschiedener horizontaler Ebenen in den HEK293T- und AB8-Zellen finden sich objektträgenah EPB4.1L5-reiche Zellfortsätze, bei Schnitten weiter vom Objektträger entfernt kann immer schärfer zellmembranständiges EPB4.1L5 erkannt werden (s. Abbildung 10B).



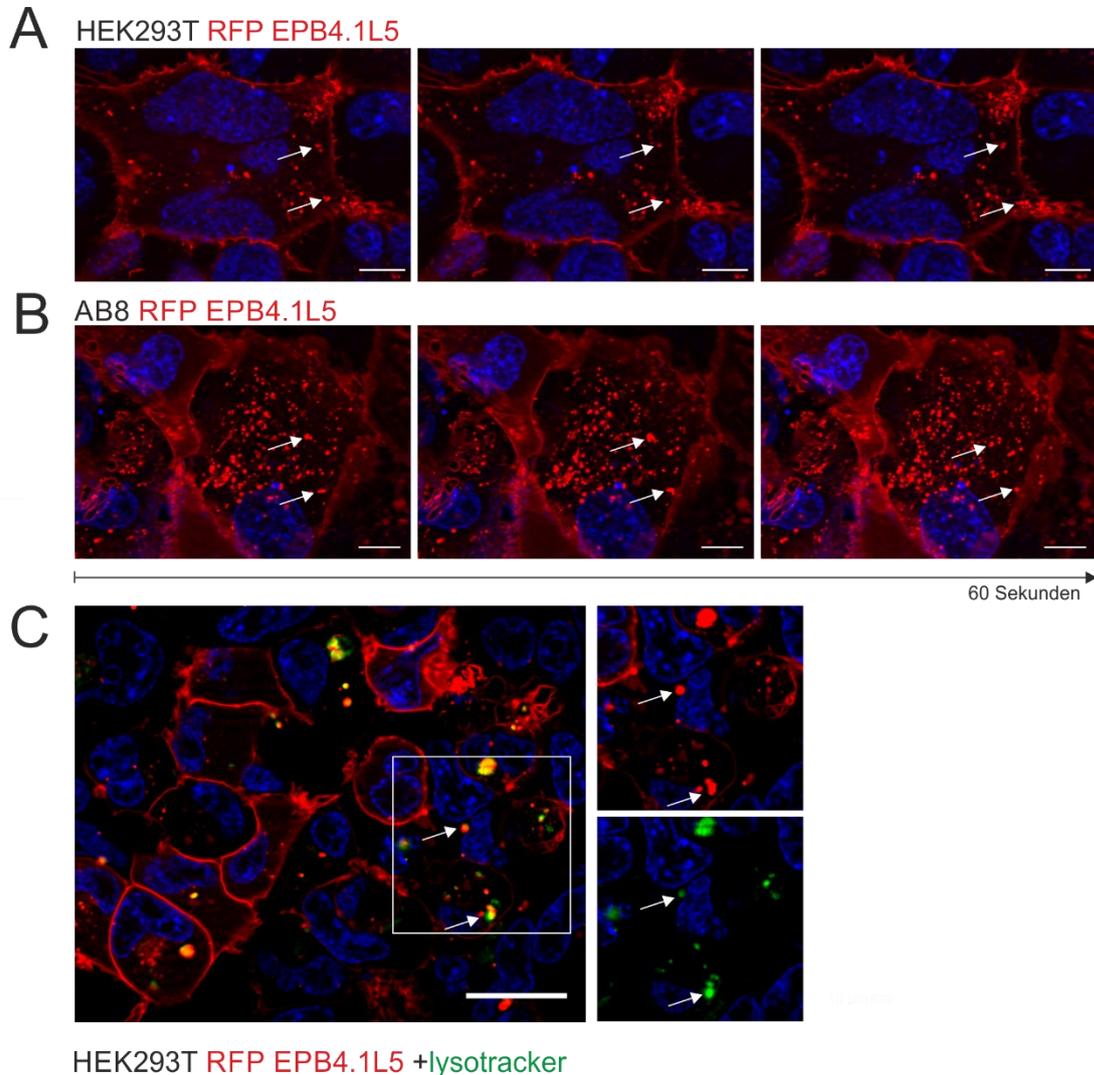
**Abbildung 10: EPB4.1L5-Lokalisation in HEK293T- und AB8-Zellen im *live cell imaging***

Nach 48-stündiger Dox-Induktion der Expression von RFP-markiertem EPB4.1L5 lassen sich die verschiedenen zellulären Lokalisationen des Proteins erkennen. **(A)** EPB4.1L5 kommt membranständig sowie etwas weniger auch intrazellulär vor. Zudem ist das Signal in Zellfortsätzen besonders stark (s. Pfeile). **(B)** In der horizontalen Schnittebene 1 ist EPB4.1L5 sehr klar konturiert (s. Pfeile in Ebene 1), in Ebene 3, entsprechend des Zellmembranverlaufs, hingegen vermehrt flächig und in dessen Ausstülpungen (s. Pfeile Ebene 3) zu finden. Diese erstrecken sich entlang der Oberfläche des Objektträgers. Maßstab 20µm

#### 4.1.3.1 EPB4.1L5 ist mit Lysosomen assoziiert

In Abbildung 11A und B sind die intrazellulären Vesikel mit hoher EPB4.1L5-Anreicherung gut zu erkennen. In Studien im Zeitverlauf kann deren hohe Motilität beobachtet werden. Nach

Zugabe eines Fluoreszenzmarkers zur Darstellung von Lysosomen ist eine partielle Kolokalisation von EPB4.1L5-anreichernden Vesikeln und Lysosomen zu erkennen (s. Abbildung 11C).



**Abbildung 11: Darstellung von EPB4.1L5 und LysoTracker®-positiven Vesikeln in HEK293T- und AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen mit dem Fluoreszenz-Mikroskop**

Im Zeitverlauf über 60 Sekunden können sowohl in **(A)** HEK293T- als auch **(B)** AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen hochmotile, EPB4.1L5-reiche Vesikel beobachtet werden. Anhand der Pfeile kann je eine Lokalisation und die sich dort ändernde Vesikelposition im Zeitverlauf verfolgt werden. Maßstab 10 µm **(C)** In einer Ko-Färbung mit einem Lysosomenmarker, ist eine partielle Kolokalisation mit dem RFP-EPB4.1L5-Signal zu erkennen (Beispiele s. Pfeile). Dies lässt eine lysosomale Lokalisation von EPB4.1L5 vermuten. Maßstab 20 µm

#### 4.1.4 EPB4.1L5-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziierter Proteine

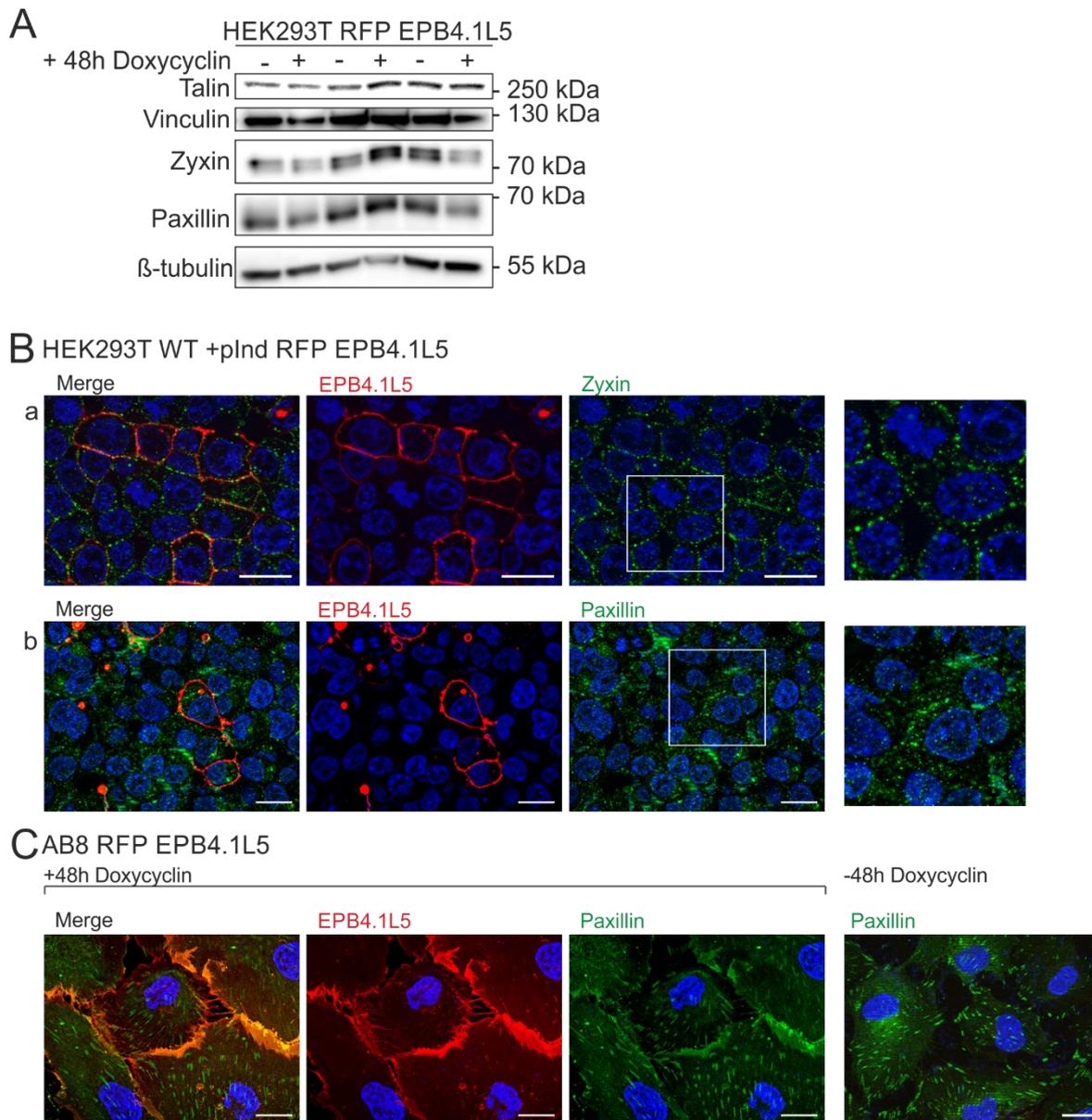
EPB4.1L5 wurde im Zusammenhang mit der Regulation von FAs erwähnt. Daher ist eine Betrachtung FA-assoziierter Proteine in den generierten Überexpressionssystemen von Interesse.

Lysierte HEK293T RFP EPB4.L5-Zellen zeigen nach Dox-Induktion keine konstante Herauf- oder Herabregulierung von Talin, Vinculin, Zyxin oder Paxillin im Vergleich mit nicht-induzierten Zellen (s. Abbildung 12A).

Da sich Auswirkungen auch unabhängig vom Expressionslevel in der Lokalisation zeigen können, wurde daraufhin die Verteilung von Zyxin und Paxillin in mit pInd RFP EPB4.1L5-transfizierten und nicht-transfizierten HEK293T-Zellen verglichen. Auch hier lässt sich kein Unterschied feststellen (s. Abbildung 12Abbildung 12B).

Gerade Paxillin als beschriebener EPB4.1L5-Interaktionspartner sollte genauer betrachtet werden. Durch ihre Größe erlauben die AB8-Zellen eine deutlich detailliertere Betrachtung der Verteilung von FA-Komponenten wie Paxillin. Ein Einfluss durch EPB4.1L5-Überexpression ist allerdings auch hier nicht zu erkennen (s. Abbildung 12C).

Sowohl Zyxin als auch Paxillin sind FA-assoziiert in Clustern lokalisiert (49). EPB4.1L5 hingegen erscheint vielmehr flächig an der Zellmembran. Es liegt also in beiden Fällen eine Kolo-kalisation vor, wobei jedoch im Allgemeinen keine EPB4.1L5-Cluster vorkommen – demnach auch nicht an Orten von Zyxin- oder Paxillinanreicherungen. Eine sehr spezifische Kolo-kalisation ist somit nicht zu beobachten.



**Abbildung 12: EPB4.1L5-Überexpression zeigt keinen Einfluss auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziiierter Proteine**

(A) Induzierte und lysierte HEK293T RFP EPB4.1L5- Zellen zeigen keine Veränderung der Expression FA-assoziiierter Proteine gegenüber nicht-induzierten Zellen. (B) Die Verteilung von Zyxin und Paxillin unterscheidet sich in EPB4.1L5-überexprimierenden HEK293T-Zellen nicht von nicht-überexprimierenden. (C) Auch die Betrachtung der des EPB4.1L5-Interaktionspartners Paxillin in AB8-Zellen weist nicht auf eine Umverteilung durch EPB4.1L5-Überexpression hin. Maßstab 20  $\mu$ m

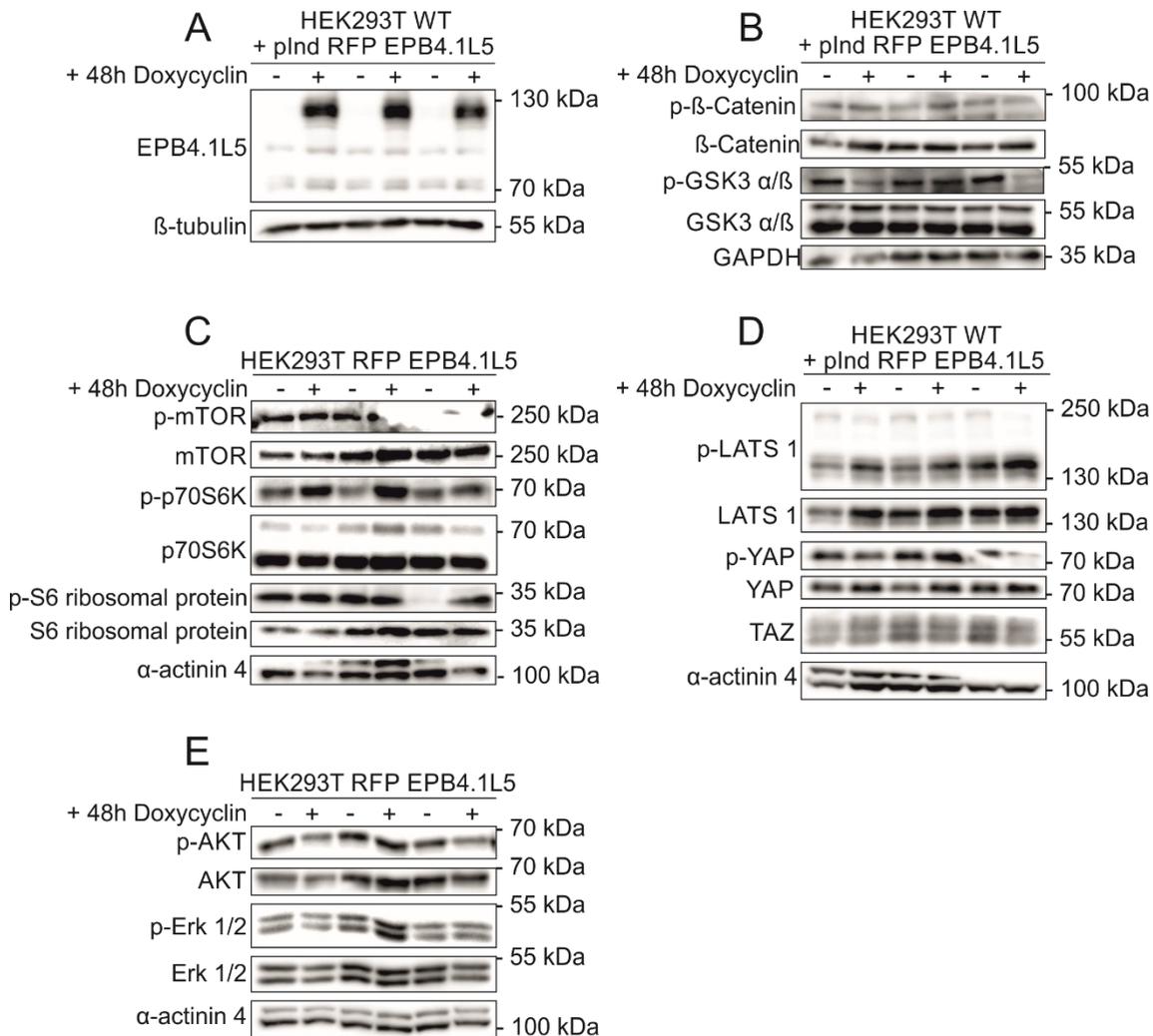
#### 4.1.5 EPB4.1L5-Überexpression weist auf eine Umordnung des *Tight Junction*-Proteins ZO1 hin

Da Vermutungen über die Beteiligung von EPB4.1L5 am Aufbau und der Aufrechterhaltung von zellulärer Polarität bestehen (s. 1.1.1), wurde in IF-Färbungen von HEK293T und AB8 RFP EPB4.1L5-Zellen die Verteilung des *Tight Junction*-Proteins ZO1 analysiert (s. Abbildung 13). In beiden Linien wirkt die Verteilung des Proteins in EPB4.1L5-überexprimierenden Zellen gestört. ZO1, ein intrazelluläres Adapterprotein der *Tight Junctions*, erscheint deutlich weniger



Als zentrale Signalwege in der Zellbiologie wurden der *wnt*- (n=2), der *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)- (n=5), der AKT- (n=3) und der Hippo-Signalweg (n=2) analysiert.

In keinem der Fälle ist in dieser Arbeit eine konstante Regulation des Proteinlevels durch eine Überexpression von EPB4.1L5 aufgefallen (s. Abbildung 14).



**Abbildung 14: Überexpression von EPB4.1L5 zeigt keinen Einfluss auf das Expressionslevel von Komponenten des mTOR-, *wnt*-, AKT- oder Hippo-Signalwegs**

(A) dient der Veranschaulichung des Setups. Verwendet wurden HEK293T-Zellen +pInd RFP EPB4.1L5 (A, B und D) oder HEK293T RFP EPB4.1L5-Zellen (C und E) mit oder ohne 48-stündige Induktion. Gefärbt wurden relevante Proteine (B) des *wnt*-Signalwegs (n=2), (C) des m-TOR-Signalwegs (n=5), (D) des Hippo-Signalwegs (n=2) sowie (E) des AKT-Signalwegs (n=3). Nach mehrmaligem Durchführen der Experimente ließ sich keine EPB4.1L5-abhängige Regulation als konstant erkennen.

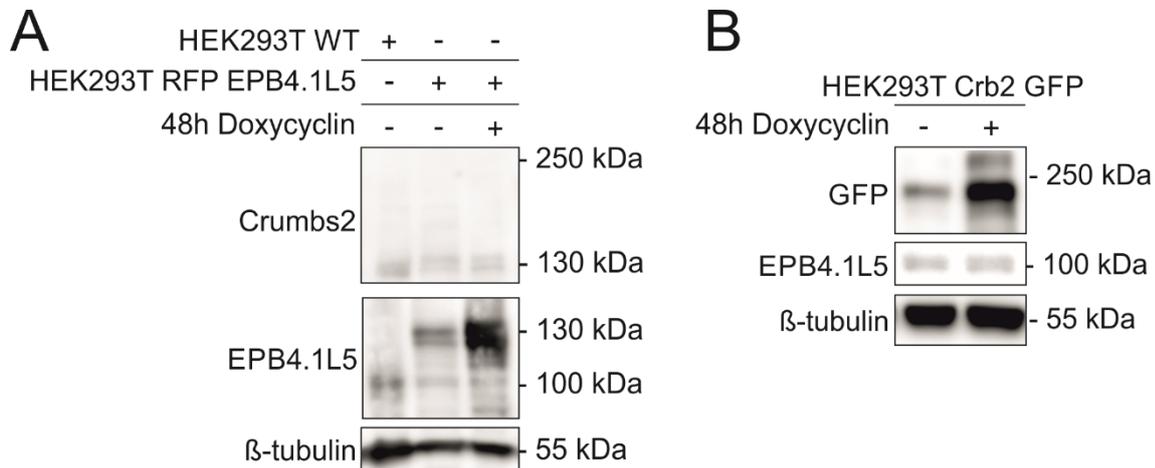
## 4.2 Der Einfluss hoher EPB4.1L5- und Crb2-Level auf die Zellbiologie

### 4.2.1 Ein Einfluss der Hochregulation des EPB4.1L5- oder Crb2-Levels in HEK293T-Zellen auf die Quantität des jeweils anderen Proteins ist nicht nachweisbar

Ähnlich wie EPB4.1L5 liegt auch Crb2 in HEK293T-Zellen endogen in nur sehr geringer Menge vor (s. Abbildung 8 und Abbildung 15).

Reguliert man das EPB4.1L5-Proteinlevel in HEK293T RFP EPB4.1L5-Zellen durch 48-stündige Dox-Induktion hoch, so lassen sich im WB keine Veränderungen in der Menge an exprimiertem Crb2 feststellen (s. Abbildung 15A).

Umgekehrt sind auch in induzierten HEK293T hCrb2 GFP-Zellen keine Veränderungen in der EPB4.1L5-Menge unter Crb2 Überexpression zu beobachten (s. Abbildung 15B).



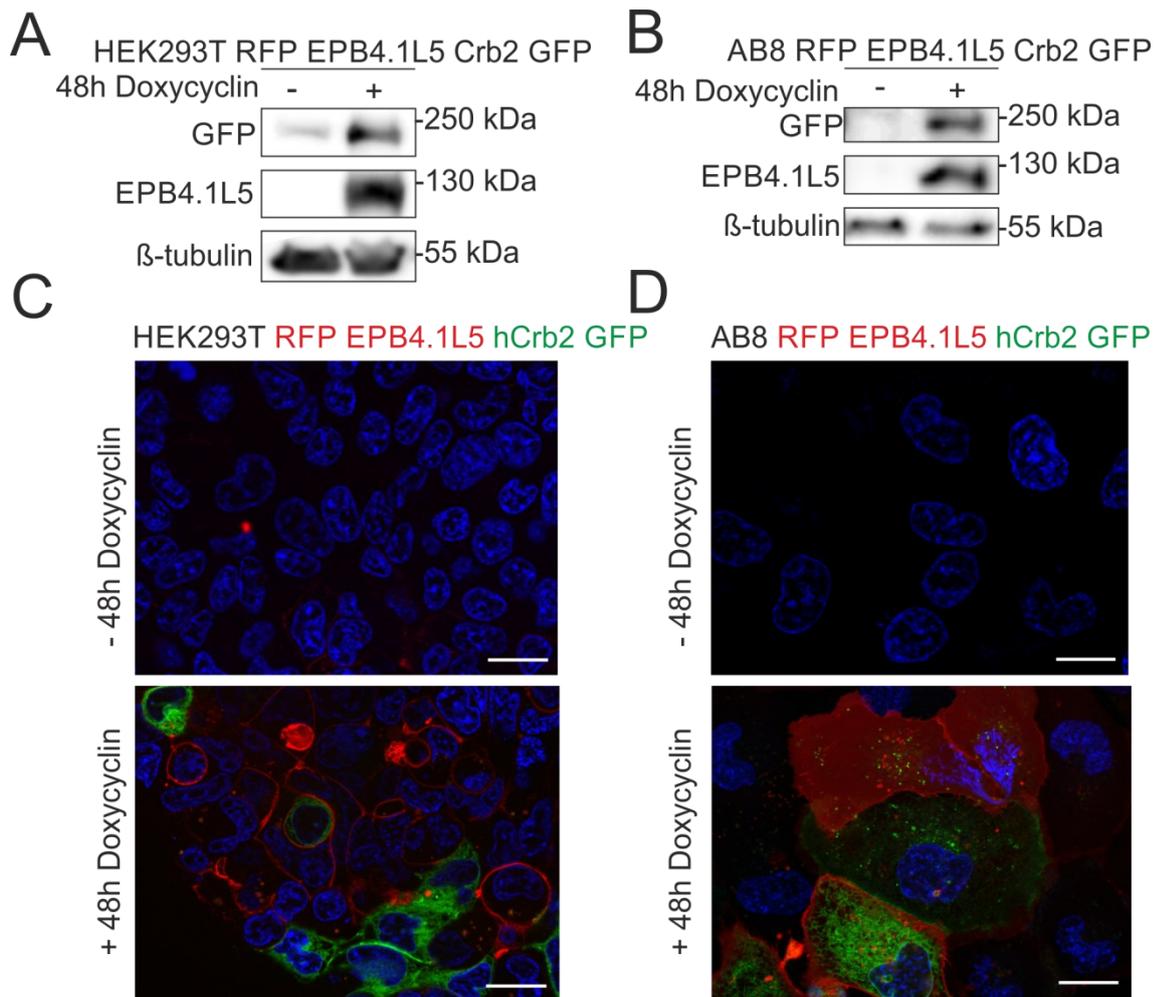
**Abbildung 15: Endogenes Crb2-Level in HEK293T sowie der Einfluss von EPB4.1L5-Überexpression auf das Crb2-Level und von Crb2-Überexpression auf das EPB4.1L5-Level**

(A) Links wurden Lysate von HEK293T-WT-Zellen aufgetragen. Sowohl das EPB4.1L5-Level (s. Abbildung 8) als auch das Crb2-Level stellen sich endogen niedrig dar. Zudem wurden induzierte und nicht-induzierte HEK293T RFP EPB4.1L5-Zelllysate aufgetragen. Ein Einfluss von erhöhtem EPB4.1L5-Level auf die Proteinmenge von Crb2 ist nicht zu beobachten. (B) Veränderungen in der EPB4.1L5-Menge unter Crb2-Überexpression in induzierten HEK293T hCrb2 GFP-Zellen, sind ebenfalls nicht zu beobachten.

#### 4.2.2 Generierung von Zellen mit einem erhöhten Expressionslevel von EPB4.1L5 und Crb2

Da Crb2 ebenso wie EPB4.1L5 in HEK293T-Zellen endogen in sehr geringen Mengen vorliegt (s. Abbildung 15A), wurden zur Studie von EPB4.1L5 in Kombination mit Crb2 doppelt überexprimierende HEK293T- und AB8-Zelllinien generiert. Analog der Zelllinien mit alleiniger Überexpression von EPB4.1L5 wurde dazu die lentivirale Transduktion genutzt, in diesem Fall allerdings mit der Kombination von pInd RFP EPB4.1L5 und pInd hCrb2 GFP (s. 3.3.3 und 4.1.2).

Im WB konnte erfolgreich die Überexpression von RFP-EPB4.1L5 sowie hCrb2-GFP nachgewiesen werden, wenn die Zellen 48h vor Lyse mit Dox induziert wurden (s. Abbildung 16A, B). Unter dem Fluoreszenzmikroskop lassen sich Signale als Indikator beider Proteine erkennen.



**Abbildung 16: WB und IF-Bilder zum Überprüfen der induzierbaren Überexpression von RFP-EPB4.1L5 und hCrb2-GFP in HEK293T- und AB8-Zellen,**

Im WB sind in Lysaten von (A) HEK293T- und (B) AB8 RFP EPB4.1L5 hCrb2 GFP-Zellen erhöhte EPB4.1L5-Proteinlevel nach Dox-Induktion nachzuweisen. Auch in der Live-Fluoreszenzmikroskopie ist eine Überexpression von RFP-EPB4.1L5 und Crb2-GFP nach Induktion in (C) HEK293T- und (D) AB8 RFP EPB4.1L5 hCrb2 GFP-Zellen am roten und grünen Farbsignal zu erkennen. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen zuvor mit *Hoechst* inkubiert. Maßstab 20μm

#### 4.2.3 Crb2 und EPB4.1L5 kolokalisieren nicht in doppelt überexprimierenden Zellen

EPB4.1L5 weist in den gemeinsam mit Crb2 transduzierten Zelllinien die gleichen Verteilungscharakteristika auf, wie sie für die HEK293T- und AB8-Zellen zuvor beschrieben wurden (s. 4.1.3), die lediglich eines dieser Proteine überexprimieren. Entsprechend lassen sich Pools von zellmembranständigem, fortsatz- und vesikelassoziertem Protein erkennen. Ebenfalls zytoplasmatisch ist ein schwaches Signal auszumachen.

Crb2 ist nach 48-stündiger Inkubation mit Dox zellmembranständig oder zytoplasmatisch zu finden (s. Abbildung 17).

Die Mehrzahl der Zellen zeigt jedoch nicht rotes und grünes Signal, sondern nur eins der beiden (s. Abbildung 17A2, A3 und B1). Diejenigen Zellen, die sowohl EPB4.1L5 als auch Crb2 überexprimieren, weisen keine überlappende Lokalisation auf. Diese würde durch

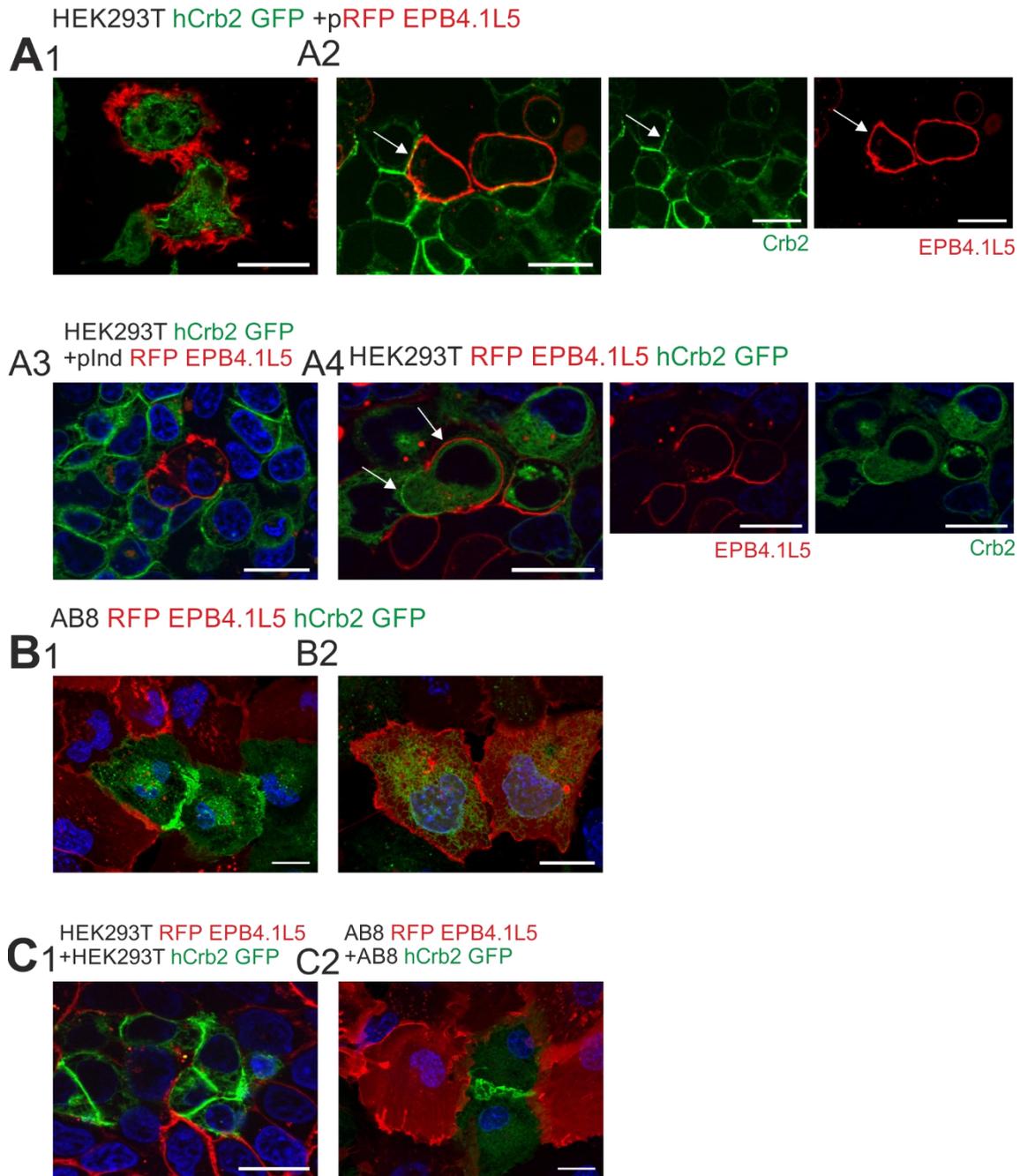
Überlagerung der Farbsignale gelb erscheinen. Stattdessen ist Crb2, das sonst an der Plasmamembran zwischen benachbarten Zellen angereichert vorliegt, in diesen Zellen vor allem intrazellulär und EPB4.1L5 membranständig zu finden (s. Abbildung 17A1, B2). Crb2 scheint dabei in membranartigen Strukturen, möglicherweise dem endoplasmatischen Retikulum (ER), angeordnet zu sein.

Zu erkennen ist, dass das Crb2-Signal insbesondere dort stark ist, wo Zellmembranabschnitte zweier Zellen mit hoher Crb2-Expression interagieren. Die Beobachtung lässt sich auch in den Studien der Zelllinien HEK293T sowie AB8 RFP EPB4.1L5 hCrb2 GFP bestätigen. Diese Anreicherung scheint jedoch unabhängig von EPB4.1L5 stattzufinden, da sie sowohl zu erkennen ist, wenn die Nachbarzelle membranständig EPB4.1L5 exprimiert sowie, wenn sie es nicht tut (s. Abbildung 17A2, s. Pfeile).

EPB4.1L5 ist im Kontrast zu Crb2 in allen Membranabschnitten der überexprimierenden Zellen zu finden – unabhängig davon, ob es sich um eine Nachbarzelle handelt, die EPB4.1L5, Crb2, beides oder keines der genannten Proteine überexprimiert.

Eine Zelle kann an unterschiedlichen Membranabschnitten je das eine oder andere Protein überexprimieren (s. Abbildung 17A4, s. Pfeile).

In einer Kultur, in der gemischt HEK293T/AB8 RFP EPB4.1L5 und HEK293T/AB8 hCrb2 GFP-Zellen vorliegen, bestätigt sich das Verteilungsbild hinsichtlich der Zellen, die lediglich eins der beiden Proteine überexprimieren (s. Abbildung 17C). Gegenüber den doppelt überexprimierenden Zellen kann hier davon ausgegangen werden, dass auch geringere Expressionslevel eines der Proteine innerhalb einer Zelle keinen Einfluss auf die Lokalisation des jeweils anderen Proteins nehmen. Verglichen mit einer Kultur bestehend aus nur einer Zelllinie könnten jedoch besser interzelluläre Stabilisierungs- oder Verdrängungsmechanismen beobachtet werden.



**Abbildung 17: Fluoreszenzbilder zur Verteilung von EPB4.1L5 in Kombination mit Crb2 in HEK293T- und AB8-Zellen, die diese Proteine überexprimieren**

(A) und (B) zeigen Fluoreszenzaufnahmen von HEK293T- (A) und AB8-Zellen (B), die sowohl EPB4.1L5 (RFP) als auch Crb2 (GFP) überexprimieren. In (C) wurden Mischkulturen von (C1) HEK293T RFP EPB4.1L5 und HEK293T hCrb2 GFP und (C2) AB8 RFP EPB4.1L5 und AB8 hCrb2 GFP angelegt. EPB4.1L5 ist, wie in 4.1.3 beschrieben, membranständig, fortsatz- und vesikelassoziiert vorliegend. Es ist an allen Membranabschnitten zu finden wohingegen Crb2 dort angereichert ist, wo zwei Crb2-überexprimierende Zellen nebeneinander liegen. Eine membranständige Lokalisation von EPB4.1L5 und Crb2 scheint sich nicht auszuschließen (A2, s. Pfeile). Möglich ist auch die Expression der beiden Proteine an verschiedenen Membranabschnitten einer Zelle (A4, s. Pfeile). Maßstab 20µm

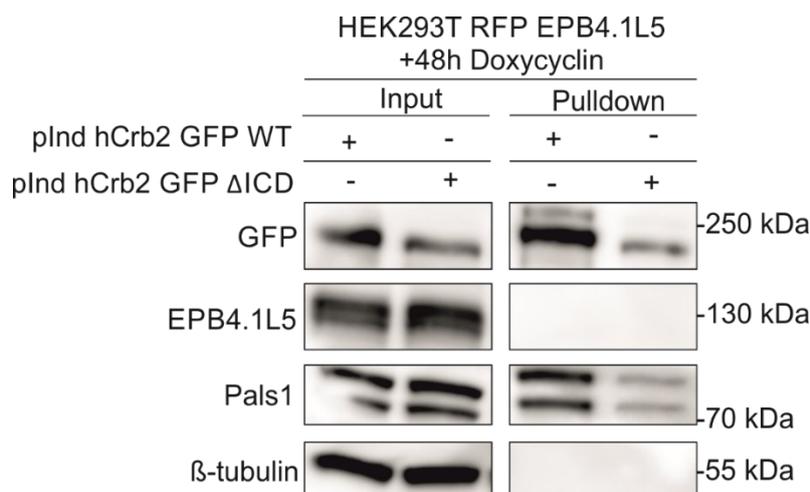
#### 4.2.4 EPB4.1L5 und Crb2 zeigen keine Interaktion in der Ko-IP

Da die fehlende Kolo-kalisation in den doppelt-überexprimierenden Zellen die Frage aufwirft, ob wirklich eine Interaktion vorliegt, wurden Ko-IPs mittels GFP-Trap (s. 3.4.5) durchgeführt, um die in der Literatur beschriebene Interaktion von EPB4.1L5 und Crb2 zu überprüfen (22, 45).

Hierzu wurden beide Proteine zusammen in HEK293T-Zellen überexprimiert. Zusätzlich wurde eine GFP-markierte Crb2-Variante genutzt, der die intrazelluläre Domäne fehlt (pInd hCrb2 GFP ΔICD). Aufgrund der nicht vorhandenen intrazellulären Domäne der hCrb2 GFP ΔICD-Variante sollte eine Bindung des intrazellulären Proteins EPB4.1L5 nicht möglich sein.

Im Input (s. Abbildung 18) erkennt man, dass die Transfektion der Crb2-Varianten funktioniert hat. Die starken EPB4.1L5-Signale indizieren, dass auch die Induktion der Überexpression durch Dox erfolgreich war. Pals1 liegt in den Zellen endogen vor. Das β-Tubulinsignal zeigt als Ladungskontrolle eine gleichmäßige Proteinmenge der Lysate an.

Im Pulldown lässt sich wiederum ein GFP-Signal in beiden Proben erkennen, was für einen erfolgreichen GFP-Trap spricht. Pals1 ist als bekannter Bindungspartner der intrazellulären Domäne von Crb2 ist durch die Ko-IP nachweisbar. Auch im hCrb2 GFP ΔICD-transfizierten Lysat führt eine geringe Menge an Pals1 zu einem Signal. Durch die fehlende intrazelluläre Domäne von Crb2, die als Bindungspartner von Pals1 dient, ist dieses deutlich reduziert, ein Hintergrundsignal jedoch vorhanden. EPB4.1L5 lässt sich in diesem Versuch nicht im Pulldown finden. Dies kann darauf hinweisen, dass die Crb2-EPB4.1L5-Interaktion schwach oder, entgegen der Erwartungen, nicht vorhanden ist.



**Abbildung 18: WB der Ko-IP von HEK293T RFP EPB4.1L5-Zellen**

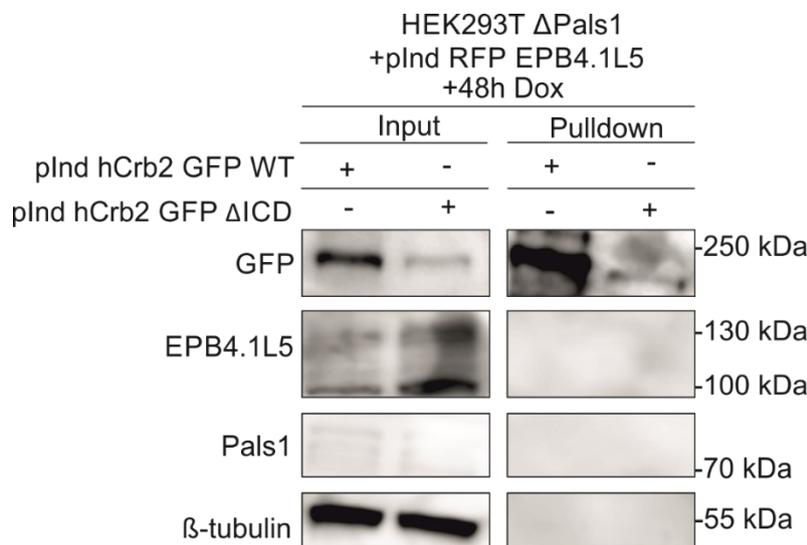
Das EPB4.1L5-Signal im Input zeigt eine erfolgreiche Überexpression dieses Proteins an. Ebenso indiziert das GFP-Signal das Vorliegen von humanem Crb2 WT und ΔICD. Pals1 dient als bekannter Interaktionspartner von Crb2 als Kontrolle. Die erfolgreiche Ko-IP von Pals1 indiziert ein erfolgreiches Experiment. Im Pulldown lässt sich weder in der WT- noch in der ΔICD-hCrb2-Variante EPB4.1L5 nachweisen. Dies kann auf eine schwache Interaktion hinweisen oder eine Bindung infrage stellen. (n=2)

#### 4.2.5 Unter Pals1-Defizienz ist keine EPB4.1L5-Crb2-Interaktion nachweisbar

Um auszuschließen, dass Pals 1 als starker Bindungspartner von Crb2 zu einer Inhibition der Interaktion zwischen EPB4.1L5 und Crb2 führt, wurde für einen weiteren Versuchsaufbau eine Zelllinie genutzt, die Pals1-defizient ist. Um wiederum hohe Proteinlevel von EPB4.1L5, Crb2 WT und Crb2  $\Delta$ ICD zu erhalten, wurden in diesem Fall sowohl pInd RFP EPB4.1L5 als auch je entweder pInd hCrb2 GFP WT oder pInd hCrb2 GFP  $\Delta$ ICD transient transfiziert.

Im Input geben das GFP- und EPB4.1L5-Signal die Transfektion der entsprechenden Plasmide an (s. Abbildung 19). Eine Pals1-Bande ist aufgrund der gewählten Zelllinie nicht zu erwarten.

Die GFP-Signale im Pulldown zeigen, dass die Präzipitation funktioniert hat. Trotz fehlenden Pals1 ist auch hier keine EPB4.1L5-Bande zu erkennen. Daher kann auch mit diesem Versuchsaufbau die These einer starken Crb2-EPB4.1L5-Interaktion nicht gestützt werden.



**Abbildung 19: WB der Ko-IP von HEK293T  $\Delta$ Pals1- Zellen**

Im Input geben das GFP- und EB4.1L5-Signal die Transfektion der entsprechenden Plasmide an. Eine Pals1-Bande ist aufgrund der gewählten Zelllinie nicht zu erwarten. Die GFP-Signale im Pulldown zeigen, dass die Präzipitation funktioniert hat. Trotz fehlendem Pals1 ist auch hier keine EPB4.1L5-Bande zu erkennen. Dies gibt Hinweise darauf, dass die Bindung entweder schwach oder nicht vorhanden sein könnte. (n=2)

#### 4.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass EPB4.1L5 entlang der Zellmembran und in Fortsätzen hochangereichert vorliegt. Die EPB4.1L5-überexprimierenden Zellen sind zudem sehr fortsatzreich. Darüber hinaus ist ein vesikulärer, zum Teil lysosomaler, Pool zu finden.

Das *Tight Junction*-Protein ZO1 weist in EPB4.1L5-überexprimierenden gegenüber uninduzierten Zellen ein verändertes Verteilungsmuster auf, bei dem die sonst clusterartige Anordnung aufgelöst erscheint. Demgegenüber liegen für einen Einfluss der EPB4.1L5-

Überexpression auf FA-assoziierte Proteine sowie Komponenten des wnt-, mTOR-, AKT- oder Hippo-Signalwegs nach den hier durchgeführten Experimenten keine Hinweise vor.

IF-Studien zeigen keine spezifische Kollokalisierung von Crb2 und EPB4.1L5. Dieses Ergebnis passt mit den in dieser Arbeit durchgeführten Ko-IPs zusammen, die zumindest keine starke Interaktion der beiden Proteine nachweisen können. Die in der Literatur beschriebene Crb2-EPB4.1L5-Bindung muss hier daher neu diskutiert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Generierung von Zellsystemen zur Überexpression von EPB4.1L5

Da der derzeitige Forschungsstand zu EPB4.1L5 weiterhin viele Fragen über dessen zellbiologische Funktionen und Aufgaben zulässt, wurden in dieser Arbeit zur weiteren Aufklärung unterschiedliche Zellsysteme zur Überexpression von EPB4.1L5 generiert und charakterisiert. Die erzeugten Systeme weisen verschiedene Vor- und Nachteile auf und lassen sich daher jeweils für spezifische Fragestellungen besonders gut nutzen.

Die Vektoren zur transienten Transfektion sind für den direkten Gebrauch in transfektionsfähigen Zelllinien verfügbar. Als Kontrollzellen lassen sich nicht-transfizierte Zellen nutzen.

Die Konstrukte pRFP EPB4.1L5 sowie pInd RFP EPB4.1L5 weisen eine N-terminale Fluoreszenzmarkierung von EPB4.1L5 auf, was unter dem Fluoreszenzmikroskop eine Echtzeitbeobachtung des Proteins in lebendigen Zellen erlaubt. Nicht außer Acht gelassen werden darf, dass das RFP durch seine Konformation mit der räumlichen Struktur von EPB4.1L5 oder seiner Umgebung interferieren und dadurch zellbiologische Funktionen stören könnte. Diese Fehlerquelle besteht beim Einsatz des ungetaggen Vektors pCMV Sport 6 EPB4.1L5 nicht.

Zusätzlich wurden stabile HEK293T- und AB8-Zelllinien mit induzierbarer EPB4.1L5-Überexpression generiert. Diese lassen sich nach Belieben kultivieren und für Experimente einsetzen, da das Prozedere der Transfektion hier nicht nötig ist. Eine Überexpression von EPB4.1L5 ist durch Dox-Zugabe jederzeit möglich. Als Kontrolle können nicht-induzierte Zellen verwendet werden, da sie kaum Hintergrundaktivität aufweisen.

Die Überexpression von EPB4.1L5 wurde sowohl für die transient transfizierten Systeme als auch die stabilen Zelllinien im WB bestätigt (s. Abbildung 8 und Abbildung 9). Die Zellsysteme weisen eine 100 kDa-Bande auf, die von einem EPB4.1L5-Antikörper erkannt wird und in Kontrollzellen nicht vorhanden ist. Das Protein läuft mit 100 kDa etwas höher, als man aufgrund des Proteingewichts der längsten Isoform – 733 Aminosäuren und 82 kDa – erwarten würde (s. Abbildung 8). Dieser Effekt wurde jedoch auch schon von Gosens et al. (22) sowie für das Zebrafisch-Ortholog beschrieben (33). Als Erklärung dafür werden posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen, herangezogen (22, 33, 45).

Ist EPB4.1L5 mit RFP gekoppelt, ist die Bande, entsprechend des Gewichts des Fluoreszenzproteins, bei 130 kDa zu finden (s. Abbildung 8).

Zudem konnte die Proteinexpression im Fall der fluoreszenzmarkierten Konstrukte in der Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden, wo je eindeutige rote Signale zu erkennen waren, die in den Kontrollzellen nicht vorkamen (s. Abbildung 8 und Abbildung 9).

Die Etablierung von EPB4.1L5-Überexprimierungssystemen ist von Interesse, da anhand dessen der Einfluss des Proteins auf die gesamte Zellbiologie erforscht werden kann. Obwohl nachgewiesen werden konnte, dass EPB4.1L5 *in vivo* in Podozyten hochexprimiert vorliegt (76), ist es in entsprechenden immortalisierten Zellen, den AB8-Zellen, in der Zellkultur genauso wie in HEK293T-Zellen eher schwach exprimiert (s. Abbildung 8). Um mehr über die Rolle von EPB4.1L5 in der Zelle zu erfahren, kann daher *in vitro* eine Überexpression von EPB4.1L5 zur Annäherung an die oben genannten *in vivo*-Zustände hilfreich sein.

EPB4.1L5 KO-Mäuse sind embryonal letal und ein podozytenspezifischer KO führt zur Ablösung dieser Zellen von der ECM. Diese Podozytendepletion führt dann zu einer schweren Proteinurie der Tiere, die mit einer verminderten Lebensdauer einhergeht (47, 76). In Nierenbiopsien von Patienten mit FSGS oder Nephropathie konnte ein verändertes Verteilungsmuster von EPB4.1L5 festgestellt werden, was Werkzeuge zur Erforschung der zellbiologischen Bedeutung dieses Proteins zusätzlich interessant macht (76).

## **5.2 Lokalisationsstudien zu EPB4.1L5**

### **5.2.1 EPB4.1L5 hat eine starke Zellmembran-Assoziation**

Die intrazelluläre Verteilung von EPB4.1L5 wurde in stabilen, überexprimierenden HEK293T- und AB8-Zellen analysiert (s. 4.1.3).

Das Protein erscheint, übereinstimmend mit vorigen Beschreibungen, zellmembranständig lokalisiert. Zwar wurde EPB4.1L5 als Interaktionspartner von Crb2, Paxillin und Pals1 beschrieben (22, 29, 45), die alle zumindest temporär zellmembrannah oder transmembranös liegen. Jedoch ist die starke zellmembranassoziierte Lokalisation, die ebenso in anderen Zellkultursystemen beobachtet wurde sehr interessant (47). Ihr konstantes Vorliegen, das in verschiedenen Ebenen und Membranabschnitten vorzuliegen scheint (s. Abbildung 10), könnte für eine direkte Zellmembran-Bindung sprechen. Anders als Crb2, welches ein Transmembranprotein ist, ist EPB4.1L5 unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen zellmembranständig zu finden. FERM-Proteine sind dafür bekannt, dass sie als Verbindung zwischen Transmembranproteinen und Zytoskelettkomponenten fungieren und als solche in der Zellperipherie liegen (s. 1.1) (6, 11). Unabhängig von einem Transmembranprotein als Interaktionspartner, der die zellmembranständige Lokalisation beeinflusst, könnte jedoch eine beispielsweise über Lipidbindungen vermittelte Assoziation zur Zellmembran bestehen. Dafür scheinen N-terminale Anteile, etwa die FERM-Domäne, verantwortlich zu sein, da EPB4.1L5-Mutanten, denen diese Domäne fehlt, nicht an der Plasmamembran zu finden sind (29). Die mögliche Bindung einer FERM-Domäne zu Phospholipiden wurde bereits beschrieben (23). Für das Transmembranprotein Podocin wurde gefunden, dass es in *Lipid Rafts*, Membrandomänen mit einer speziellen Lipid- und Proteinzusammensetzung, des Podozyten

vorliegt und darüber die Verteilung des Schlitzmembranproteins Nephrin reguliert (5, 78). Ähnliche Mechanismen könnten im Hinblick auf EPB4.1L5 und Crb2 erwogen werden. Über posttranslationale Modifikationen von EPB4.1L5, die eine Plasmamembranbindung vermitteln könnten, ist bisher nichts bekannt.

### **5.2.2 EPB4.1L5 ist in Lysosomen und anderen intrazellulären, motilen Vesikeln lokalisiert**

Daneben ließen sich in den EPB4.1L5-Überexpressionssystemen intrazelluläre Signalanreicherungen beobachten (s. 4.1.3). Ähnliches wurde auch für das *Drosophila melanogaster*-Ortholog Yurt beschrieben, das während der Entwicklung in sogenannten zytoplasmatischen Aggregationen zu finden ist (32). Es wird vermutet, dass diese organellassozierte Form inaktiv sein könnte. Die Autoren beziehen sich dabei auf Erkenntnisse über das 4.1-Protein Merlin (43, 55).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass einige der EPB4.1L5-positiven Aggregationen mit einem Lysosomen-Marker kolokalisieren sowie hochmotil sind (s. 4.1.3 und 4.1.3.1). Dies spricht dafür, dass EPB4.1L5 tatsächlich in intrazellulären, beweglichen, beispielsweise endolysosomalen Vesikeln zu finden ist.

Um mehr Hinweise über Abbau und *Turnover* von EPB4.1L5 zu erfahren, wären hier tieferegehende Analysen notwendig, beispielsweise Färbungen mit Antikörpern gegen endosomale, lysosomale oder autophagosomenassoziierte Markerproteine.

### **5.2.3 EPB4.1L5-Überexpressionssysteme sind fortsatzreich und weisen eine hohe Signalanreicherung auf**

Besonders auffällig ist, dass die Zellen mit EPB4.1L5-Überexpression sehr viele kleine filamentöse Zellfortsätze (Protrusionen) aufweisen. Diese zeigen im *live cell imaging* starke Signale für RFP-markiertes EPB4.1L5 und erstrecken sich verzweigt entlang des Deckglases (s. Abbildung 10). Im Vergleich ist dieser Phänotyp bei hCrb2-GFP-überexprimierenden Zellen nicht zu beobachten. Bereits früher wurde berichtet, dass EPB4.1L5-überexprimierende Zellen gegenüber WT-Zellen mehr Zellfortsätze ausbilden können (29, 47). Da sowohl HEK293T- als auch AB8-Zellen adhärenente Zelllinien sind, bilden diese auf einer Oberfläche im Rahmen des sogenannten *cell spreading* durch radiale F-Aktin-Polymerisierung solche Protrusionen und auch FAs aus. Studien in Podozyten zeigten, dass EPB4.1L5 eine hochangereicherte FA-Komponente ist und über die Rekrutierung von GEFs sowie eine folgende Signalkaskade für eine Aktinpolymerisierung und damit Reifung der FAs mitverantwortlich sein kann (s. 1.2.1 und 1.1.2) (35, 63, 64, 76). Vor allem für den Podozyten, dessen Sekundärfortsätze aktinbasiert und für die Funktion der Niere von entscheidender Bedeutung sind, könnte EPB4.1L5 damit

von großer Relevanz sein. In der Tat zeigen Mäuse, denen EPB4.1L5 in Podozyten fehlt, eine Fehlbildung der Schlitzmembran (76).

Die protrusionsreiche Morphologie der überexprimierenden Zellen, zusammengenommen mit der zellmembranassoziierten Lokalisation von EPB4.1L5, sprechen dafür, dass sich diese für den Podozyten beschriebenen Funktionen des Proteins auch auf die hier verwendeten Zelllinien übertragen lassen. Die EPB4.1L5-Überexpression könnte dementsprechend über die Aktivierung von Aktinpolymerisierung zu einer Verstärkung der Fortsatzbildung führen.

### **5.3 Einfluss von EPB4.1L5-Überexpression auf die Quantität und zelluläre Verteilung FA-assoziiierter Proteine**

Für Podozyten sind ihre zahlreichen Zellfortsätze neben dem Aufbau der Schlitzmembran auch für die Adhäsion an der GBM von größter Bedeutung (5, 51). Die zuvor beobachtete protrusionsreiche Morphologie (s. 5.2.3) weist darauf hin, dass sich die Funktion von EPB4.1L5, an der Zellfortsatzausbildung beteiligt zu sein, auf die hier verwendeten EPB4.1L5-Überexpressionssysteme übertragen lässt. Sie war bereits für den Podozyten beschrieben worden (76). Da die Mechanismen der Ausbildung von solchen Lamello- und Filopodien eng mit der Formation der Zell-ECM-Kontakte, FAs, verknüpft sind (s. 1.1.2), hätte man unter EPB4.1L5-Überexpression mit einer vermehrten Ausprägung beziehungsweise Umverteilung von FA-assoziierten Proteinen rechnen können. Daher ist deren Betrachtung an dieser Stelle interessant. Entgegen der Erwartungen fällt jedoch weder im WB ein Einfluss von EPB4.1L5 auf die intrazelluläre Quantität der FA-assoziierten Proteine Talin, Vinculin, Zyxin und Paxillin auf noch sind in den IF-Färbungen der Proteine Zyxin und Paxillin Unterschiede in der Verteilung zwischen EPB4.1L5-über- und -nicht-überexprimierenden HEK293T- und AB8-Zellen zu erkennen (s. Abbildung 12). Für eine akkurate Analyse ist eine quantitative Auswertung im Weiteren nötig, jedoch sind bereits die Beobachtungen von Interesse. So zeigen EPB4.1L5-GFP-transfizierte T47D-Zellen im Gegensatz zu den hier gewonnenen Ergebnissen eine deutliche Vermehrung von Paxillin-positiven FAs. Zugrunde liegt wohl eine Stärkung der Integrin $\beta$ 1-Paxillin-Bindung (29).

Da EPB4.1L5 vor allem eine Rolle bei der Reifung von FAs spielen soll (76), ist es denkbar, dass die EPB4.1L5-Hochregulation durch Induktion in den hier verwendeten Zellen erst nach Abschluss der Reifung stattgefunden hat. Dann hätte eine EPB4.1L5-Überexpression möglicherweise keinen Einfluss auf die FA-Ausprägung und -Verteilung mehr gehabt. Da die für die IF und WB genutzten Zellen aus konfluenten Zellkulturschalen stammen, in denen kaum noch Dynamik möglich ist, liegen im Moment der Betrachtung vorwiegend reife FAs vor, für die bisher keine EPB4.1L5-Beteiligung beschrieben wurde. Sinnvoll wäre es dementsprechend, die FA-Expression und -Verteilung in Zellen miteinander zu vergleichen,

bei denen eine EPB4.15-Hochregulation in dynamischen oder aber weniger dynamischen, beispielsweise konfluenten Phasen stattgefunden hat.

EPB4.1L5 interagiert über seinen C-Terminus mit Paxillin (29), weshalb eine kolokalisierende Anreicherung der Proteine EPB4.1L5 und Paxillin anzunehmen war. Während Zyxin und Paxillin in den Bildern dieser Arbeit FA-assoziiert in Clustern erscheinen, weist EPB4.1L5 jedoch ein eher flächiges Verteilungsmuster auf. Die Signale von Zyxin beziehungsweise Paxillin und EPB4.1L5 überlappen sich dementsprechend, präzise kolokalisiert wirken sie allerdings nicht. Dies steht den Beobachtungen in NIH3T3-Zellen und primären Podozyten entgegen, die eine solche Kolokalisation zeigten (29, 76). Das wirft die Frage auf, ob die Paxillin-EPB4.1L5-Interaktion in den hier verwendeten Zellen tatsächlich vorliegt. Entsprechend den vorhergehenden Überlegungen wäre von Interesse, die Paxillin-EPB4.1L5-Bindung in dynamischen und nicht-dynamischen Zellen miteinander zu vergleichen und zu überprüfen, ob in ersterem Fall eine präzise FA-Lokalisation von EPB4.1L5 zu beobachten wäre. Diese Idee wird durch Studien gestützt, die mit den FAs kolokalisierende EPB4.1L5-Cluster auf der führenden Seite migrierender Zellen fanden (29).

In Migrationsassays wäre es darüber hinaus möglich, den Einfluss von EPB4.1L5 auf die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zellen zu beurteilen. Es wurde vermutet, dass eine EPB4.1L5-induzierte FA-Verstärkung dazu führen könnte, dass das *Turnover*, der Ab- und wieder Aufbau an einer neuen Lokalisation, erschwert ist und zu verminderter Motilität und gestörtem *cell spreading* führt (29, 39). Über den Einfluss von EPB4.1L5 auf Zellmotilität gibt es sehr unterschiedliche Aussagen. In hepatozellulären Krebszellen führt EPB4.1L5 zu verminderter Migration (10). In Podozyten hingegen wird dieser Effekt durch einen Verlust von EPB4.1L5 erzielt (76). Wie in 1.1.2 beschrieben spielt EPB4.1L5 eine Rolle bei der EMT, indem es Zell-Zell-Kontakte lösen und FAs induzieren kann. Dementsprechend wurde EPB4.1L5 bei verschiedenen Tumorarten, wie Brustkrebs oder Nierenzellkrebs, als hoch exprimiert sowie prognostisch ungünstig gefunden, indem es die Invasivität und das Metastasierungspotential erhöht (26, 27). Analog seines Einflusses auf das Migrationsverhalten, scheint dies für das hepatozelluläre Karzinom genau umgekehrt zu sein, wo eine hohe EPB4.1L5-Expression mit einer günstigeren Prognose einhergeht (10).

Möglich wäre daher, dass ein regulatorischer Einfluss durch EPB4.1L5 auf FAs ein zelllinien- oder zelltypspezifischer Effekt ist. T47D-Zellen sind Brustkrebszellen, während HEK293T- und AB8-Zellen embryonale Nierenzellen und Podozyten sind. Bei der Linie NIH3T3 wiederum handelt es sich um embryonale Fibroblasten. Die Tatsache, dass EPB4.1L5 unterschiedlich stark in unterschiedlichen Zelltypen und Geweben exprimiert ist, spricht ebenfalls dafür, dass seine Aufgaben Zelltyp- bzw. Zelllinien-spezifisch sind (22). Es ist bekannt, dass die Adhäsion in verschiedenen Zelltypen auch verschieden reguliert ist. Etwa der FA-assoziierten Kinase (FAK) werden zelllinienspezifische Mechanismen zugeschrieben (57).

Ein möglicher Mechanismus zur zelltypspezifischen Regulation der Rolle von EPB4.1L5 könnte alternatives Splicing sein. Denn mithilfe des Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 (ESRP1), das spezifisch in Epithelien vorkommt, kann EPB4.1L5 zu einer kürzeren Isoform (505 Aminosäuren) modifiziert werden, der nun die Paxillin-Bindedomäne fehlt. Die FERM-Domäne zur Bindung von p120-catenin bleibt jedoch erhalten, weshalb die Stabilisierung von *Adherens Junctions*, also Zell-Zell-Kontakten, potenziell stattfinden könnte, eine FA-Induktion sowie Aktinpolymerisierung hingegen unterbunden werden würde (14, 92).

#### **5.4 EPB4.1L5 zeigt keinen regulatorischen Einfluss auf den wnt-, AKT-, mTOR- und Hippo-Signalweg**

Da für den möglichen EPB4.1L5-Interaktionspartner Crb ein Einfluss auf wichtige zelluläre Signalwege, wie den mTOR, den Hippo- oder den Notch-Signalweg, beschrieben wurde, sollte hier ein solcher durch EPB4.1L5 überprüft werden (24, 28, 61, 65).

Die hier durchgeführten WB zeigen jedoch keine regulatorische Aktivität auf das Expressionslevel von wichtigen Komponenten des wnt-, AKT-, mTOR- oder Hippo-Signalwegs durch die Überexpression von EPB4.1L5 in HEK293T-Zellen (s. Abbildung 14).

Über einen Einfluss von EPB4.1L5 auf wichtige Komponenten relevanter zellulärer Signalwege war bisher nichts bekannt. Lediglich Moe wird eine antagonistische Rolle zu Crb bezüglich der Regulation des Notch-Signalwegs in neuroepithelialen Zellen zugeschrieben (61). Aufwendigere RNAseq Screenings oder Proteomanalysen in verschiedenen Zelllinien könnten mehr Aufschluss über den Einfluss von EPB4.1L5 auf Signalwege geben.

#### **5.5 Generierung von stabilen Zelllinien zur gemeinsamen Überexpression von EPB4.1L5 und Crb2**

Ein weiterer Teil der Arbeit bestand daraus, die Beziehung zwischen EPB4.1L5 und Crb2 zu untersuchen.

Bei Betrachtung der Proteinlevel in HEK293T-EPB4.1L5- oder HEK293T-Crb2-Überexpressionssystemen fällt auf, dass sich die Quantität des jeweils anderen Proteins bei Überexpression von EPB4.1L5 oder Crb2 in diesen *in vitro*-Modellen nicht verändert (s. Abbildung 15).

Bei einer starken, funktionellen Abhängigkeit könnte man sich je eine konsekutive Hochregulierung vorstellen, um die physiologischen Funktionen zu erhalten.

Um Zellmodelle zu erhalten, in denen sich der Einfluss eines hohen Crb2- sowie EPB4.1L5-Proteinlevels zur selben Zeit untersuchen lassen, wurden in dieser Arbeit erstmals stabile HEK293T- und AB8-Zelllinien mit einer doppelten, induzierbaren Überexpression generiert. Analog zu den einfach-überexprimierenden Zellen wurde die Expression im WB und der IF-Mikroskopie bestätigt (s. Abbildung 16).

## 5.6 EPB4.1L5 und Crb2 kolokalisieren nicht

Sowohl in den stabilen und transient transfizierten HEK293T- als auch den AB8-Zellen entspricht die EPB4.1L5-Lokalisation der in den einfach-überexprimierenden Zellen (s. 5.2, s. Abbildung 17). Die zusätzliche Überexpression von Crb2 scheint hierauf keinen Einfluss zu nehmen.

Es fällt auf, dass nur wenige Zellen eine echte Kolokalisation (gelbes Farbsignal) aufweisen, das für eine gleichzeitige Überexpression sowie eine Kolokalisation sprechen würde.

Jedoch ist zu beobachten, dass in der Mehrzahl der Zellen gar keine doppelte Hochregulation der Proteinexpression stattfindet. Auch in den transient mit RFP-markiertem EPB4.1L5 transfizierten Zellen ist das Crb2-Signal der erfolgreich transfizierten Zellen schwächer als das der nicht-transfizierten – wenn nicht sogar vollkommen abwesend.

Dies deutet darauf hin, dass entweder gerade jene Zellen transfiziert werden, die wenig Crb2 exprimieren, oder aber, dass erfolgreich transfizierte Zellen die Crb2-Expression herunterregulieren. Im Fall der stabilen Zelllinien bestehen die Optionen, dass eine Zelle favorisiert, nur einen Vektor aufzunehmen oder aber, dass, bei Transduktion beider, die Expression eines Vektors herunterreguliert wird. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass die Überexpression lediglich eines der beiden Proteine von Vorteil für die Zelle ist.

In den Fällen, in denen eine Zelle beide Farbsignale exprimiert, überlappen sich diese kaum. EPB4.1L5 ist dann eher membranständig und Crb2 intrazellulär lokalisiert, wobei die Verteilung von Crb2 dabei sehr an eine ER-assoziierte Lokalisation erinnert. Bei einer Interaktion würden sich EPB4.1L5 und Crb2 an derselben Stelle wiederfinden und somit als gelbes Farbsignal zu erkennen sein. An wenigen Zellen ist zu erkennen, dass dies möglich, jedoch die absolute Ausnahme ist. Das steht der bisherigen Literaturmeinung, nach der Crb2 und EPB4.1L5 interagieren und somit kolokalisieren würden, eher entgegen (22, 45). In Crb-überexprimierenden *Drosophila melanogaster* etwa wurde gefunden, dass Crb das EPB4.1L5-Ortholog Yurt vermehrt rekrutiert und dieses dann mit Crb kolokalisiert (45). Ein analoges Bild ist hier nicht zu beobachten. Eine Möglichkeit könnte sein, dass Crb2 durch EPB4.1L5 aus der Membran verdrängt wird. Dies wiederum könnte allerdings am stark überexprimierten sowie zusätzlich fluoreszenzmarkierten EPB4.1L5 liegen. Um das auszuschließen, wären beispielsweise IF-Färbungen an Zellen sinnvoll, die nicht-fluoreszenzmarkiertes EPB4.1L5 und Crb2 exprimieren. Durch unterschiedliche Transfektionsmengen von EPB4.1L5 könnten zusätzlich dosisabhängige Effekte von EPB4.1L5 untersucht werden.

Interessanterweise lässt sich eindeutig ein unterschiedliches Verteilungsmuster von EPB4.1L5 und Crb2 erkennen. So ist EPB4.1L5 gleichmäßig an allen Membranabschnitten lokalisiert. Crb2 hingegen ist in jenen Zellmembranen angereichert, die Kontakte zu anderen Crb2-überexprimierenden Zellen ausbilden. Letztere Beobachtung wurde auch in Studien der AG

Pavenstädt gemacht und ist vermutlich durch eine stabilisierende, homophile Interaktion der extrazellulären Proteinanteile zu erklären (58, 88). Diese Crb2-Anreicherung wurde vereinzelt ebenfalls in Zellen beobachtet, die EPB4.1L5 sowie Crb2 exprimieren. Das zeigt, dass EPB4.1L5 diese Anreicherung nicht komplett, möglicherweise dosisabhängig, unterbindet. Es fielen zudem Zellen auf, die in einem Membranabschnitt Crb2, in einem anderen jedoch EPB4.1L5 überexprimieren. Denkbar ist, dass homophile Interaktionen die Crb2-Zellmembran-Lokalisation stützen. In Bereichen, in denen eine Crb2-negative oder keine Nachbarzelle vorliegt, könnte sich dann EPB4.1L5 als zellmembranständig durchsetzen.

### **5.7 EPB4.1L5 und Crb2 zeigen im Pulldown keine Interaktion**

Da die fehlende Kolo-kalisation nicht für die zuvor beschriebene Interaktion von EPB4.1L5 und Crb2 spricht, wurde daraufhin eine Ko-IP der beiden Proteine durchgeführt. Diese zeigte keine Präzipitation von EPB4.1L5 durch Zug an Crb2 (s. Abbildung 18).

Das widerspricht der Erkenntnis von Laprise et al. (45) und Gosens et al. (22). In Glutathion-S-Transferase (GST)-Pulldown Experimenten an mit cDNA von EPB4.1L5 und Crb2 transfizierten HEK293T-Zellen wurde die Interaktion nachgewiesen.

Demgegenüber wurde zusätzlich gezeigt, dass Yurt und Crb nur in solchen Geweben ko-immunopräzipitieren, in denen auch eine Kolo-kalisation auf zellulärer Ebene festgestellt wurde (45). Da diese in den hier verwendeten HEK293T-Zellen kaum beobachtet wurde, stützt dies das Ergebnis der Ko-IP.

Ein wesentlicher Unterschied des hier durchgeführten Pulldowns zu den Experimenten von Laprise und Gosens et al. (22, 45) ist die RFP- und GFP-Markierung der Proteine. Die GFP-Markierung von Crb2 befindet sich innerhalb des Proteins, während EPB4.1L5 N-terminal RFP-markiert vorliegt. Die Fluoreszenzproteine sind verhältnismäßig klein (238 und 225 Aminosäuren lang), allerdings kann eine Interferenz mit der Bindungsstelle oder der für die Bindung nötigen räumlichen Konformation insbesondere für EPB4.1L5-RFP nicht ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist bei der GFP-Markierung von Crb2, durch ihre Lokalisation innerhalb des Proteins, deutlich geringer.

Wie in 1.1.1 angedeutet, ist sich die Literatur über ein Zusammenspiel von EPB4.1L5 und Crb im Säugetier jedoch durchaus nicht einig, was eine Interaktion wiederum infrage stellen kann. So werden Yurt und Moe übereinstimmend Funktionen bei der Regulation von epithelialer Polarität zugeschrieben (18, 19, 33, 45, 46, 66). Jedoch konnten bisher keine Polaritätsdefekte oder eine veränderte Crb-Verteilung in EPB4.1L5-mutierten Mäusen beobachtet werden (29, 47, 76).

In der Fliege und im Zebrafisch ist gesehen worden, dass die entsprechenden EPB4.1L5-Orthologe hemmend auf das apikale Membranwachstum von Zellen in Epithelien und damit als Gegenspieler zu Crb wirken (18, 33, 45, 46).

Tatsächlich konnte diese Beobachtung auch in MDCK- und anderen epithelialen Zellen gemacht werden. EPB4.1L5-Defizienz führt zu deren Abflachung infolge von vergrößerten apikalen und basalen, jedoch verkürzten lateralen Membranen (46). EPB4.1L5-Transfektion bewirkt das Gegenteil. Allerdings wurde keine Hochregulation von Crb festgestellt, was wiederum gegen einen negativ regulatorischen Einfluss auf diesen apikalen Membranregulator spricht (59).

Sinnvoll ist definitiv, das hier durchgeführte Experiment mit unmarkierten oder C-terminal getaggtten EPB4.1L5 Proteinvarianten zu wiederholen. Die Möglichkeit einer Unterbindung der Interaktion durch die Fluoreszenzproteine könnte somit ausgeschlossen werden.

Interessanterweise deutet die Literatur auch darauf hin, dass Unterschiede zwischen den Funktionen der verschiedenen EPB4.1L5-Orthologe bestehen können. Deshalb sollte das für Yurt beschriebene enge Wechselspiel mit Crb nicht einfach auf Crb2 und EPB4.1L5 übertragen werden. Nicht zuletzt, weil im Menschen und in der Maus neben EPB4.1L5 ein weiteres Homolog, EPB4.1L4B, vorkommt, über dessen Funktionen bisher wenig bekannt ist. In Analogie zur Fruchtfliege wäre es allerdings möglich, dass eine EPB4.1L5-Crb2 Interaktion nur unter bestimmten Signaleinflüssen beziehungsweise in Phasen der Embryogenese vorkommt (46). Nicht zuletzt deuten die sehr ähnlichen Phänotypen von EPB4.1L5-beziehungsweise Crb2-KO auf einen Zusammenhang der Funktionen der beiden Proteine hin (s. 1.1.2 und 1.2.2) (47, 96). Die kaum vorhandene Kolo-kalisation von EPB4.1L5 und Crb2, die in dieser Arbeit beobachtet wurde, macht es wahrscheinlich, dass die Voraussetzungen in den hier betrachteten Zellmodellen nicht zu einer Rekrutierung von EPB4.1L5 in den Crb-Komplex führen. Das könnte dann Grund für eine nicht nachweisbare, potenzielle Interaktion sein.

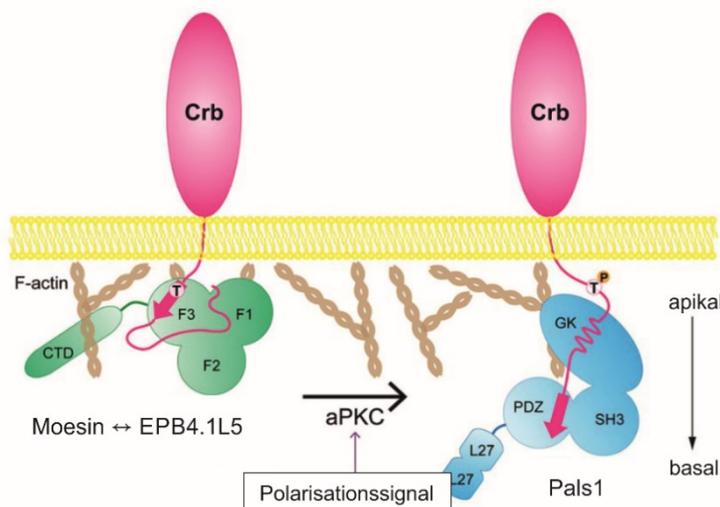
### **5.8 Unter Pals1-Defizienz ist keine EPB4.1L5-Crb2-Interaktion nachweisbar**

Das deutliche Pals1-Signal in der in 4.2.4 durchgeführten Ko-IP zeigt die schon beschriebene starke Interaktion von Crb2 und Pals1 (52). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass diese Bindung die Interaktion zu EPB4.1L5 unterbinden könnte, wurden für eine weitere Ko-IP Pals1-defiziente HEK293T-Zellen lysiert. Auch hier führte der Zug an Crb2 nicht zur Präzipitation von EPB4.1L5. Das bedeutet, dass eine starke Bindung von Pals1 an Crb2 nicht der Grund für eine nicht nachweisbare Interaktion zwischen EPB4.1L5 und Crb2 in diesem Experiment ist. Diese Arbeit liefert damit keine Bestätigung dafür, dass eine Interaktion zwischen EPB4.1L5 und Crb2 vorliegt. Aus den in 5.7 diskutierten Gründen und da sie in vorhergehender Literatur beschrieben wurde, ist eine EPB4.1L5-Crb2-Bindung allerdings nicht vollkommen auszuschließen.

Während Pals1 mit dem C-Terminus von Crb2 interagiert, soll EPB4.1L5 das über die FERM-Domäne tun (22, 45, 52). Theoretisch können somit beide Proteine zur selben Zeit mit Crb2

interagieren. Tatsächlich wurde auch eine EPB4.1L5-Pals1-Interaktion nachgewiesen (22). Das Vorliegen eines ternären Komplexes aus Crb, Pals1 und EPB4.1L5 konnte bisher nicht gezeigt werden. Über 4.1- (s. 1.1) und membranassoziierte Guanylatkinasen (MAGUK)-Proteine, wie EPB4.1L5 und Pals1, ist jedoch bekannt, dass sie gemeinsam in ternären Komplexen vorliegen können (31, 60).

Neben Pals1 und EPB4.1L5 sind weitere Proteine, wie das FERM-Protein Moesin, identifiziert worden, mit denen Crb2 interagieren kann. Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion zu Moesin *in vivo* zustande kommt, da sie etwa 50-mal schwächer ist als die Crb-Pals1-Bindung. Es konnte gezeigt werden, dass eine aPKC-vermittelte Phosphorylierung des Crb-C-Terminus zur Dissoziation von Moesin führt, während die Pals1-Bindung davon unbeeinflusst bleibt. aPKC könnte somit als Polarisierungssignal einen Bindungswechsel initiieren, der einen Wechsel der Aufgabe von Crb als Zytoskelett-Interaktionsprotein hin zum Polaritätsregulator induziert (s. Abbildung 20) (94). Moesin und EPB4.1L5 gehören beide der Familie der FERM-Proteine an und sind sich daher strukturell ähnlich (3). Eine Rolle von EPB4.1L5 anstelle von Moesin wäre daher denkbar und würde Crb funktionell weiter in eine zellbiologisch zentrale Rolle zwischen epithelialer Morphogenese und apikobasaler Polarität rücken. Ähnliche Überlegungen sind auch über Yurt und Moe entstanden (33, 73).



**Abbildung 20: Regulation von Crb-Interaktionspartnern**

Eine Interaktion von EPB4.1L5 mit Crb könnte ähnlich wie die Bindung zu Moesin reguliert sein. Die Abbildung nach Wei et al. (94) (modifiziert) verdeutlicht deren Hypothese, nach der aPKC, durch Phosphorylierung des Crb-C-Terminus, die Zellpolarisierung begünstigt. Die Bindung zu Moesin wird dadurch gelockert und die Interaktion mit Pals1 favorisiert.

## 5.9 EPB4.1L5 stört die Lokalisation des *Tight Junction*-Protein ZO1 und könnte daher eine Crb-unabhängige Rolle bei der Zellpolarität spielen

Vergleicht man die Verteilung des *Tight Junction*-assoziierten Proteins ZO1 in überexprimierenden mit nicht-überexprimierenden Zellen, so fällt auf, dass die EPB4.1L5-überexprimierenden Zellen eine wesentlich ungeordnetere Verteilung von ZO1 aufweisen.

ZO1 scheint weniger spezifisch an einzelnen Punkten, den *Tight Junctions*, konzentriert zu sein, sondern flächiger im Bereich der Zell-Zell-Kontakte vorzuliegen.

Auch Gosens et al. (22) fanden in EPB4.1L5-überexprimierenden MDCK-Zellen eine Desorganisation dieses Proteins. Darüber hinaus beobachteten sie bei EPB4.1L5-Überexpression eine gestörte Barrierefunktion dieser Epithelzellen. Ähnliches wurde auch in EPB4.1L5-KO-*Drosophila melanogaster* gesehen (46).

Sowohl ihre interzellulär abdichtende Funktion als auch ihre Funktion als Barriere zwischen apikalen und basolateralen Membrankomponenten führen dazu, dass *Tight Junctions* eine essenzielle Funktion beim Erhalt zellulärer Polarität zugeschrieben wird (s. 1.1.1).

Die Aufgaben, die EPB4.1L5 bei der Polarität haben soll, werden in der Literatur überwiegend im Zusammenhang mit seiner Interaktion mit Crb gesehen, die in den verwendeten Zellsystemen in dieser Arbeit jedoch nicht vorzuliegen scheint.

Die Frage ist deshalb, ob EPB4.1L5, unabhängig von Crb2, einen Einfluss auf die *Tight Junction*-Bildung oder generell die Etablierung und Erhaltung von epithelialer Polarität hat.

Über das *Drosophila melanogaster*-Ortholog Yurt liegen diesbezüglich mittlerweile einige Erkenntnisse vor, die in 1.1.1 vorgestellt wurden. Hier wird durchaus zwischen einer Phase unterschieden, in der Yurt Crb-ungebunden auf die Polarität wirkt, und einer späteren, in der es als Teil des Crb-Komplexes vorliegt (18, 45, 46). Jedoch existieren in dem Zusammenhang bisher wenig Informationen über EPB4.1L5 im Säugetier oder Zellmodell und eine uneingeschränkte Übertragung ist aufgrund der Sequenzunterschiede nicht möglich.

Auch in der Maus ist ein Wechsel der EPB4.1L5-Lokalisation von basolateral nach apikal bekannt. Da es sich bei den hier genutzten Modellen jedoch nicht um Zellen mit Epithelcharakter handelt, ist eine Aussage darüber nicht zu treffen. Allerdings zeigen Färbungen von MDCK-Zellen, dass EPB4.1L5 hier basolateral lokalisiert ist sowie bei Überexpression eine ZO1-Desorganisation auslöst (22). Das kann zusammengenommen für einen Einfluss von EPB4.1L5 auf die *Tight Junction*-Verteilung sprechen - unabhängig von einer direkten Proteininteraktion zu Crb.

Auch an dieser Stelle kann die Möglichkeit einer EPB4.1L5-Crb2-Bindung aus vorher genannten Gründen nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Sollte eine Interaktion vorliegen, ist eine Betrachtung der hier gesehenen ZO1-Regulation durch EPB4.1L5-Überexpression im Zusammenhang mit dem Einfluss von Crb2 auf die *Tight Junctions* zu sehen (22, 45).

Aus dem Säugetier sind bisher Informationen über die Beziehung von Crb3 zu diesen Zell-Zell-Kontakten bekannt. Über Par6-Interaktion kann Crb3 die Reifung von *Tight Junctions* induzieren. Jedoch führt eine Überexpression zu einer Verlangsamung dieses Prozesses (50). Da die drei Crb-Isoformen über eine konservierte intrazelluläre Domäne verfügen, wäre es

möglich, dass auch Crb2 eine solche Funktion innehat, bei der EPB4.1L5 als neuer Crb-Komplex-Bestandteil von regulatorischer Bedeutung sein könnte.

Jedoch sollte die Frage nach einer Interaktion von Crb2 und EPB4.1L5 auf Basis dieser Arbeit neu gestellt werden. Außerdem liegen bisher sowohl über ein Wechselspiel zwischen Crb2 und den *Tight Junctions* als auch, bei hypothetischer EPB4.1L5-Crb2-Interaktion, über deren regulatorischen Einfluss aufeinander kaum Informationen vor. Daher wäre das Aufstellen eines hypothetischen Mechanismus, wie EPB4.1L5 gemeinsam mit Crb2 zum vorliegenden Bild einer gestörten ZO1-Verteilung führen könnte, noch Spekulation und sollte durch zusätzliche Experimente analysiert werden.

### **5.10 Ausblick**

Die Funktionen von EPB4.1L5 sind vielfältig, vermutlich zelltypspezifisch und spielen bei der Regulation von Polarität und Zelldynamik eine zentrale Rolle. Dieses Bild ergänzen die Ergebnisse dieser Arbeit, die zeigen, dass eine Überexpression von EPB4.1L5 zu einer vermehrten Ausbildung von Zellfortsätzen und einer Veränderung der Zell-Zell-Kontakte führen kann. Aufgrund der hier nicht bestätigten Interaktion von EPB4.1L5 und Crb2 steht allerdings erneut zur Diskussion, ob EPB4.1L4 eine Verknüpfung zur Polaritätsregulation sowie, podozytenspezifisch, zum Schlitzmembranaufbau darstellt.

Dass EPB4.1L5 in so vielfältigen Kontexten eine Rolle spielt ist bei Betrachtung deren eng verknüpfter Funktionsmechanismen verständlich. Die Migration von Epithelzellen erfordert das Auflösen von Zell-Zell-Kontakten, die Umstrukturierung der Zellpolarität, das Neuknüpfen von Zell-ECM-Verbindungen sowie die Regulation des Zytoskeletts (17). Spielt EPB4.1L5 eine Rolle bei einem dieser Schritte, erscheint es plausibel, dass sich dies auf die damit verbundenen Abläufe auswirkt. Grundsätzlich bedarf es weiterer Forschung, um zu begreifen, welche Aufgabe EPB4.1L5 genau in welchem dieser Bereiche spielt, wie die unterschiedlichen Funktionen koordiniert werden und, wo genau die zelltypspezifischen Unterschiede liegen. Vor dem Hintergrund dieser Arbeit bleiben und ergeben sich zudem ganz konkrete Fragestellungen, deren Klärung zur Fortführung des Projekts von Interesse wären.

So wäre es zum einen sinnvoll, die hier gewonnenen Resultate mit einer Zelllinie mit C-terminal RFP-markierter EPB4.1L5-Überexpression zu vergleichen, um einen durch die Position der Fluoreszenzprotein-Markierung von EPB4.1L5 und Crb2 verursachten Einfluss auf die Ergebnisse auszuschließen. Erste Folgeerkenntnisse aus der AG-Pavenstädt zeigen, dass eine C-terminal markierte Variante in der Echtzeit-Mikroskopie ein sehr ähnliches Verteilungsmuster wie das N-terminal markierte EPB4.1L5 aufweist. Zum anderen sollten die IFs sowie die Ko-IPs zusätzlich mit unmarkiertem EPB4.1L5 durchgeführt werden. Auch weitere Pulldown-Experimente (zum Beispiel mit EPB4.1L5 anstelle von Crb2) wären möglich, um mehr Gewissheit über die Interaktion zu erlangen.

Um eine gleichzeitige Überexpression von EPB4.1L5 und Crb2 in ähnlichen Mengen zu erhalten, könnte eine neue Expressionskassettenmethode eingesetzt werden. Über die Verwendung von sogenannten *self-cleaving peptides*, wie das 2A-Peptid, können beispielsweise Vorläuferfusionsproteine (hier Crb2-EPB4.1L5) in zwei funktionelle Bestandteile (hier Crb2 und EPB4.1L5) aufgespalten werden. Dadurch wird in einer Zelle ein nahezu identisches Expressionslevel beider Proteine ermöglicht (91).

Zusätzlich ließe sich beispielsweise durch Färbung autophagosomaler Proteine mehr über den Abbau von EPB4.1L5 erfahren.

Generell wäre die Quantifizierung von WBs und IF-Bildern wichtig, um die hier beobachteten Effekte verifizieren zu können. RNA-Sequenzierungs-Screenings oder Proteomanalysen in verschiedenen Zelllinien könnten darüber hinaus mehr Aufschluss über den Einfluss von EPB4.1L5 auf Signalwege geben.

Von weiterem Interesse wäre es, gerade bezüglich nephrologisch relevanter Fragestellungen weiterzuarbeiten. So sollten die hier generierten Podozytenzelllinien ebenfalls auf Regulierungen in Signalwegen hin untersucht werden. Insbesondere Erkenntnisgewinne hinsichtlich Migration und Adhäsion unter EPB4.1L5-Überexpression wären für die Erforschung von Podozyten sehr interessant.

## Literaturverzeichnis

1. Anderson JM, Van Itallie CM (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1: 2584–2585
2. Assémat E, Bazellières E, Pallesi-Pocachard E, Le Bivic A, Massey-Harroche D (2008) Polarity complex proteins. *Biochim Biophys Acta* 1778: 614–630
3. Baines AJ (2006) A FERM-adjacent (FA) region defines a subset of the 4.1 superfamily and is a potential regulator of FERM domain function. *BMC Genomics* 7: 1–7
4. Bérody S, Heidet L, Gribouval O, Harambat J, Niaudet P, Baudouin V, Bacchetta J, Boudaille B, Dehennault M, De Parscau L, et al. (2019) Treatment and outcome of congenital nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 34: 458–467
5. Blaine J, Dylewski J (2020) Regulation of the Actin Cytoskeleton in Podocytes. *Cells* 9: 1700–1729
6. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: Integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 586–599
7. Bulgakova NA, Knust E (2009) The Crumbs complex: From epithelial-cell polarity to retinal degeneration. *J Cell Sci* 122: 2587–2596
8. Campanale JP, Sun TY, Montell DJ (2017) Development and dynamics of cell polarity at a glance. *J Cell Sci* 130: 1201–1207
9. Campbell HK, Maiers JL, DeMali KA (2017) Interplay between tight junctions & adherens junctions. *Exp Cell Res* 358: 39–44
10. Chang RM, Pei L, Fang F, Xu JF, Yang H, Zuo CH, Zhou JH, Luo GQ, Yang LY (2016) YMO1 suppresses invasion and metastasis by inhibiting RhoC signaling and predicts favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 7: 55585–55600
11. Chishti AH, Kim AC, Marfatia SM, Lutchman M, Hanspal M, Jindal H, Liu SC, Low PS, Rouleau GA, Mohandas N, et al. (1998) The FERM domain: A unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci* 23: 281–282
12. Coopman P, Djiane A (2016) Adherens Junction and E-Cadherin complex regulation by epithelial polarity. *Cell Mol Life Sci* 73: 3535–3553

13. DeMali KA, Burridge K (2003) Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci* 116: 2389–2397
14. Deng G, Zhou X, Chen L, Yao Y, Li J, Zhang Y, Luo C, Sun L, Tang J (2020) High expression of ESRP1 regulated by circ-0005585 promotes cell colonization in ovarian cancer. *Cancer Cell Int* 20: 174–189
15. Ebarasi L, Ashraf S, Bierzynska A, Gee HY, McCarthy HJ, Lovric S, Sadowski CE, Pabst W, Vega-Warner V, Fang H, et al. (2015) Defects of CRB2 cause steroid-resistant nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet* 96: 153–161
16. Ebarasi L, He L, Hultenby K, Takemoto M, Betsholtz C, Tryggvason K, Majumdar A (2009) A reverse genetic screen in the zebrafish identifies *crb2b* as a regulator of the glomerular filtration barrier. *Dev Biol* 334: 1–9
17. Etienne-Manneville S (2008) Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* 27: 6970–6980
18. Gamblin CL, Hardy ÉJL, Chartier FJM, Bisson N, Laprise P (2014) A bidirectional antagonism between aPKC and Yurt regulates epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 204: 487–495
19. Gamblin CL, Parent-Prévost F, Jacquet K, Biehler C, Jetté A, Laprise P (2018) Oligomerization of the FERM-FA protein Yurt controls epithelial cell polarity. *J Cell Biol* 217: 3853–3862
20. García-García MJ, Eggenschwiler JT, Caspary T, Alcorn HL, Wyler MR, Huangfu D, Rakeyan AS, Lee JD, Feinberg EH, Timmer JR, et al. (2005) Analysis of mouse embryonic patterning and morphogenesis by forward genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5913–5919
21. Garg P (2018) A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol* 47: 3–13
22. Gosens I, Sessa A, den Hollander AI, Letteboer SJF, Belloni V, Arends ML, Le Bivic A, Cremers FPM, Broccoli V, Roepman R (2007) FERM protein EPB41L5 is a novel member of the mammalian CRB-MPP5 polarity complex. *Exp Cell Res* 313: 3959–3970
23. Hamada K, Shimizu T, Matsui T, Tsukita S, Tsukita S, Hakoshima T (2000) Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J* 19: 4449–4462
24. Hamano S, Nishibori Y, Hada I, Mikami N, Ito-Nitta N, Fukuhara D, Kudo A, Xiao Z,

- Nukui M, Patrakka J, et al. (2018) Association of crumbs homolog-2 with mTORC1 in developing podocyte. *PLoS One* 13: e0202400
25. Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Sabe H (2018) Arf6 and its ZEB1-EPB41L5 mesenchymal axis are required for both mesenchymal- and amoeboid-type invasion of cancer cells. *Small GTPases* 9: 420–426
  26. Hashimoto A, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Onodera Y, Handa H, Oikawa T, Sabe H (2016) ZEB1 induces EPB41L5 in the cancer mesenchymal program that drives ARF6-based invasion, metastasis and drug resistance. *Oncogenesis* 5: e259
  27. Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, et al. (2016) Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat Commun* 7: 10656–10666
  28. Herranz H, Stamatakis E, Feiguin F, Milán M (2006) Self-refinement of notch activity through the transmembrane protein crumbs: Modulation of  $\gamma$ -secretase activity. *EMBO Rep* 7: 297–302
  29. Hirano M, Hashimoto S, Yonemura S, Sabe H, Aizawa S (2008) EPB41L5 functions to post-transcriptionally regulate cadherin and integrin during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 182: 1217–1230
  30. Hochapfel F, Denk L, Mendl G, Schulze U, Maaßen C, Zaytseva Y, Pavenstädt H, Weide T, Rachel R, Witzgall R, et al. (2017) Distinct functions of Crumbs regulating slit diaphragms and endocytosis in *Drosophila* nephrocytes. *Cell Mol Life Sci* 74: 4573–4586
  31. Hoover KB, Bryant PJ (2000) The genetics of the protein 4.1 family: Organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 12: 229–234
  32. Hoover KB, Bryant PJ (2002) *Drosophila* yurt is a new protein-4.1-like protein required for epithelial morphogenesis. *Dev Genes Evol* 212: 230–238
  33. Hsu YC, Willoughby JJ, Christensen AK, Jensen AM (2006) Mosaic Eyes is a novel component of the Crumbs complex and negatively regulates photoreceptor apical size. *Development* 133: 4849–4859
  34. van den Hurk JAJM, Rashbass P, Roepman R, Davis J, Voeselek KEJ, Arends ML, Zonneveld MN, van Roekel MHG, Cameron K, Rohrschneider K, et al. (2005) Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. *Mol Vis* 11: 263–273

35. Ibata N, Terentjev E (2020) Development of nascent focal adhesions in spreading cells. *Biophys J* 119: 2063–2073
36. Jensen AM, Walker C, Westerfield M (2001) mosaic eyes: a zebrafish gene required in pigmented epithelium for apical localization of retinal cell division and lamination. *Development* 128: 95–105
37. Jensen AM, Westerfield M (2004) Zebrafish mosaic eyes is a novel FERM protein required for retinal lamination and retinal pigmented epithelial tight junction formation. *Curr Biol* 14: 711–717
38. Jeong MH, Park SY, Lee SH, Seo J, Yoo JY, Park SH, Kim MJ, Lee S, Jang S, Choi HK, et al. (2019) EPB41L5 Mediates TGF $\beta$ -Induced metastasis of gastric cancer. *Clin Cancer Res* 25: 3617–3629
39. Jović M, Naslavsky N, Rapaport D, Horowitz M, Caplan S (2007) EHD1 regulates  $\beta$ 1 integrin endosomal transport: Effects on focal adhesion, cell spreading and migration. *J Cell Sci* 120: 802–814
40. Jürgens G, Wieschaus E, Nüsslein-Volhard C, Kluding H (1984) Roux's Archives of Developmental Biology Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster* II. Zygotic loci on the third chromosome. *Arch Dev Biol* 193: 283–295
41. Khalili AA, Ahmad MR (2015) A Review of cell adhesion studies for biomedical and biological applications. *Int J Mol Sci* 16: 18149–18184
42. Kriz W, Lemley K V. (2015) A potential role for mechanical forces in the detachment of podocytes and the progression of CKD. *J Am Soc Nephrol* 26: 258–269
43. LaJeunesse DR, McCartney BM, Fehon RG (1998) Structural analysis of *Drosophila* Merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol* 141: 1589–1599
44. Lamont RE, Tan WH, Innes AM, Parboosingh JS, Schneidman-Duhovny Di, Rajkovic A, Pappas J, Altschwager P, Deward S, Fulton A, et al. (2016) Expansion of phenotype and genotypic data in CRB2-related syndrome. *Eur J Hum Genet* 24: 1436–1444
45. Laprise P, Beronja S, Silva-Gagliardi NF, Pellikka M, Jensen AM, McGlade CJ, Tepass U (2006) The FERM Protein Yurt Is a Negative Regulatory Component of the Crumbs Complex that Controls Epithelial Polarity and Apical Membrane Size. *Dev Cell* 11: 363–374

46. Laprise P, Lau KM, Harris KP, Silva-Gagliardi NF, Paul SM, Beronja S, Beitel GJ, McGlade CJ, Tepass U (2009) Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature* 459: 1141–1145
47. Lee JD, Silva-Gagliardi NF, Tepass U, McGlade CJ, Anderson K V. (2007) The FERM protein Epb4.115 is required for organization of the neural plate and for the epithelial-mesenchymal transition at the primitive streak of the mouse embryo. *Development* 134: 2007–2016
48. Lee JL, Streuli CH (2014) Integrins and epithelial cell polarity. *J Cell Sci* 127: 3217–3225
49. Legerstee K, Geverts B, Slotman JA, Houtsmuller AB (2019) Dynamics and distribution of paxillin, vinculin, zyxin and VASP depend on focal adhesion location and orientation. *Sci Rep* 9: 10460
50. Lemmers C, Michel D, Lane-Guermonprez L, Delgrossi MH, Médina E, Arsanto JP, Le Bivic A (2004) CRB3 Binds Directly to Par6 and Regulates the Morphogenesis of the Tight Junctions in Mammalian Epithelial Cells. *Mol Biol Cell* 15: 1324–1333
51. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ (2014) The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5: 160
52. Li Y, Wei Z, Yan Y, Wan Q, Du Q, Zhang M (2014) Structure of Crumbs tail in complex with the PALS1 PDZ–SH3–GK tandem reveals a highly specific assembly mechanism for the apical Crumbs complex. *Proc Natl Acad Sci* 111: 17444–17449
53. Mangeat P, Roy C, Martin M (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* 9: 187–192
54. Margolis B, Borg JP (2005) Apicobasal polarity complexes. *J Cell Sci* 118: 5157–5159
55. McCartney BM, Fehon RG (1996) Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol* 133: 843–852
56. Meerbrey KL, Hu G, Kessler JD, Roarty K, Li MZ, Fang JE, Herschkowitz JI, Burrows AE, Ciccia A, Sun T, et al. (2011) The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3665–3670
57. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 56–68
58. Möller-Kerutt A, Rodriguez-Gatica J, Wacker K, Bhatia R, Siebrasse J, Boon N, Van

- Marck V, Boor P, Kubitscheck U, Wijnholds J, et al. (2021) Crumbs2 Is an Essential Slit Diaphragm Protein of the Renal Filtration Barrier. *J Am Soc Nephrol* 32: 1053–1070
59. Nakajima H, Tanoue T (2010) Epithelial cell shape is regulated by Lulu proteins via myosin-II. *J Cell Sci* 123: 555–566
  60. Nunomura W, Takakuwa Y, Parra M, Conboy J, Mohandas N (2000) Regulation of Protein 4.1R, p55, and Glycophorin C Ternary Complex in Human Erythrocyte Membrane. *J Biol Chem* 275: 24540–24546
  61. Ohata S, Aoki R, Kinoshita S, Yamaguchi M, Tsuruoka-Kinoshita S, Tanaka H, Wada H, Watabe S, Tsuboi T, Masai I, et al. (2011) Dual roles of notch in regulation of apically restricted mitosis and apicobasal polarity of neuroepithelial cells. *Neuron* 69: 215–230
  62. Otsuka Y, Sato H, Oikawa T, Onodera Y, Nam JM, Hashimoto A, Fukunaga K, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Matsuno Y, et al. (2016) High expression of EPB41L5, an integral component of the Arf6-driven mesenchymal program, correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma of the tongue. *Cell Commun Signal* 14: 1–9
  63. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: Integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 633–643
  64. De Pascalis C, Etienne-Manneville S (2017) Single and collective cell migration: The mechanics of adhesions. *Mol Biol Cell* 28: 1833–1846
  65. Pavenstädt H, Vollenbröcker B (2017) Cross talk between the Crumbs complex and Hippo signaling in renal epithelial cells. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 469: 917–926
  66. Perez-Vale KZ, Peifer M (2018) Modulating apical–basal polarity by building and deconstructing a Yurt. *J Cell Biol* 217: 3772–3773
  67. Ram S, Vedula K, Ravasio A, Lim CT, Ladoux B (2013) Collective Cell Migration: A Mechanistic Perspective. *PHYSIOLOGY* 28: 370–379
  68. Ramkumar N, Harvey BM, Lee JD, Alcorn HL, Silva-Gagliardi NF, McGlade CJ, Bestor TH, Wijnholds J, Haltiwanger RS, Anderson K V. (2015) Protein O-Glucosyltransferase 1 (POGLUT1) Promotes Mouse Gastrulation through Modification of the Apical Polarity Protein CRUMBS2. *PLoS Genet* 11: e1005551
  69. Ramkumar N, Omelchenko T, Silva-Gagliardi NF, McGlade CJ, Wijnholds J, Anderson K V. (2016) Crumbs2 promotes cell ingression during the epithelial-to-mesenchymal

- transition at gastrulation. *Nat Cell Biol* 18: 1281–1291
70. Reiner DJ, Erik A Lundquist (2018) Small GTPases. *WormBook* 2018: 1–65
  71. Rodriguez-Boulan E, Macara IG (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 225–242
  72. Sachs N, Sonnenberg A (2013) Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol* 9: 200–210
  73. Salis P, Payre F, Valenti P, Bazellières E, Le Bivic A, Mottola G (2017) Crumbs, Moesin and Yurt regulate junctional stability and dynamics for a proper morphogenesis of the *Drosophila* pupal wing epithelium. *Sci Rep* 7: 16778
  74. Saller J, Seydafkan S, Shahid M, Gadara M, Cives M, Eschrich SA, Boulware D, Strosberg JR, Aejaz N, Coppola D (2019) EPB41L5 is Associated with the Metastatic Potential of Low-grade Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancer Genomics and Proteomics* 16: 309–318
  75. Schell C, Huber TB (2017) The evolving complexity of the podocyte cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol* 28: 3166–3174
  76. Schell C, Rogg M, Suhm M, Helmstädter M, Sellung D, Yasuda-Yamahara M, Kretz O, Küttner V, Suleiman H, Kollipara L, et al. (2017) The FERM protein EPB41L5 regulates actomyosin contractility and focal adhesion formation to maintain the kidney filtration barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E4621–E4630
  77. Schulze U, Vollenbröker B, Braun DA, Van Le T, Granado D, Kremerskothen J, Fränzel B, Klosowski R, Barth J, Fufezan C, et al. (2014) The Vac14-interaction network is linked to regulators of the endolysosomal and autophagic pathway. *Mol Cell Proteomics* 13: 1397–1411
  78. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P (2001) Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108: 1621–1629
  79. Scott RP, Quaggin SE (2015) The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol* 209: 199–210
  80. Seetharaman S, Etienne-Manneville S (2020) Cytoskeletal Crosstalk in Cell Migration. *Trends Cell Biol* 30: 720–735
  81. Sever S, Schiffer M (2018) Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int* 93: 1298–

82. Shankland SJ (2006) The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 69: 2131–2147
83. Slavotinek AM (2016) The Family of Crumbs Genes and Human Disease. *Mol Syndromol* 7: 274–281
84. Slavotinek AM, Kaylor J, Pierce H, Cahr M, Deward SJ, Schneidman-Duhovny D, Alsadah A, Salem F, Schmajuk G, Mehta L (2015) CRB2 mutations produce a phenotype resembling congenital nephrosis, Finnish type, with cerebral ventriculomegaly and raised alpha-fetoprotein. *Am J Hum Genet* 96: 162–169
85. Suzuki A, Ohno S (2006) The PAR-aPKC system: Lessons in polarity. *J Cell Sci* 119: 979–987
86. Tepass U (2009) FERM proteins in animal morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 19: 357–367
87. Tepass U, Theres C, Knust E (1990) crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61: 787–799
88. Thompson BJ, Pichaud F, Röper K (2013) Sticking together the Crumbs—an unexpected function for an old friend. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 307–314
89. Trepast X, Chen Z, Jacobson K (2012) Cell migration. *Compr Physiol* 2: 2369–2392
90. Tryggvason K, Wartiovaara J (2005) How does the kidney filter plasma? *Physiology* 20: 96–101
91. Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q (2015) 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep* 5: 1–10
92. Warzecha CC, Shen S, Xing Y, Carstens RP (2009) The epithelial splicing factors ESRP1 and ESRP2 positively and negatively regulate diverse types of alternative splicing events. *RNA Biol* 6: 546–562
93. Wei X, Malicki J (2002) *nagie oko*, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina. *Nat Genet* 31: 150–157
94. Wei Z, Li Y, Ye F, Zhang M (2015) Structural basis for the phosphorylation-regulated interaction between the cytoplasmic tail of cell polarity protein crumbs and the actin-binding protein moesin. *J Biol Chem* 290: 11384–11392

95. Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ (2004) Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1692: 103–119
96. Xiao Z, Patrakka J, Nukui M, Chi L, Niu D, Betsholtz C, Pikkarainen T, Vainio S, Tryggvason K (2011) Deficiency in crumbs homolog 2 (Crb2) affects gastrulation and results in embryonic lethality in mice. *Dev Dyn* 240: 2646–2656
97. Yu T, Matsuda M (2020) Epb41l5 interacts with lqcb1 and regulates ciliary function in zebrafish embryos. *J Cell Sci* 133: 240648

**Lebenslauf**

## **Danksagungen**

Bei der Anfertigung dieser Arbeit haben mich viele Menschen unterstützt, denen ich im Folgenden danken möchte.

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Weide, der mich ausgezeichnet und sehr zuverlässig betreut hat. Die ausführlichen Erklärungen, Erfahrung und kreativen Ideen waren mir stets eine große Hilfe, für die ich mich sehr herzlich bedanke.

Vielen Dank auch an Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Pavenstädt, der als Arbeitsgruppenleiter meine Doktorarbeit in der Molekularen Nephrologie überhaupt erst ermöglicht hat.

Besonders danken möchte ich auch Annika Möller-Kerutt, die mir im Labor jeden Tag zu Seite stand und sich für alle Fragen Zeit genommen hat. Ohne die ausführlichen Erklärungen und den Erfahrungsschatz wäre das Projekt in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ein großes Dankeschön geht außerdem an das Team der Molekularen Nephrologie, das durch seine positive und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, das Miteinander und die vielen Hilfestellungen einen großen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch danke ich meiner Familie für die Unterstützung und Anregungen während der Doktorarbeitszeit und für das Korrekturlesen.

Nicht zuletzt möchte ich mich für die Förderung durch die Medizinische Fakultät Münster im Rahmen des MedK-Programmes bedanken.