

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf  
(Institutsdirektorin: Prof. Dr. rer. nat. Royer-Pokora)

**Molekulare Charakterisierung des Wilms-Tumor 1-Gens**  
**bei der Pathogenese des kongenitalen / infantilen**  
**nephrotischen Syndroms**

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Marc Gerald Pitschke

aus Wuppertal

2002

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. R. Wagner

Koreferentin: Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2002

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	1
1.1 Nierenentwicklung.....	1
1.2 Aufbau und Funktion der Glomeruli.....	4
1.3 Molekulare Struktur der Podozyten.....	6
1.4 Denys-Drash-Syndrom.....	8
1.5 Zielsetzung.....	15
<b>2 Material</b> .....	16
<b>3. Patienten und Normalkontrollen</b> .....	28
3.1 Patienten.....	28
3.2 Normalkontrollen.....	29
<b>4 Methoden</b> .....	30
4.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	30
4.2 In Situ Apoptose-Nachweis mittels Immunfluoreszenz.....	33
4.3 Anlegen und Kultivierung primärer humaner Zellen.....	33
4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit dem <i>Telomerase</i> -Gen.....	35
4.5 Laser-Capture-Mikrodissektion.....	39
4.6 DNA-Analysen.....	41
4.7 RNA-Analysen.....	43
4.8 Erstellung von Expressionsprofilen.....	51
4.9 Protein-Analysen.....	55
<b>5 Ergebnisse</b> .....	59
5.1 Podozyten in Zellkultur .....	60
5.2 Charakterisierung von Veränderungen in den Glomeruli beim Denys-Drash-Syndrom.....	73
5.3 Untersuchung der Apoptose in Glomeruli.....	88
5.4 Erstellung der Expressionsprofile von Podozyten gesunder und erkrankter Personen.....	90
5.5 Erstellung der Expressionsprofile von Glomeruli gesunder und erkrankter Personen.....	94
5.6 Vergleich der Expressionsprofile.....	104

5.7 Validierung der Expression bei differentiell exprimierten Genen.....	120
<b>6 Diskussion</b> .....	<b>130</b>
6.1 Podozyten in Zellkultur.....	131
6.2. Immunhistochemische Charakterisierung von Denys-Drash-Glomeruli.....	133
6.3 cDNA-Expressionsprofile.....	144
6.4 Schlußfolgerungen.....	151
<b>7 Zusammenfassung</b> .....	<b>154</b>
<b>8 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>156</b>
<b>9 Lebenslauf</b> .....	<b>168</b>
<b>10 Danksagung</b> .....	<b>169</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A / M	Aceton / Methanol
AA	Acryl-Amid
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre (copy) DNA zur mRNA
CNS	congenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ
DA	Dalton
ddH <sup>2</sup> O	doppeltdestilliertes Wasser
DDS	Denys-Drash-Syndrom
DMS	diffuse mesangiale Sklerose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerosis
g	Gramm
h	Stunde
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
Ig	Immunglobulin
k	kilo ( $\times 10^3$ )
l	Liter
m	milli ( $\times 10^{-3}$ )
M	Molarität
min	Minute
n	nano ( $\times 10^{-9}$ )
NAK	Normal Adult Kidney
NEK	Normal Embryonal Kidney
OD	optische Dichte
p	piko ( $\times 10^{-12}$ )
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleinsäure
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
SDS	Sodium Dodecylsulfat
RT	Reverse-Transkription
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
TRS	Target Retrieval Solution
$\mu$	micro ( $\times 10^{-6}$ )
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
WB	Western-Blot
WT	Wilms-Tumor
<i>WT1</i>	<i>Wilms-Tumor1-Gen</i>
WT1	Wilms-Tumor1-Protein
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Das nephrotische Syndrom ist eine Nierenerkrankung und als Proteinurie mit einer Proteinausscheidung von mehr als 3,5g/Tag/1,73m<sup>2</sup> Körperoberfläche definiert. Beim infantilen nephrotischen Syndrom handelt es sich um ein heterogenes Krankheitsbild, das durch verschiedene Ursachen ausgelöst werden kann:

- durch intrauterine Infektionen
- durch idiopathisches nephrotisches Syndrom
- durch eine glomeruläre Erbkrankheit.

Zu den glomerulären Erbkrankheiten zählen das finnische nephrotische Syndrom, welches durch Mutationen im *Nephrin*-Gen (Chromosom 19q) verursacht wird (Kestila et al., 1998) und die diffuse mesangiale Sklerose (DMS). Diese tritt entweder isoliert oder im Rahmen des Denys-Drash Syndroms (DDS) auf (Denys et al., 1967; Drash et al., 1970; Habib et al., 1993). Neben dem klinischen Leitsymptom des DDS, der Glomerulopathie, kommt es zum Auftreten von urogenitalen Fehlbildungen wie dem Pseudohermaphroditismus masculinus und bei einem Teil der Patienten zu einer frühen, häufig beidseitigen Ausbildung von Wilms-Tumoren der Nieren. Die progressive Niereninsuffizienz geht der Tumormanifestation jedoch oft um Jahre voraus. Die Glomerulopathie bedingt eine massive Proteinurie, in deren Folge es rasch zum terminalen Nierenversagen kommt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird vor allem auf die diffuse mesangiale Sklerose assoziiert mit dem Denys-Drash-Syndrom eingegangen, da im Rahmen dieser Arbeit nur Patienten mit dem Denys-Drash-Syndrom untersucht wurden.

### 1.1 Nierenentwicklung

Um die Entstehung des kongenitalen, infantilen nephrotischen Syndroms nachvollziehen zu können, ist es zunächst wichtig die Nierenentwicklung zu verstehen.

Die Niere entwickelt sich aus dem intermediären Mesoderm als Teil der Harn- und Geschlechtsorgane, die sich im Embryo in einem engen morphologischen Zusammenhang befinden und deshalb als Urogenitalsystem bezeichnet werden. Die einzelnen Abschnitte, die Nephrotome, bilden ein perlschnurartiges Blastem.

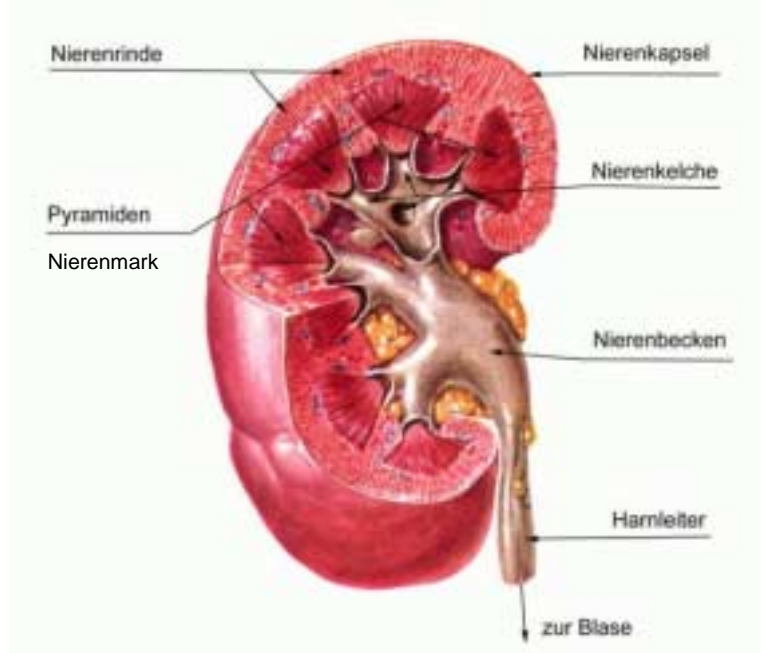


Abb. 1.1 Querschnitt durch die Niere (Med-World AG, Internet: [http://www.m-w-w.de/krankheiten/nephrologie/anatomie\\_funktion.html](http://www.m-w-w.de/krankheiten/nephrologie/anatomie_funktion.html), 2001). Man blickt auf das zum Teil freigegebene Nierenbecken. Die drei Grobstrukturen, die feine Nierenrinde, das segmentierte Nierenmark und die harnableitenden Nierenkelche, lassen sich gut erkennen.

Aus diesem nephrogenen Strang entwickeln sich in einer zeitlichen Abfolge räumlich getrennt drei Nierenanlagen: die Vorniere (Pronephros), die Urniere (Mesonephros) und die Nachniere (Metanephros), bei der es sich um die definitive Niere handelt (Abb. 1.1). Während die Vor- und die Urniere über ein rudimentäres Stadium nicht hinausgehen (Rodewald, R., Karnovsky M.J, 1974), entwickelt sich die Nachniere ab Beginn der sechsten Woche der Embryonalentwicklung. Zunächst wächst aus dem WOLFFSchen Gang kurz vor dessen Einmündung in die Kloake eine dorsal gerichtete Ausstülpung, die Ureterknospe, aus. Diese nimmt Verbindung mit dem kaudal verbleibenden Teil des

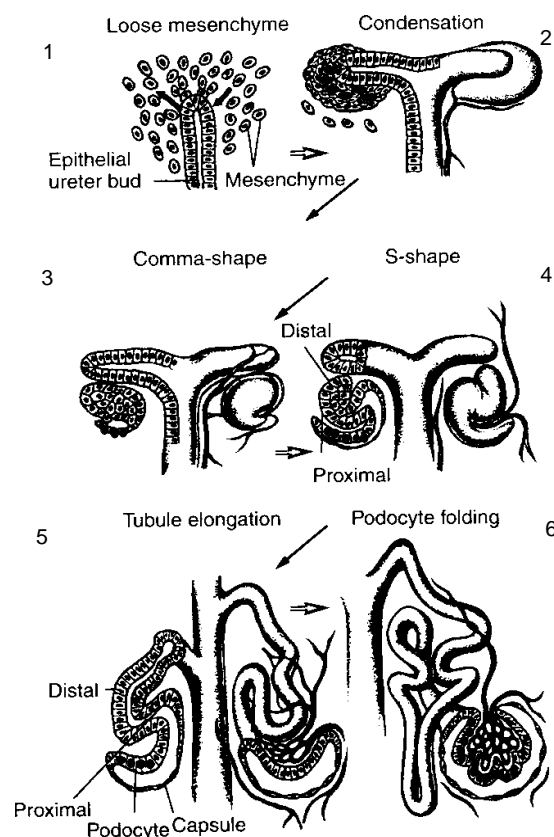


Abb.1.2: Die Entwicklungsstadien eines Glomerulus (aus Sorokin et al., 1992).

nephrogenen Stranges auf und die gesamte Anlage wächst dorsal der Urniere empor.

Die Bestandteile der Niere bilden sich unter gegenseitiger Beeinflussung aus der Ureterknospe und dem metanephrogenen Blastem. Die ableitenden Harnwege stammen vom Knospenmaterial, die Nephrone sowie das Nierenstroma stammen vom Blastem.

Die Ureterknospe verzweigt sich und bildet ein Sammelrohrsystem, dessen Zweige jeweils mit einer terminalen Ampulle enden. Das jeder Ampulle aufsitzende metanephrogene Gewebe entwickelt sich zu einem Nephron. Die Entwicklung aus dem mesenchymalen Gewebe hin zum Glomerulus verläuft über einige Zwischenstufen. Aufgrund der Interaktion (Abb. 1.2, Bild 1) zwischen Ureterknospe und Mesenchym verzweigt sich die Ureterknospe (2). Es entsteht ein Kondensationspunkt aus verschiedenen Zelltypen wie Ureterepithel, Endothelzellen, unkondensiertem und kondensiertem Mesenchym. Das kondensierte Mesenchym differenziert sich weiter zu „comma-shaped-“ (3) und „S-shaped-Epithelium“ (4). Im nächsten Stadium können bereits Tubuli gut erkannt

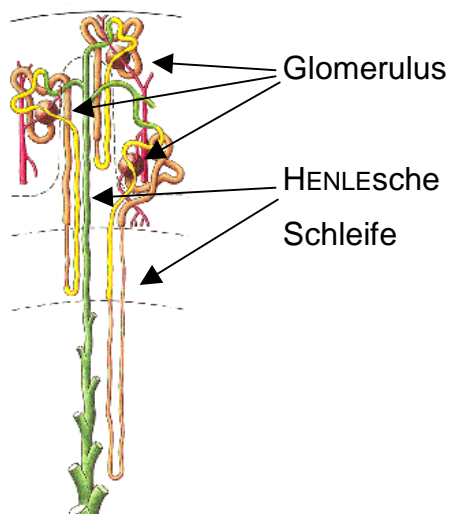


Abb. 1.3: Aufbau dreier Nephrone mit unterschiedlich langen HENLEschen Schleifen (Benninghoff, Anatomie 1999)

werden (5). Fertig ausdifferenziert hat der Glomerulus eine runde Form (6) und kompletten Anschluß an das tubuläre- sowie das Blutsystem.

Die Funktionseinheit des Nephrons besteht aus einem Glomerulus, der von einer BOWMANSchen Kapsel umgeben ist und einer HENLESchen Schleife (führt den Primärharn über Verbindungstubuli in die Sammelrinne). Da am Ende der Embryonalentwicklung die terminalen Ampullen verschwinden, können später keine weiteren Nephrene nachgebildet werden.



## 1.2 Aufbau und Funktion der Glomeruli

Am Gefäßpol geht das parietale Epithel der BOWMANSchen Kapsel in das viszerale Epithel (Podozyten) über. Aus der parietalen Basalmembran entwickelt sich die glomeruläre Basalmembran (GBM, blau dargestellt) die gemeinsam mit dem viszeralen Epithel die Kapillaren des Glomerulus vom Kapselraum her überzieht (Abb. 1.4A). Das Kapillarknäuel ist kompliziert gebaut; direkt am Eintritt spaltet sich die afferente Arteriole in mehrere Kapillaräste auf, die den Glomerulus durchlaufen und sich schließlich wieder zur efferenten Arteriole vereinigen (Steinhausen et al., 1983).

Die Glomeruluskapillaren bestehen nur aus einem Endothelschlauch. Ein schmaler Streifen dieses Schlauchs hat zum Zentrum hin Kontakt mit mesangialen Zellen. Der periphere Teil der Kapillare ist von glomerulärer Basalmembran überzogen und stellt die Filtrationsfläche dar (Abb. 1.4B).

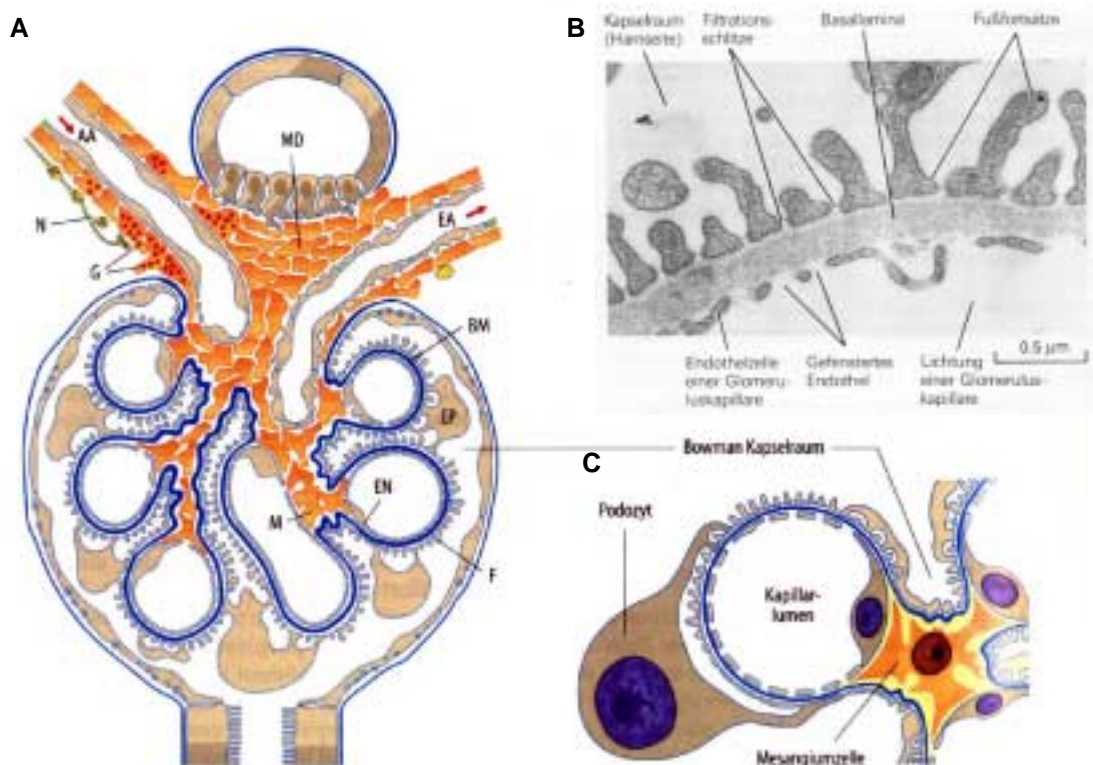


Abb.1.4 (aus: Schmidt, Physiologie des Menschen 2000): A. Übersicht über die Struktur eines Glomerulus mit juxtaglomerulärem Apparatus. Am Gefäßpol mündet die afferente Arteriole (AA), die von sympathischen Nervenfasern (N) versorgt ist und deren glatte Muskulatur unmittelbar vor der Einmündung deutlich Granula (G) aufweist. EN: Endothelzellen; BM: Basalmembran; EP: Epithelzellen mit Fußfortsätzen = Podozyten; M: Mesangiumzellen; MD: Macula-Densa-Segment des distalen Tubulus; EA: Efferente Arteriole. B. Elektronenmikroskopische Aufnahme der GBM mit den Fußfortsätzen der Podozyten und den Endothelzellen. C. Schematische Darstellung der Anordnung von intraglomerulären Mesangiumzellen und Podozyten; oben: Kapillarschlinge mit einer zentralen Mesangiumzelle, die mit Fußfortsätzen an der inneren Kurvatur der kapillären Basalmembran verankert ist und die Kurvenstruktur stabilisiert. Unten: Querschnitt mit der gleichen Anordnung der zentral verankerten Mesangiumzelle und den peripher angelagerten Fußfortsätzen der Podozyten. Auch die Podozytenanordnung stabilisiert die Kapillarschlinge und wirkt einer druckpassiven Dehnung entgegen.

Die Filtrationsbarriere setzt sich aus drei Schichten zusammen:

- Der **Endothelschlauch** ist regelmäßig mit Poren von 50-100nm Größe durchsetzt (gefenestertes Endothel). Der luminalen Zellmembran ist eine dicke, stark negativ geladene Glykocalix aufgelagert, die auch die Poren überbrückt (Kriz et al., 1990). Hauptbestandteil dieser Schicht ist das Sialoprotein Podocalyxin.
- Die Endothelzellen bauen zusammen mit den Podozyten die **glomeruläre Basalmembran (GBM)** auf. Die Dicke der GBM beträgt beim Erwachsenen 250 bis 300nm und ist dreischichtig aufgebaut; zwei dünnere äußere Schichten stellen den Kontakt zu den umgebenden Zellen her und eine dickere innere Schicht besteht aus einem dreidimensionalen Netzwerk. Gebildet wird dieses Netzwerk aus Collagen IV-Fasern, die für eine hohe mechanische Stabilität sorgen und als Basisstruktur angesehen werden können. Weitere Bestandteile sind polyanionische Proteoglykane, die der GBM eine stark negative Ladung geben und Laminin.
- Zum Lumen hin bedecken die **Podozyten** die GBM. Bei den Podozyten handelt es sich um stark differenzierte Zellen, die die Fähigkeit zur mitotischen Teilung verloren haben. Als einzige Möglichkeit zur Adaption bleibt Ihnen deshalb die Hypertrophie. Podozyten bestehen aus einem großen Zellkörper und kräftigen primären Fortsätzen, die sich weiter zu sekundären Fußfortsätzen verästeln (Abb. 1.5).

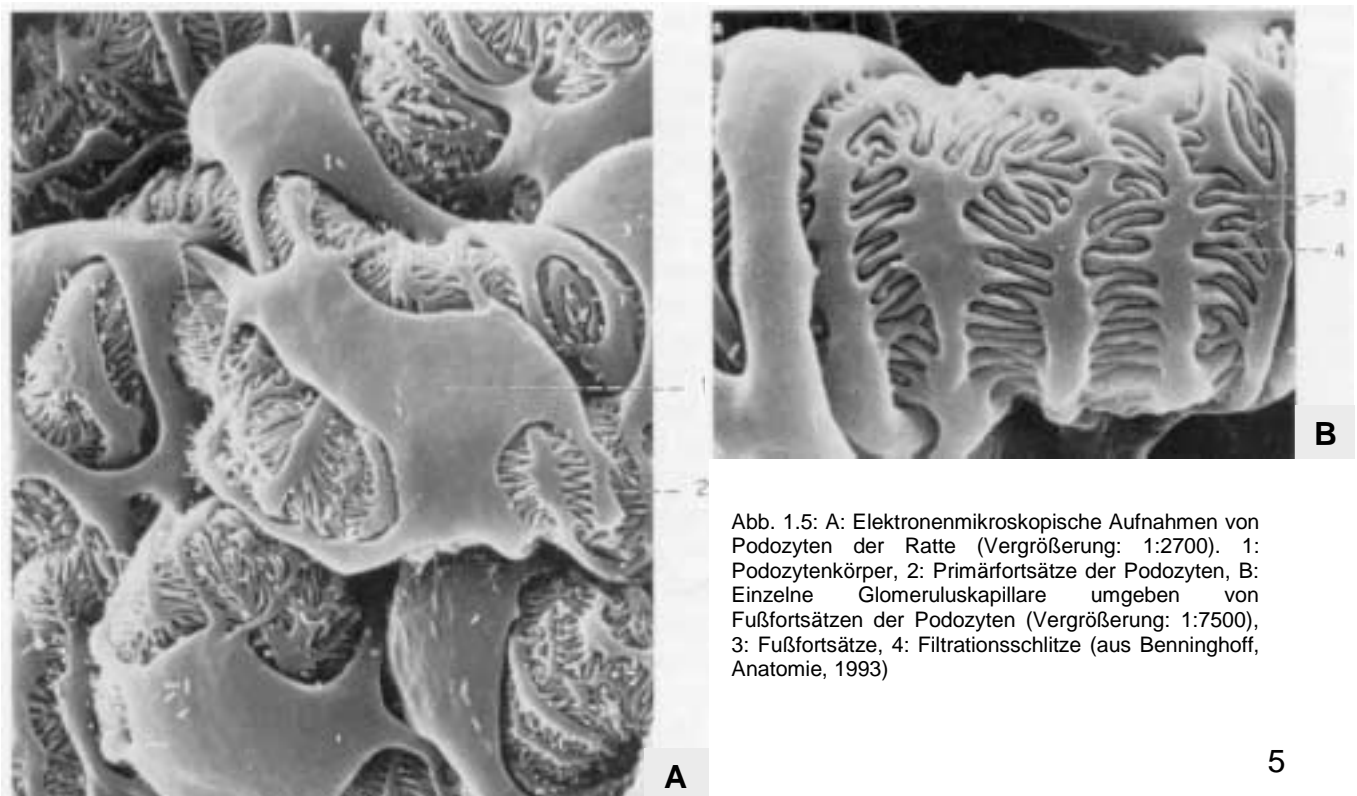


Abb. 1.5: A: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Podozyten der Ratte (Vergrößerung: 1:2700). 1: Podozytenkörper, 2: Primärfortsätze der Podozyten, B: Einzelne Glomeruluskapillare umgeben von Fußfortsätzen der Podozyten (Vergrößerung: 1:7500), 3: Fußfortsätze, 4: Filtrationsschlitz (aus Benninghoff, Anatomie, 1993)

Die Fußfortsätze sind in die äußere Schicht der GBM eingelagert und dort verankert. Die Zellkörper selbst flottieren im Filtrat des Glomerulus. Die Fußfortsätze besitzen kontraktile Apparate, um dem wechselnden Druck, der auf sie über das Filtrat einwirkt, standhalten zu können. Zwischen den Fußfortsätzen bleiben feine Spalten mit einer Länge von 300-500nm und einer Breite von 20-30nm offen. Diese Filtrationsschlitze sind durchzogen von einer 4nm dicken Schlitzmembran. Bei der Schlitzmembran handelt es sich um eine extrazelluläre Matrix, die den Filtrationsschlitz feinmaschig überzieht.

Die Filtrationsbarriere besteht somit aus dem gefensterten Endothel, dem feinmaschigen Netzwerk der glomerulären Basalmembran und aus der Schlitzmembran, die den Filtrationsschlitz zwischen zwei Fußfortsätzen der Podozyten abschließt.

Zusätzlich sind die Glykocalix und die GBM stark negativ geladen. Die negativ geladenen Schichten wirken wie ein Ladungsschild und sorgen dafür, dass viele Plasmaproteine (die negativ geladen sind) am Eintritt in den Filter gehindert werden. Die Größenselektivität beruht auf der Feinstruktur der Basalmembran, die nur Substanzen bis zu einem Radius von 4nm passieren lässt. Täglich entstehen so in den circa zwei Millionen Glomeruli (eine Niere hat etwa 822.300 Glomeruli (Muirhead E.E., 1988)) 180l Primärharn. Die größte Menge der Flüssigkeit und auch viele Elektrolyte werden jedoch in den HENLESchen Schleifen resorbiert und wieder dem Blut zugeführt.

### **1.3 Molekulare Struktur der Podozyten**

Der Podozyt ist eine dynamische Zelle. Das Zytoskelett des Zellkörpers und die Primärfortsätze bestehen vor allem aus Mikrotubuli, die verflochten sind mit Filamentproteinen. Ein typisches Filamentprotein, das von Podozyten exprimiert wird, ist Vimentin.

Die Fußfortsätze sind nicht statisch, sie enthalten wie oben beschrieben ein kontraktiles System, das vor allem aus Aktin, Myosin II (Aktin und Myosin in der Abb. 1.6 dargestellt durch blaue Filamente),  $\alpha$ -Actinin 4 (ACTN4), Talin (t), Paxillin (p) und Vinculin (v) besteht (Mundel P., Shankland S.J., 1999). Die Aktin-Filament-Bündel bilden Verknüpfungen zwischen den vielen Fußfortsätzen eines jeden Podozyten. Über den kontraktilen Apparat verbinden die Aktin-Bündel die

Podozytenfußfortsätze mit der GBM. Eine besondere Rolle bei der Verankerung spielen die Transmembranproteine Integrin  $\alpha 3\beta 1$  und Dystroglycan; sie ragen in die GBM hinein und sind dort mit Collagen IV, dem Hauptbestandteil der GBM, Agrin, dem häufigsten Heparansulfatproteoglycan (HSPG) in der GBM und Laminin 11 fest verbunden.

Welche bedeutende Rolle diese Verankerung für die Funktion der Podozyten hat, konnte unlängst anhand einiger Knock-out-Mäuse demonstriert werden (Zusammenfassung in Kretzler et al., 2001).

Die *Integrin  $\alpha 3$* -Knock-out-Maus als auch die *Laminin 11*-Knock-out-Maus entwickelten einen Phänotyp, der typisch für das kongenitale nephrotische Syndrom ist. Es kam vor allem zu einer Verschmelzung der Fußfortsätze des Podozyten (Holthöfer et al, 1999).

Podozyten sind bei einer Vielzahl von glomerulären Erkrankungen betroffen. Die Ursachen können einen immunen (membranöse Nephropathie), toxischen (Puromucin), stoffwechselbedingten (Diabetes) oder auch hämodynamischen (glomerulärer Bluthochdruck) Ursprung haben. Bei den beschriebenen Erkrankungen des Podozyten geht im frühen Stadium die Verschmelzung der Fußfortsätze, verbunden mit einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, eng einher mit einer massiven Proteinurie.

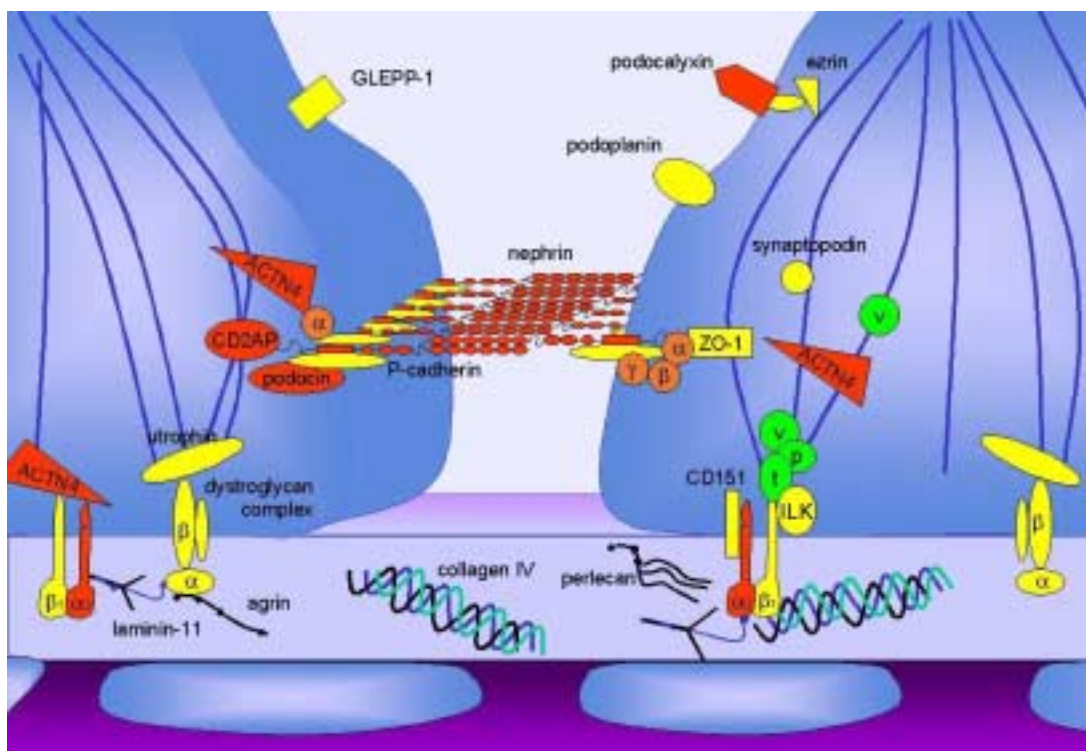


Abb. 1.6: Vereinfachte schematische Darstellung der an der Verankerung der Podozytenfußfortsätze in der GBM beteiligten Proteine (Darstellung von: van den Berg J., 2001). v: Vinculin, p: Paxillin, t: Talin, ACTN4:  $\alpha$ -Actinin 4, ILK: Interleukinase

Die gleichen Veränderungen wurden bei Nullmutanten für *α-Actinin 4*, das bei der Verankerung des Podocyten in der GBM beteiligt ist, und für *Podocin*, das bei der Funktion der Schlitzmembran eine wichtige Rolle spielt, beobachtet werden. Andere frühe Veränderungen betreffen die glomeruläre Schlitzmembran, die hauptsächlich von Nephrin gebildet wird. Nephrin wurde entdeckt als Verursacher des congenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ (CNF). Eine Mutation des *Nephrin*-Gens (*NPHS1*) führt dazu, dass das veränderte Protein nicht mehr in der Lage ist, die Schlitzmembran zu bilden.

In späteren Stadien der oben beschriebenen glomerulären Erkrankungen kommt es, im Anschluß an die Verschmelzung der Fußfortsätze, zu einer Ablösung vieler Podozyten von der GBM und einer Hypertrophierung der verbliebenen Podozyten sowie einer Vermehrung der Mesangialzellmatrix. Besonders beachtenswert ist, dass die Zahl der verbliebenen Podozyten in den Fällen, in denen die Ursache wie z.B. toxische Stoffe oder glomerulärer Bluthochdruck wieder verschwunden ist, nicht mehr zunimmt.

## **1.4 Denys-Drash-Syndrom**

Die genetische Ursache des Denys-Drash-Syndroms ist ausschließlich in heterozygot vorliegenden Punktmutationen des *Wilms-Tumor1*-Gens zu finden. Die zugrunde liegende Genetik wird unter 1.4.3 ausführlicher beschrieben.

### **1.4.1 Krankheitsbild**

Bei Neugeborenen tritt das Denys-Drash-Syndrom (DDS) mit einer Häufigkeit von 1:100.000 auf und wurde erstmals von P. Denys und A. Drash beschrieben (Denys et al., 1967; Drash et al., 1970). Es manifestiert sich klinisch als komplette und inkomplette Form manifestieren. Das komplette DDS ist charakterisiert durch eine Glomerulopathie, Wilms-Tumor und intersexuelles Genitale. Die inkomplette Form ist dadurch definiert, dass nicht alle drei Charakteristika sondern nur die Glomerulopathie isoliert oder kombiniert mit dem Wilms-Tumor oder dem intersexuellem Genitale auftritt.

Hauptcharakteristikum ist also die Glomerulopathie. Histologisch zeigt sich hierbei in den meisten Fällen eine diffuse mesangiale Sklerose (DMS) und seltener eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (Habib et al., 1985). Klinisch manifestiert sich die Glomerulopathie sehr früh als massive Proteinurie mit nephrotischem Syndrom

und führt rasch, meist vor dem 3. Lebensjahr, zu terminalem Nierenversagen. Zu beobachten ist eine diffuse Zunahme der fibrillären mesangialen Matrix mit geringer Mesangialzellvermehrung. Dies führt zu einer Einengung und Sklerotisierung der Kapillarschlingen, die von hypertrophierten, vakuolisierten Podozyten kranzartig umgeben sind. Außerdem findet man eine teilweise verdickte Basalmembran sowie ein fibrotisches Niereninterstitium und dilatierte Tubuli (Habib et al., 1993).

Die Genitalanomalien manifestieren sich beim karyotypisch männlichen Erkrankten als ein Pseudohermaphroditismus masculinus (weibliches Genitale und männliche Gonaden). Es kommen aber auch Hypospadie (Verlagerung der Harnröhrenmündung an die Unterseite des Penis), und bilateraler Kryptochismus (weder sicht- noch tastbare Hoden) vor. Bei weiblichen Erkrankten ist das Geschlecht häufig unauffällig. Die inneren Genitalien variieren bei beiden Geschlechtern sehr stark und stimmen oft nicht mit den äußeren Genitalien überein. Teilweise kommen Strukturen, die sich vom Wolff-Gang ableiten, wie Tube, Uterus oder Vagina und Strukturen, die sich vom Müller-Gang ableiten, wie Samenleiter und Nebenhodengang, gleichzeitig vor. Zusätzlich finden sich auch funktionsunfähige Gonaden, wie Stranggonaden oder unreifes, infantiles oder rudimentäres Hoden- und Ovargewebe (Ovotestis) (Eddy A. & Mauer S., 1985).

Wenn die Nieren nicht entfernt werden, liegt die Wahrscheinlichkeit bei ca. 90%, einen Wilms-Tumor (WT) zu entwickeln. Wilms Tumoren von Patienten mit DDS wurden häufig früher als sporadische WT diagnostiziert und sind öfter bilateral (Goldman et al., 1981, Jadresic et al., 1990).

#### **1.4.2 *WT1*-assoziierte Syndrome**

Ein weiteres *WT1*-assoziiertes Syndrom ist die Aniridie. Es handelt sich dabei um das kongenitale Fehlen von Teilen oder der gesamten Iris.

Beim WAGR-Syndrom ist die Aniridie kombiniert mit einer mentalen Retardierung, Wilms-Tumor und Genitalmissbildung. Das WT-Risiko liegt bei 50%. Zytogenetische Analysen (Royer-Pokora et al., 1991a) ergaben eine enge räumliche Nähe des *WT1*-Gens mit dem *Pax6*-Gen (Aniridie). Ursache ist die Deletion des Bereichs, der das *WT1* und das *Pax6*-Gen überspannt.

Das Frasier-Syndrom hat folgende typische klinische Merkmale: Pseudohermaphroditismus masculinus, eine komplette XY-Gonadendysgenese (Fehlen 9

funktionstüchtiger Keimzellen), eine Glomerosklerose (ausschließlich fokal segmental) und eine Veranlagung für Tumoren der Gonaden. Obwohl sich bei allen bisher untersuchten Patienten mit Frasier-Syndrom *WT1*-Mutationen fanden, wurden Wilms-Tumoren nur selten (5%) gefunden (Barbosa et al., 1999).

### 1.4.3 Molekulargenetische Grundlagen des Denys-Drash-Syndroms

#### Das Wilms-Tumor1-Gen

Die molekulargenetische Diagnose des DDS ist durch den Nachweis einer spezifischen Mutation im *WT1*-Gen möglich. Das *WT1*-Gen liegt auf Chromosom 11p13. Es besteht aus 10 Exons, verteilt auf 50 kBp genomische DNA und kodiert ein Transkript von 3 kBp (Abb. 1.7; Call et al., 1990; Gessler et al., 1990).

#### Struktur des *WT1* Gens mit alternativen Spleißstellen

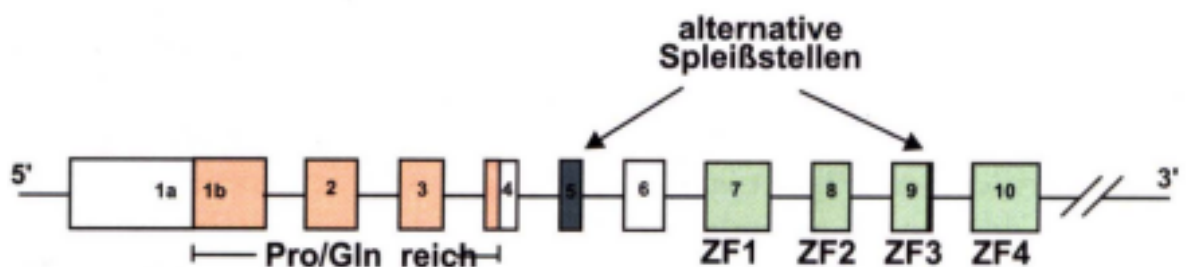


Abb. 1.7: Struktur und Spleißstellen des *WT1*-Gens. Die Exons sind als Rechtecke dargestellt, die alternativen Spleißstellen dunkelgrün markiert (Exon 5 und 9Bp am Ende von Exon 9). Die bekannten funktionellen Domänen sind orange bzw. hellgrün markiert. ZF: Zink-Finger; Pro/Glu: Prolin/Glutamin-reiche Domäne (Royer-Pokora B. und Schumacher V. 2001).

Vom Gen in 5'-Richtung findet man eine Promotorregion, die für die Regulation des Gens sorgt. Die *WT1*-Kontrollregion ist sehr GC-reich und enthält weder eine TATA noch eine CCAAT-Box (Hofmann et al., 1993), aber SP1-, Pax-2- und auch *WT1*-Bindestellen. Diese *WT1*-Bindestellen sind ein Hinweis dafür, dass sich *WT1* selbst regulieren kann (Rupprecht et al., 1994). Funktionell handelt es sich bei dem *WT1*-Protein um einen DNA-bindenden Transkriptionsfaktor mit vier Zinkfinger Motiven (ZF) im carboxyterminalen Ende und mit einer prolin- und glutaminreichen, transkriptionell aktiven Domäne im aminoterminalen Teil. Die *WT1*-Zinkfinger Domänen zeigen eine starke Aminosäuresequenzhomologie zu anderen ZF-Proteinen z.B. *EGR1* (Rauscher et al., 1990).

Durch das Vorkommen von zwei alternativen Spleißstellen, zwei Translationsstartstellen und RNA-Editing sind 24 Proteinisoformen möglich

(Mrowka C. & Schedl A., 2000). Das kodierte nukleäre Protein hat aufgrund der beschriebenen Charakteristika ein Molekulargewicht zwischen 45 und 49 kDa.

Die Ratio der Spleißvarianten ist während der gesamten embryonalen Entwicklung der Niere hochkonserviert. Die verschiedenen Spleißformen unterscheiden sich stark in der Fähigkeit Gene zu regulieren.

WT1 kann über seine Zinkfinger, die ein DNA-Bindemotiv darstellen, an die Promotor-Regionen einer Vielzahl von Genen binden und dabei diese Gene sowohl aktivieren als auch reprimieren.

Das WT1-Protein besitzt zusätzlich auch ein RNA-Bindemotiv (Menke et al., 1998). Es ist allerdings noch unklar welche Funktion die Interaktion mit der mRNA z.B. von *IGFII* hat. Weiterhin deutet die Entdeckung des WT1-Proteins in Spleißosomen auf eine noch unbekannt Funktion des Proteins beim Spleißen anderer mRNAs hin (Caricasole et al., 1996).

### **Die regulierte Expression von WT1**

Bisher ist noch wenig über die Regulation des *WT1*-Gens bekannt. Rückschlüsse über mögliche Funktionen von *WT1* ergeben sich aus dem Expressionsmuster. Während andere Transkriptionsfaktoren ubiquitär exprimiert werden, findet man das WT1-Protein nur in bestimmten Geweben und zu bestimmten Zeitpunkten. Im Laufe der Nierenentwicklung wird *WT1* zuerst schwach in Blastemzellen und Nierenbläschen, später am stärksten in Podozytenvorläuferzellen der „S-shaped bodies“ exprimiert. Sobald die Glomeruli ausgereift sind, beschränkt sich die Expression auf die Podozyten. Eine *WT1*-Expression konnte ebenfalls in der Genitalleiste, den fötalen Gonaden, dem Mesothel, der Milz, der Dezidua, Teilen des zentralen Nervensystems und des hämatopoetischen Systems nachgewiesen werden (Coppes M.J. & Pritchard-Jones K., 2000). Auffällig ist, dass *WT1* in einer Reihe von Zelltypen (Niere, Gonaden, Mesothel) während Zeiträumen exprimiert wird, in denen sich eine Differenzierung von Mesenchymgewebe zu Epithelzellen vollzieht.

### **Die DDS-Mutation**

Bei über 95% der DDS-Patienten ist eine Mutation im *WT1*-Gen nachweisbar; in 90% der Fälle handelt es sich dabei um *de novo* Keimbahnmutationen in der Zinkfingerregion des Gens. Die häufigste Mutation betrifft den Zinkfinger 3 und ist



ein Arginin  $\Rightarrow$  Tryptophan-Austausch in Position 394 (Review: Little & Wells, 1997). Wie in Abbildung 1.8 zu sehen, ist Arginin an der Position 394 (mit \* markiert) wesentlich an der Interaktion mit der DNA beteiligt. Beachtenswert ist, dass Patienten mit inkomplettem DDS, die nur eine isolierte diffuse mesangiale Sklerose aufweisen, die gleichen konstitutionellen *WT1*-Mutationen tragen wie Patienten mit komplettem DDS (Schumacher et al., 1998). Die gleiche Mutation führt scheinbar zu unterschiedlichen Ausprägungen des Phänotyps.

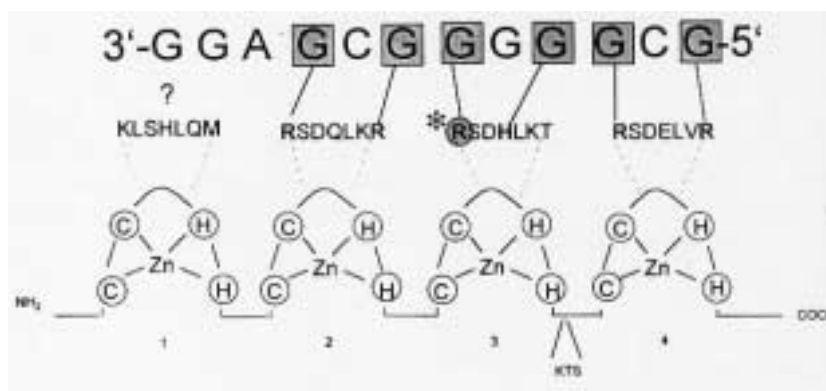


Abb. 1.8: Die vier Zinkfinger des *WT1*-Gens (mit den AS), die an der Interaktion mit den Basen der DNA beteiligt sind. Oben aufgeführt ist die DNA-Sequenz, an die die dargestellte Isoform des *WT1*-Proteins bindet. Bei der mit dem Stern gekennzeichneten AS handelt es sich um den Hot Spot, der besonders häufig von Mutationen beim DDS betroffen ist (Royer-Pokora B. und Schumacher V. 2001).

Mutationen in der Zinkfingerregion beeinträchtigen die spezifischen Bindungseigenschaften und damit die regulatorische Funktion des *WT1*-Proteins. Die oben beschriebene Mutation führt folglich dazu, dass das DDS-Protein nicht mehr an seine ursprüngliche Zielsequenz binden kann (Pelletier et al., 1991). *IGF-II*, *Pax-2*, *TGF $\beta$ 1*, *Bcl-2* sind die bekanntesten Zielgene von *WT1* (Zusammenfassung der potentiellen Zielgene: Menke et al., 1998, Scharnhorst et al., 2001). Die Fehlregulation unter anderem dieser Gene scheint bei der Entstehung von Glomerulopathien eine bedeutende Rolle zu spielen.

Die persistierende Expression von *Pax-2* führt bei transgenen Mäusen zu anomalem Glomerulus- und Tubulus-Epithel. Die Podozyten zeigen den Verlust der Fußfortsätze und es tritt eine Proteinurie auf (Dressler et al., 1993). Es zeigen sich also Veränderungen, wie sie auch beim kongenitalen nephrotischen Syndrom beschrieben sind.

Pricci und Mitarbeiter wiesen (Pricci et al., 1996) in Zellkulturversuchen mit humanen Mesangiumzellen nach, dass *IGF-II* und *TGF $\beta$ 1* die Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen stimulieren. Eine übermäßige Verdickung der

GBM findet sich schließlich auch bei der beschriebenen DMS. Andere Wissenschaftler demonstrierten, dass eine Überexpression von IGF-II zu renalen Abnormalitäten in der Form von unreifen und teilweise sklerotisierten Glomeruli und hypoplastischen Tubuli führt (Morison et al., 1996).

Eine erhöhte Bcl-2 Expression fanden Takemura und Mitarbeiter (1995) in Glomeruli von Patienten mit fokaler und segmentaler Glomerulosklerose.

### **Genotyp-Phänotyp-Korrelation**

Missense-Mutationen, wie sie typischerweise im *WT1*-Gen beim DDS vorkommen, führen in allen Fällen zur Ausprägung des nephrotischen Syndroms und zu terminalem Nierenversagen. Zwei Ursachen können dem zugrunde liegen: Entweder die Mutation wirkt dominant negativ oder aber es kommt zu einem „Gain of function“.

Im Fall der negativen Dominanz würde das Wildtyp-Allel durch die Aktivität des mutierten Allels inaktiviert werden. Da das *WT1*-Protein Homodimere bildet, ist es ein Leichtes sich vorzustellen, wie das mutierte Protein das Wildtyp-Protein bindet und somit inaktiviert.

Wäre ein „Gain of function“ die Erklärung für das Krankheitsbild, bedeutete dies, dass das mutierte Allel ein Protein mit neuen Funktionen kodieren würde. Dieses DDS-Protein könnte an neue Erkennungssequenzen binden und somit andere Gene als normalerweise regulieren.

Ein simpler Funktionsverlust des mutierten Allels im Sinne einer Haploinsuffizienz kann jedenfalls als Ursache ausgeschlossen werden, da es in diesem Fall zu dem schon beschriebenen WAGR-Syndrom kommt. Deletionen des *WT1*-Gens führen zu einem milderem Krankheitsbild als das Auftreten der Punktmutation beim DDS. In beiden Fällen treten Wilms-Tumoren aber nur dann auf, wenn auch das zweite *WT1*-Allel inaktiviert wird. Mit dem Auftreten von Wilms-Tumoren im homozygoten Zustand offenbart sich die Funktion des *WT1*-Gens als ein Tumor-Suppressor-Gen.

#### **1.4.4 Therapie des Denys-Drash-Syndroms**

Die Therapie des nephrotischen Syndroms besteht im wesentlichen in einer Dialyse des Blutes der Denys-Drash-Patienten, wenn aufgrund der fortschreitenden Niereninsuffizienz die Entgiftung des Körpers über die Nieren nicht mehr gewährleistet ist. Sobald eine Spenderniere zur Verfügung steht, wird unilateral oder bilateral nephrektomiert. Die Nephrektomie dient letztendlich auch dazu, die Entstehung von Wilms-Tumoren, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% auftreten, zu verhindern. Ein Problem ist die Beschaffung und Transplantation von Spendernieren für die betroffenen Kinder, die alle jünger als 3 Jahre sind. Die Fortschritte in der Chirurgie der letzten Jahre ermöglichen es, Nieren von Erwachsenen zu teilen und nur Teile der Spenderniere den Kindern mit ihrem kleinen Thoraxvolumen zu transplantieren. Die Prognose für die Kinder mit transplantierten Nieren ist gut, es ist nicht mit einer erneuten Entwicklung des nephrotischen Syndroms oder eines Wilms Tumors zu rechnen. Das intersexuelle Genitale wird normalerweise in die Richtung des äußeren Phänotyps nach männlichem oder weiblichem Genitale angepasst.

## 1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen, die aufgrund einer heterozygot vorliegenden *WT1*-Mutation zur Entstehung der diffusen mesangialen Sklerose beim Denys-Drash-Syndroms führen, mit molekulargenetischen und biochemischen Analysen erforscht und mit histologischen Daten korreliert werden.

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass es beim nephrotischen Syndrom zu Veränderungen der Filtrationsbarriere in den Glomeruli und so zur Proteinurie kommt. Betroffen von diesen Veränderungen sind vor allem die glomeruläre Basalmembran, die stark verdickt erscheint und die Podozyten, bei denen es zu einer Verschmelzung der Fußfortsätze und einem gestörten Aufbau des Zytoskeletts kommt. Durch immunhistochemische Analysen sollte an Nierengewebe von Denys-Drash-Patienten untersucht werden, welche Komponenten der glomerulären Basalmembran im Einzelnen betroffen sind und welche Faktoren bei den Podozyten zu den beschriebenen Veränderungen führen.

Weiterhin sollten cDNA-Expressionsprofile von Podozytenkulturen und Glomeruli aus Kryogewebe gesunder und erkrankter Personen erstellt und miteinander verglichen werden. Dazu musste zuvor die Methode des „Expression-Profiling“ etabliert werden. Für die Durchführung der Expressionsanalysen aus Kryogewebe war zudem die Etablierung einer Amplifikationsmethode der mRNA notwendig, da sich durch die Lasermikrodissektion nur sehr geringe RNA-Mengen extrahieren ließen. Aus dem Vergleich der Expressionsprofile sollten differentiell exprimierte Gene detektiert werden, die neue Erkenntnisse zur Pathogenese des Denys-Drash-Syndroms liefern könnten.

Damit zukünftige in-vitro-Analysen an einem geeigneten Modell durchgeführt werden können und permanent Podozyten in Kultur für verschiedenste Untersuchungen zur Verfügung stehen, sollten Podozyten von frisch operierten Patienten mit Denys-Drash-Syndrom als primäre Zellkulturen angelegt und mittels Transfektion des *Telomerase*-Gens immortalisiert werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe bezogen und besaßen den Reinheitsgrad pro analysis. Die Chemikalien stammten von folgenden Firmen:

- Ambion Ltd., Cambridgeshire, UK
- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Biozym, Hamburg
- DAKO, Hamburg
- Roche-Diagnostics, Mannheim
- Merck, Darmstadt
- Invitrogen, Heidelberg
- Seromed, Berlin
- Shandon, Frankfurt a.M.
- Sigma, München
- Stratagene, Heidelberg

### 2.2 Radiochemikalien

Folgende Radiochemikalien wurden verwendet:

- $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP      NEN - Perkin Elmer; ICN
- $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP      NEN - Perkin Elmer; ICN
- $\alpha$ -<sup>33</sup>P dCTP      ICN
- $\alpha$ -<sup>33</sup>P dATP      ICN

### 2.3 Enzyme

Folgende Enzyme wurden verwendet:

Tab. 2.1: Übersicht der verwendeten Enzyme

Produkt	Hersteller
Taq DNA-Polymerase, rekombinant	Invitrogen
Accurase DNA-Polymerase	Invitrogen
Klenow Polymerase	Amersham
RNasin	Promega

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Reverse Transkriptase (Superscript RT II)	Invitrogen
DNase I / Polymerase I Mix	Roche
DNase I	Stratagene
DNA Ligase ( <i>E.coli</i> )	New England Biolabs.Inc
DNA Polymerase I ( <i>E.coli</i> )	New England Biolabs.Inc
Terminale Deoxynukleotidyl Transferase	Invitrogen
T4-DNA-Polymerase (1U/ $\mu$ l)	New England Biolabs.Inc

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche, New England Biolabs, MBI Fermentas und Invitrogen bezogen. Die Enzyme wurden mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen 10x Restriktionspuffern verwendet.

## 2.4 Größen und Konzentrationsmarker

Folgende DNA-Größenmarker wurden verwendet:

### 1kBp-DNA-Marker (Invitrogen):

12216/11198/10180/9162/8144/7126/6108/5090/4072/3054/2036/1636/1018/  
517/506/396/344/298/220/201/154/134/75 Bp

### 100 Bp-DNA-Marker (Invitrogen):

2072/1500/1400/1300/1200...300/200/100 Bp

### *Lambda DNA/Hind III-Verdau eines $\mu$ g (Invitrogen)*

<b>Bp</b>	<b>ng</b>
23130	480
9416	190
6557	140
4361	90
2322	50
2027	40
564	10
125	2

Folgender Protein-Größenmarker wurde verwendet:

### Precision Protein Standard (BIO-RAD)

250/ 150/ 100/ 75/ 50/ 37/ 25/ 15/ 10 kDa

## 2.5 Bakterien

Transformationen wurden mit dem Bakterienstamm D5H $\alpha$  (Hanahan, 1985) durchgeführt.

## 2.6 Antibiotikallösungen und Kulturmedien für Bakterien und humane / tierische Zellkultur

Die Medien und Antibiotikallösungen für Bakterienkulturen wurden selbst hergestellt.

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Medien und Antibiotika für Bakterienkulturen

Lösung	Bestandteile
LB- (Luria Bertani) Medium	10g Bacto Trypton; 5g Bacto Yeast; 10g NaCl; ad 1l ddH <sub>2</sub> O; autoklavieren
LB-Agar	10g Bacto Trypton; 5g Bacto Yeast; 10g NaCl, 1,5% Agar (w/v); ad 1l ddH <sub>2</sub> O, autoklavieren
Ampicilin, Kanamycin	100mg/ml bzw. 50 mg/ml in sterilem ddH <sub>2</sub> O, Lagerung bei -20°C

Für Zellkulturen wurden folgende Medien und Antibiotika benutzt:

Hygromycin B	Invitrogen
Interferon gamma (mouse, rec.)	Invitrogen
NuSerum™	Becton Dickinson

### Medium für humane Podozyten

50ml	Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
5ml	1M L-Glutamin	Invitrogen
5ml	Penicilin-Streptomycin-Mix	PAA
2,5ml	1M HEPES-Buffer	Invitrogen
0,5ml	NEA (Non-Essential Amino-Acids)	Invitrogen
0,5ml	1M Natrium Pyruvat	Invitrogen
0,5ml	ITS (Insulin-Transferrin-Selenite)-Mix	Roche
ad 500ml	RPMI-1640-Medium	Biochrom

### Medium für NIH3T3-Zellen

500ml	Dubelcco's MEM-Earle	Biochrom
50ml	FCS	Invitrogen
5ml	Penicilin-Streptomycin-Mix	PAA

## Medien für die DEAE-Dextran-Transfektion

### ***K1-Medium mit 2% Nu-Serum:***

475ml DMEM/Ham's F12 1:1, 5ml 1M HEPES-Puffer, 10ml Nu-Serum, 0,5ml ITS premix, 5ml Pen/Strep-Mix, 5ml Glutamin (0,2M)

### ***K2-Medium, serumfrei:***

485ml DMEM/Ham's F12 1:1, 5ml 1M HEPES-Puffer, 180µl Hydrocortison (50µg/ml in EtOH, Endkonz.:  $5 \times 10^{-8}$ M), 50µl EGF 20µg/ml (Endkonz.: 10ng/ml), 0,5ml ITS Premix, 5ml Pen/Strep-Mix, 5ml Glutamin (0,2M)

## 2.7 Reagentien für die Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Transfektion humaner Zellen wurden folgende kommerziell erhältliche Transfektionsreagenzien verwendet:

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten Transfektionsreagenzien

Produkt	Hersteller
FuGENE™ 6 Transfection Reagent	Roche
GeneJammer Transfection Reagent	Stratagene
GenePORTER 2 Transfection Reagent	Peqlab
Geneshuttle 20	Quantum
Lipofectamine 200 Reagent	Invitrogen
Transfection Reagent Selector Kit	Qiagen

## 2.8 Puffer und Lösungen

Die aufgeführten Puffer und Lösungen wurden wie beschrieben selbst hergestellt:

Tab. 2.4: Übersicht der hergestellten Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteile
Blotpuffer (Western Blot)	15mM Tris-Glycin (pH 8.3); 20% Methanol,
Chloroquine	100mM in dH <sub>2</sub> O
DABCO Antifade	2,3%DABCO; 2% Tris HCl pH 8,0; 85% Glycerin
DAPI Gebrauchslösung	1:2000 in 2xSSC / Tween 20
DAPI Stammlösung	5mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
DEAE-Dextran	1mg/ml in dH <sub>2</sub> O
Denaturierungslösung (Atlas Array)	1M NaOH; 10mM EDTA
Denhardts Lösung (100x)	2% Ficoll 400; 2% Polyvinylpyrrolidon; 2% BSA



<b>Puffer</b>	<b>Bestandteile</b>
EDTA-Lösung (0,5M)	0,5M EDTA, pH 8,0 (NaOH)
Erstrang/Lysis-Puffer (Brady, RNA-Amp)	52mM Tris-HCl, pH 8,3; 78mM KCl, 3,1mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,52% NP-40
Ethidiumbromid Stammlösung	10mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Ficoll Ladepuffer (5x)	25% Ficoll 70; 25mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau
Guanidinthiocyanatlösung	25mM EDTA; 0,5% Sarkosyl; 4M Guanidinthiocyanat
HBS (pH 7,05)	Hepes 20mM; NaCl 137mM; KCl 5mM; Dextrose 6mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,7mM; ad dH <sub>2</sub> O
Lösung A (Silberfärbung)	10% Ethanol; 0,5% Essigsäure
Lösung B (Silberfärbung)	0,1% AgNO <sub>3</sub>
Lösung C (Silberfärbung)	1,5% NaOH; 0,01% NaBH <sub>4</sub> ; 0,015% Formaldehyd (37%)
Lösung D (Silberfärbung)	0,75% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Lsg. A (10x; DEAE-Dextran-Transfek.)	NaCl 8,0g; KCl 0,38g; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2g; Tris-Base 3,0g; Mit HCl auf pH 7,5 einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 100ml auffüllen, steril filtrieren
Lsg. B (100x; DEAE-Dextran-Transfek.)	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,5g; MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O 1,0g; mit dH <sub>2</sub> O auf 100ml auffüllen, steril filtrieren
Neutralisierungslösung (Atlas Array)	1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,0
PBS	80mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 100mM NaCl, pH 7,5
PCR-Puffer (Nephrin-Gen)	200mM Tris HCl pH 8,4; 500 mM KCl; 5mM MgCl <sub>2</sub>
PCR-Puffer, 10x (Invitrogen)	200mM Tris HCl pH 8,4; 500 mM KCl; 15mM MgCl <sub>2</sub>
Phenol	Phenol mit 0,02M Tris HCl pH 8,0 gesättigt
Plaque Screen Buffer (PSB)	1M NaCl; 1g/l Na-Pyrophosphat; SDS; 5mM; 50mM Tris/HCl pH 7,5; 10ml/l 100x Denhardts Lösung; 1% EDTA
RIPA-Puffer	Triton X-100 1%; Na-Deoxycholate 1%; SDS 0,1%; NaCl 0,15M; Na-Phosphate (pH 7,2) 0,01M; Trasyolol 1%
RNA-Denaturierungspuffer	4M GITC; 0,02M Na-Citrat; 0,5% Sarkosyl
Second-Strand-Buffer (10x; Barry, RNA-Amp.)	200mM Tris (pH 6,9); 900mM KCl; 46mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,5mM Nicotine Adenine Dinucleotide, 100mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Sephadex G75-Säulenfüllung	Herstellung: 3g Sephadex-Pulver in 50ml DEPC-TE aufnehmen, in 2ml Spritze Glaswolle mit steriler Pinzette eindrücken, 1,7ml Säulenmaterial einfüllen, 5min bei 700xg zentrifugieren
SE-Puffer	75mM NaCl; 0,92mM EDTA; pH 8,0
SSC (20x)	3M NaCl; 0,3M NaCitrat, pH 7,0

Puffer	Bestandteile
SSCP-Ladepuffer	95% Formamid (deionisiert); 10mM EDTA
Strip Lösung (Atlas Array)	0,5% SDS
TAE (50x)	2M Tris Base; 5,71% Eisessig (v/v); 50mM EDTA
Tailing-Puffer (Brady, RNA-Amp)	800µl 5x terminal Transkriptase-Puffer, 30µl dATP (100mM), 1,17ml dH <sub>2</sub> O
Target Retrieval Solution (DAKO)	1:10 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnen
TBE (10x)	0,89M Tris Base; 0,89M Borsäure; 0,02M EDTA
TBS (DEAE-Dextran-Transfek.)	1x frisch aus Lsg. A und Lsg. B herstellen
TE (1x)	10mM Tris/HCl, pH 7,4; 1mM EDTA
Terminale Deoxynukleotidyl Transferase-Puffer, 2x	0,5mM DTT; 10mM dTTP; 0,25M Ca-Cacodylate (pH 7,2); 5mM CoCl <sub>2</sub>
Terminationsmix (10x, Atlas Array))	0,1M EDTA; 1,0mg/ml Glycogen
Transfer-Puffer (Western Blot)	0,1M Tris-Base; 1M Glycin
Western-Blot-Strip-Puffer	2% SDS, 62,5mM Tris HCl (pH 6.8), 100mM β-Mercaptoethanol

Alle Lösungen wurden mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und zum Teil autoklaviert oder steril filtriert. Lösungen zum Arbeiten mit RNA wurden mit 0,2% DEPC behandelt und anschließend autoklaviert.

## 2.9 Oligonukleotide und Vektoren

Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden über die Firma Metabion bezogen.

Tab. 2.5: Oligonukleotide für SMART-Methode

Oligonukleotid	Sequenz
SMART II Oligonukleotid	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG-3'
cDNA-Synthese-Primer	5'AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACTT T <sub>30</sub> TVN-Wobbles-3'
LD-PCR-Primer (SMART)	5'-AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3'

Tab. 2.6: Oligonukleotid für RNA-Amplifikation (Brady & Iscove)

Oligonukleotid	Sequenz
dT(24)-X-Oligo	5'-ATGTCGTCCAGGCCGCTCTGGACAAAATATGAATTCT <sub>24</sub> -3'

Tab. 2.7: Oligonukleotide für Amplifikation mittels T7-Polymerase

Oligonukleotid	Sequenz
T7 Oligo 1	5'-GGCCAGTGAATTGTAATAGCACTCACTATAGGGAGGCGG <sub>t24</sub> -3'
T7 Oligo 2	5'-AAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG CGCT <sub>15</sub> -3'
T7 Oligo 3	5'-AAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG GCTT <sub>15</sub> -3'

Oligonukleotid	Sequenz
T7 Oligo 4	5'-CGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGT <sub>21</sub> -3'
T7 Oligo 5	5'-GGATCCTAATACGACTGACTATAGGTT <sub>24</sub> -3'
T7 Oligo 6	5'-TCTAGTCGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGG GCGT <sub>27</sub> -3'

Tab. 2.8: cDNA-Oligonukleotide für den Telomerasenachweis

Oligonukleotid	Sequenz
RA 58	5'-GTCTTGCGGCTGAAGTGCACA-3'
HTRT3' UTR	5'-GGGCTGCTGGTGTCTGCTCTCGGCC-3'
RA 55	5'-TCCGCACGTGAGAAT-3'

Tab. 2.9: Übersicht der verwendeten cDNA-Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz
Nephrin for	5'-AGGATTACGCCTCTTCACA-3'
Nephrin rev	5'-GCTGGTCTTCAGTTCTCCA-3'
PAX2 for	5'-CACGGCTGTGTCAGCAAATC-3'
PAX2 rev	5'-GCTCAGGGTTGGTGGATGCA-3'
IGF1 for	5'-TCCTCCTCGCATCTCTTCTA-3'
IGF1 rev	5'-CTTCTGGGTCTTGGGCATG-3'
Uromodulin for	5'-GGGCAGTAGACCTGAAGTA-3'
Uromodulin rev	5'-AGCTGCCCACCACATTGA-3'
GW3 (WT1-Gen; ZF1-4) for	5'-GGATCCTCTTGTACGGTCGGCATCT-3'
GW4 (WT1-Gen; ZF1-4) rev	5'-CCTGCAGACACTGAACGGTCCCCGA-3'
GapDH Clont.	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GapDH Clont.	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
Synaptopodin for	5'-GCCAGCACCTTCTCCAGAGAA-3'
Synaptopodin rev	5'-GCTGGGATACAGGACAGAA-3'

Tab. 2.10: cDNA-Oligonukleotide für semi-quantitative PCR

Oligonukleotid	Sequenz
GapDH sq for	5'-IRD800-CACTGGCGTCTTCACCACCATGG-3'
GapDH sq rev	5'-TCAGGTCCACCACTGACACGTTG-3'
MMP7 for	5'-IRD800-ATGGACTTCCAAAGTGGTCACCTACAG-3'
MMP7 rev	5'-GGATACATCACTGCATTAGGATCAGAG-3'
WT1 for	5'-IRD800-CCGGTGCTTCTGGAACTACCAGGTG-3'
WT1 rev	5'-GGCTGACCTCGGGAATGTTAGACACGAT-3'
Thy 1 for	5'-IRD800-CCATGAGAATACCAGCAGTTCACCC-3'
Thy 1 rev	5'-AGGCTGATGCCCTCACACTTGACC-3'
POD1 for	5'-IRD800-ATGCGAGTGCTGAGCAAGGCCTTC-3'

---



---

**Oligonukleotid Sequenz**


---

POD1 rew 5'-ACCATAAAGGGCCACGTCAGGTTG-3'

---



---

**Vektoren**

**pGRN 145** (Geron Corp.) ist ein 14002Bp großer eukaryotischer Expressionsvektor, der das humane *Telomerase*-Gen unter Kontrolle des MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus)-Promotors enthält. Der Vektor enthält weiterhin Resistenz-Gene gegen Hygromycin B, Puromycin und Dihydrofolate-Reduktase zur Selektion in eukaryotischen Systemen.

**pEGFP-WT450a** ist ein 4,7Kb großer eukaryotischer Expressionsvektor, der das humane Wilms-Tumor 1-Gen und das *EGFP*-Gen unter Kontrolle des CMV (Cytomegalivirus)-Promotors enthält. Das GFP-Fusionsprotein ist im Fluoreszenz-Mikroskop detektierbar. Der Vektor enthält Resistenz-Gene gegen Kanamycin und Neocin.

**2.10 Kits**

Die verwendeten kommerziell erhältlichen Kits stammen von den aufgeführten Firmen.

Tab. 2.11: Übersicht der verwendeten Kits

Produkt	Hersteller
Advantage™ II cDNA PCR-Kit	Clontech
Ampliscribe T7 High Yield Transcription Kit	Biozym
Atlas Plastik Human 8K MicroArray	Clontech
Atlas™ Human 3.6 Array	Clontech
Atlas™ Pure Total RNA Labelling Kit	Clontech
Atlas™ SMART™ Probe Amplification Kit	Clontech
BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD
Chroma Spin Columns	Clontech
DAB-Chromogen Färbe-System	DAKO
DAKO Antibody Diluent	DAKO
DAKO Biotin Blocking System	DAKO
DAKO EnVision™ visualization System	DAKO
DAKO LSAB+ Kit, Peroxidase	DAKO
DAKO Peroxidase Blocking System	DAKO
DAKO Proteinblock Serum-free	DAKO

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Endofree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Enhanced Avian RT-PCR Kit	Sigma
ExpressHyb™ Hybridization Solution	Clontech
Gel Drying Kit	Promega
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche
Megaprime DNA-Labeling System	Amersham
MEGAscript™	Ambion
Nucleospin Nucleic Acid Purification System	Clontech
Oligotex mRNA Purification Kit	QIAGEN
Optimized Buffer Kit (PCR)	Invitrogen
PCR-Select™ cDNA-Subtraction Kit	Clontech
Phase Lock Gel	Eppendorf
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAmp Tissue Kit	QIAGEN
QIAprep Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Quick-Prep Micro mRNA-Purification Kit	Amersham
Rediprime II DNA-Labeling System	Amersham
SMART™ PCR cDNA-Synthesis Kit	Clontech
Strataprep totalRNA Microprep Kit	Stratagene
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce
Trapeze Telomerase Detection Kit	Intergen
TRI Reagent LS RNA-DNA-Protein-Isolationkit	Molecular Research Inc.
Ultrapure dNTP-Set	Amersham
Unigene cDNA Array	RZPD

## 2.11 Antikörper

Die Antikörper wurden für die Untersuchungen zur Immunhistochemie und Immunfluoreszenz verwendet.

### Primärantikörper

Alle aufgeführten Primärantikörper wurden für IHC (Immunhistochemie) auf Kryoschnitten verwendet. Wenn die Antikörper auf Paraffinschnitten angewandt wurden, waren dazu die beschriebenen Demaskierungsbehandlungen vor dem Antigennachweis notwendig (nähere Informationen zur Demaskierung unter 4.1). Bei Einsatz eines Antikörpers auf Paraffinschnitten wurde die Konzentration

verdoppelt, bei Einsatz auf Western-Blot wurde die Konzentration um den Faktor 10 verringert.

Tab. 2.12: Informationen zu den verwendeten Primärantikörpern.

Antikörper	Klon	Herkunft	Art	Fixierung	Verdünnung für IHC bei Gefriergewebe	Vorbehandlung von Paraffinschnitten
<b><math>\alpha</math>-Actinin</b>	23144K	Dianova	M	A / M	1:5	Mikrowelle
<b>Agrin</b>	H109	Santa Cruz	P	A / M	1:50	
<b>Bcl-2</b>	124	DAKO	M	Aceton	1:400	TRS (high pH)
<b>Collagen IV</b>	CIV22	DAKO	M	A / M	1:50	TRS (low pH)
<b>Cytokeratin</b>	14.1	DAKO	M	A/M	1:50	
<b>EGFR</b>	EGFR1	DAKO	M	A / M	1:20	Mikrowelle
<b>Fibronektin</b>	093(101)	DAKO	P	A / M	1:400	unbehandelt
<b>IGF2</b>	126	SC	M	A / M	1:15	
<b>Integrin <math>\alpha 3\beta 1</math></b>	0083G	DAKO	M	A / M	1:1000	
<b>Laminin A</b>	00060	DAKO	M	Aceton	1:25	Pepsin
<b>MMP7 (Ab-3)</b>	ID2	Calbiochem	M	A / M	1:50	Mikrowelle
<b>Nephrin</b>		H. Holthöfer	P	A / M	1:800	Mikrowelle
<b>NovH</b>		B. Perbal	P	A / M	1:300	
<b>Synaptopodin</b>		P. Mundel	P	A / M	1:5	Mikrowelle
<b>Talin</b>	T3287	Sigma	M	A / M	1:100	Mikrowelle
<b>Tenascin</b>	025F	DAKO	M	A / M	1: 500	
<b>Thy 1</b>	415209C	Dianova	M	A / M	1:1200	
<b><math>\alpha</math>-Tubulin</b>	101K4865	Sigma	M	A / M	1:500	
<b>Vimentin</b>	01S09808	DAKO	M	A / M	1:20	
<b>Vinculin</b>	23399L	Dianova	M	A / M	1:500	
<b>Utrophin</b>	D050	Santa Cruz	M	A / M	1:100	
<b>WT (N-180)</b>	L098	Santa Cruz	P	A / M	1:200	
<b>WT (C-19)</b>	F286	Santa Cruz	P	A / M	1:300	Mikrowelle

*M: monoklonaler Antikörper; P: polyklonaler Antikörper; A / M: Aceton-Methanol-Fixierung; TRS: Target-Retrieval-Solution*

## Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden für die Immunfluoreszenz (IF) benutzt.

Anti-mouse Ig, FITC-konjugiert (1:40 verdünnt)	DAKO
Anti-rabbit Ig, FITC-konjugiert (1:50 verdünnt)	DAKO

## 2.12 Verbrauchsmaterial

Für die Experimente war folgendes Verbrauchsmaterial notwendig:

Tab. 2.13: Übersicht des benutzten Verbrauchsmaterials

Produkt	Hersteller
CapSure HS Caps	Arcturus
Coverplates	Shandon
Deckgläser	Shandon
Gelträgerfolie	FMC
Histoslides	Shandon
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym
Plastik-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Falcongefäße	Becton Dickinson
Objekträger	Menzel
Zellkulturschalen (Primaria)	Becton Dickinson
Objekträgerschalen für Zellkultur	Becton Dickinson
Objekträger, Adhäsions	Menzel
Nylon Membran Hybond N+	Amersham
Sofortbildfilme	Polaroid
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell
Nitrocellulose-Membran (45µm)	Schleicher & Schuell

## 2.13 Software

Für die Auswertungen der Experimente waren folgende Computerprogramme notwendig:

Tab. 2.14: Übersicht der benutzten Software

Produkt (Funktion)	Hersteller
Corel Draw 9.0 (Bildbearbeitung)	Sun Microsystems
Isis (Fluoreszenz-Auswertung)	Metasystems
Excel 2000 (Tabellenkalkulation)	Microsoft
Word 2000 (Textverarbeitung)	Microsoft

<b>Produkt (Funktion)</b>	<b>Hersteller</b>
AIDA Image Analysis 3.01	Raytest
AIDA Array Compare 3.00	Raytest
AIDA Biopackage 2.11	Raytest
Cluster	Stanford University
Treeview	Stanford University
KS100 (digitale Fotografie)	Zeiss

## 2.14 Geräte

Folgende Geräte zur Durchführung oder Dokumentation der Experimente wurden benutzt:

Tab. 2.15: Übersicht der verwendeten Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
96 Well Platten PCR Cyclers	MJ Bioscience
PE 9600 PCR Cyclers	Perkin Elmer
PE 4700 PCR Cyclers	Perkin Elmer
Phosphorimager FLA 3000	Fuji
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Phasenkontrast- / Durchlichtmikroskop	Zeiss
Sofortbildkammersystem für Mikroskope	Polaroid
PixCell <sup>®</sup> II LCM System	Arcturus
CM1900 Cryostat	Leica
Schlittenmikrotom	Leica



### 3. Patienten und Normalkontrollen

Um das Gewebe in einem möglichst guten Zustand zu erhalten, wurde es direkt am oder im Operationssaal abgeholt. Die für die Zellkultur bestimmten Gewebestücke wurden sofort in Vollmedium gegeben. Gewebe für Kryokonservierung wurde erst in Medium gelagert und später in flüssigem Stickstoff eingefroren oder aber direkt auf Trockeneis eingefroren. Gewebe für Paraffinkonservierung wurde direkt in gepuffertes Formalin gegeben und anschließend entsprechend weiterbehandelt.

#### 3.1 Patienten

Humanes Nierengewebe von neun Denys-Drash-Patienten mit kongenitalem, infantilem nephrotischen Syndrom konnten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die Daten der Patienten sind in Tab. 3.1 wiedergegeben. Das Gewebe der Patienten 5 und 8 konnte nur begrenzt für Untersuchungen herangezogen werden.

Tab. 3.1: Daten der Denys-Drash-Patienten

Bezeichnung	Alter *	Besonderes	Kryo- gewebe	Paraffin gewebe	Zell- kultur	Mutation <sup>#</sup> (Funktion des betroffenen Genabschnittes)
DDS 1	1		ja		ja	R366H (?)
DDS 2	2		ja		ja	H373R (?)
DDS 3	<3		ja			R394W (DNA-Bindung)
DDS 4	<3		ja	ja		G379C (?)
DDS 5	<3	Gewebe hat lange in NaCl gelegen	ja			R366H (DNA-Bindung)
DDS 6	<3		ja			D396N (Stabilisierung der Protein-DNA-Bindung)
DDS 7	<3			ja		R394W (DNA-Bindung)
DDS 8	<3	Gewebe hat lange in Formalin gelegen		ja		C385R (?)
DDS 9	<3		ja	ja		R394W (DNA-Bindung)

\*: zum Zeitpunkt der Nephrektomie, in Jahren; #: Die Mutationsuntersuchungen wurden von Dr. V.Schumacher durchgeführt

### 3.2 Normalkontrollen

Humanes Nierengewebe von 12 erwachsenen Personen und zwei Embryonen, die nicht am Denys-Drash-Syndrom erkrankt waren, konnten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Die Daten sind in Tab. 3.2 wiedergegeben.

Tab. 3.2: Daten der Normalkontrollen

Bezeichnung	Alter (bei Operation, in Jahre)	Besonderes	Kryo-gewebe	Paraffin-gewebe	Zell-kultur
Gewebeproben von Erwachsenen (Normal Adult Kidney > NAK)					
NAK 1	>60		ja		
NAK 2	>60	Harnleiterkarzinom	ja		
NAK 3	>60	Harnleiterkarzinom	ja		
NAK 4	>60	Harnleiterkarzinom	ja		
NAK 5	>60	Harnleiterkarzinom	ja		
NAK 6	25	Bakterien-Infektion	ja		
NAK 7	>60		ja		
NAK 8	>60	Wilms-Tumor	ja		
NAK 9	>60	Wilms-Tumor	ja		
NAK10	>60			ja	
NAK11 <sup>#</sup>	>60				ja
NAK12 <sup>#</sup>	>60				ja
Gewebeproben von Embryonen (Normal Embryonic Kidney > NEK)					
NEK 1	<0	Abort	ja		
NEK 2	<0	Abort		ja	

<sup>#</sup>: Die Podozytenkulturen NAK11 und Nak12, die aus Nierencortexgewebe von gesunden Personen stammen, wurden freundlicherweise von Prof. H. Pavenstädt zur Verfügung gestellt.

Alle Gewebeprobe wurde mit Einverständnis der betroffenen Personen oder, falls die Personen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch nicht volljährig waren, mit dem Einverständnis eines Erziehungsberechtigten entnommen.

## 4 Methoden

In der Abbildung 4.1 sind die angewandten Methoden dargestellt.

### Vorgehensweise

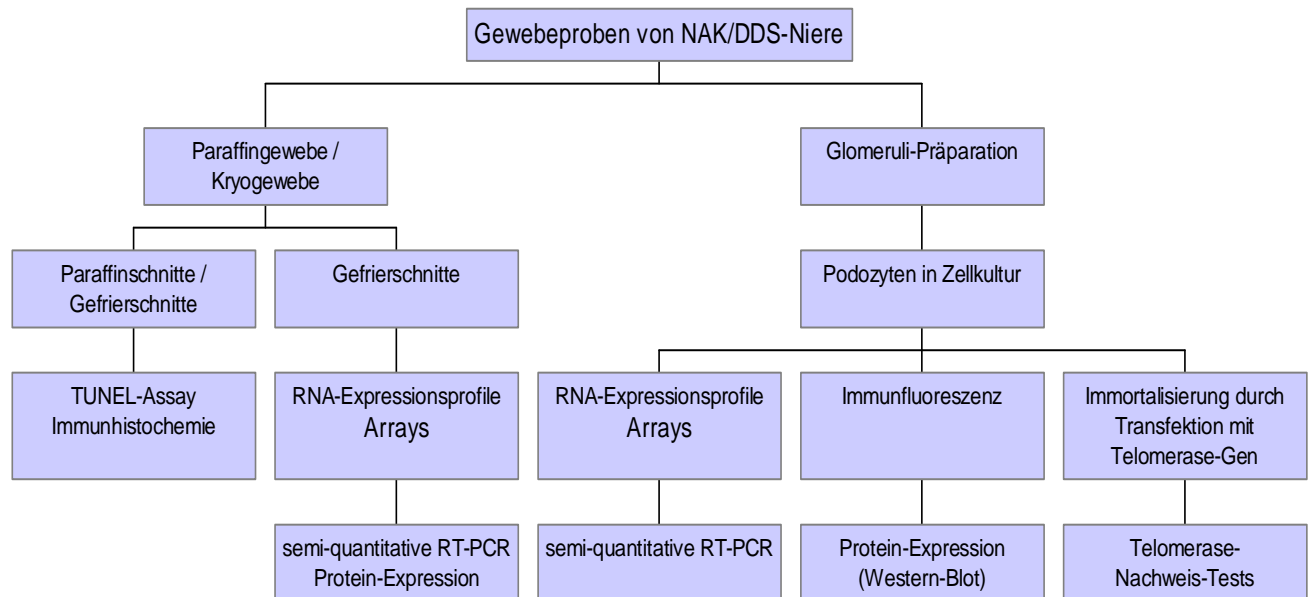


Abb. 4.1: Schematische Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen an den verschiedenen Proben im Rahmen dieser Arbeit

### 4.1 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Immunhistochemische (IHC) und immunfluorimetrische (IF) Techniken werden angewandt, um antigene Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten im mikroskopischen Bild nachzuweisen. Dies geschieht mit spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern, die mit Enzymen oder Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind.

#### Zellen aus Zellkultur

Zum Nachweis von Antigenen mittels immunhistochemischer oder -fluorimetrischer Methoden wurden die zu untersuchenden Zellen in speziellen Objektträger-Schalen bei den jeweiligen Kulturbedingungen angezchtet.

### **Gefrierschnitte**

Die 8µm dicken Schnitte wurden mit dem CM1900 Cryostat der Firma Leica angefertigt und für die normale Immunhistochemie für mindestens 2h bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

### **Paraffinschnitte**

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden mindestens 1h bei -20°C gelagert. 5µm dicke Schnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom der Fa. Leica angefertigt. Die Lagerung erfolgte bei RT. Vor der Weiterverarbeitung der Paraffinschnitte wurde eine Entwässerung wie folgt durchgeführt:

- Schnitte 30min bei 55°C in Luftinkubator erwärmen
- zweimal 10min in Xylol geben
- EtOH-Reihe: je 5min 95%, 80%, 70% stellen
- anschließend in PBS stellen

Je nach verwendetem Antikörper erfolgte bei Bedarf eine weitere Vorbehandlung der Schnitte, um das Antigen zu demaskieren. Folgende Möglichkeiten standen zur Verfügung:

#### **a) Behandlung in der Mikrowelle mit Citratpuffer**

- Schnitte in 10mM Na-Citrat (pH 6.0) geben
- fünfmal 5min in der Mikrowelle bei 600W kochen
- 15min bei RT abkühlen, dann in PBS waschen

#### **b) Behandlung mit Target Retrieval Solution (TRS)**

Für diese Behandlung standen zwei verschiedene TR-Lösungen zur Verfügung, low pH (pH 6.8) und high pH (pH 8.8).

- 1x TRS in Wasserbad auf 95°C erwärmen
- Gewebeschnitte 30min in TRS inkubieren
- 15min bei RT abkühlen, dann in PBS waschen

#### **c) Behandlung mit Pepsin**

- Schnitte mit 0,1% Pepsin in 0,01N HCl 10min bei RT inkubieren
- waschen der Schnitte in PBS

## LSAB Immunhistochemie-Methode (DAKO)

Der Vorteil dieser Methode gegenüber anderen Methoden (z.B. ABC-Methode) ist eine gesteigerte Sensitivität durch die verstärkende Wirkung eines biotinylierten Brückenantikörpers an den Primärantikörper (Kap. 4.2). Diesem Schritt folgte eine Inkubation mit einem StreptAvidin-Peroxidase-Konjugat, das durch die Reaktion mit einem Substratchromogen (hier DAB 3', 3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) angefärbt wurde.

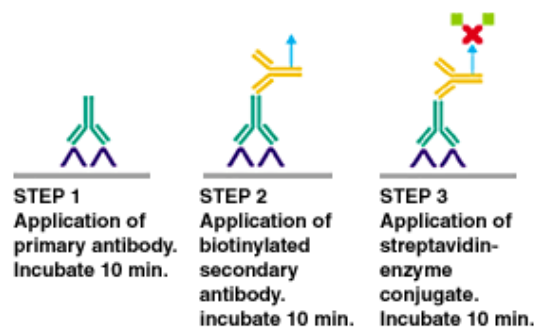


Abb. 4.2: Prinzip der LSAB-Methode (DAKO)

Als Gegenfärbung zur besseren Kenntlichmachung der antikörpergefärbten Bereiche wurde eine Hämatoxylin-Färbung eingesetzt. Die verschiedenen Primärantikörper und ihre Bedingungen sind im Materialteil aufgeführt. Vor der eigentlichen Methode des Antikörpernachweises war eine Fixierung für 10min in Aceton oder Aceton/Methanol 1:1 bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nötig. Nach dem Abdampfen des Fixativs begann die Antikörperfärbung. Der LSAB-Kit wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Nach der DAB Färbung erfolgte eine Hämatoxylin Gegenfärbung für 30sec in Meyers Hämatoxylin III. Die Farbreaktion geschah durch Bläuen unter fließendem Wasser für 5min.

## Immunfluoreszenz-Methode

Diese Methode eignet sich vor allem zum Nachweis spezifischer Antigene bei Zellen aus einer Zellkultur. Der Nachweis erfolgte über fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper.

### **Method**

- Waschen der Zellen in PBS
- Inkubation der Zellen in Fixativ aus 2% Paraformaldehyd und 4% Saccharose in PBS für 15min, waschen in PBS
- Permeabilisierung mit Triton X100 (0,3%) in PBS für 10min
- 30min Blocken mit FCS (2%), BSA (2%), Fischgelatine (0,2%) in dH<sub>2</sub>O
- Waschen in PBS
- 1h Inkubation des Primärantikörpers
- dreimaliges Waschen in PBS
- 1h Inkubation des Sekundärantikörpers
- dreimaliges Waschen in PBS
- Einbetten in DAPI-Antifade, Lagerung bei 4°C (dunkel)

## **4.2 In Situ Apoptose-Nachweis mittels Immunfluoreszenz**

Das Prinzip des Tests beruht auf dem Nachweis von kleineren DNA-Fragmenten, die beim Abbau der genomischen DNA in apoptotischen Zellen entstehen. Mit Hilfe des Enzyms Terminale-Deoxynucleotidyl-Transferase wird an die freien 3'-OH-Enden Fluorescein-markiertes dUTP angehängt (Kap. 4.3).

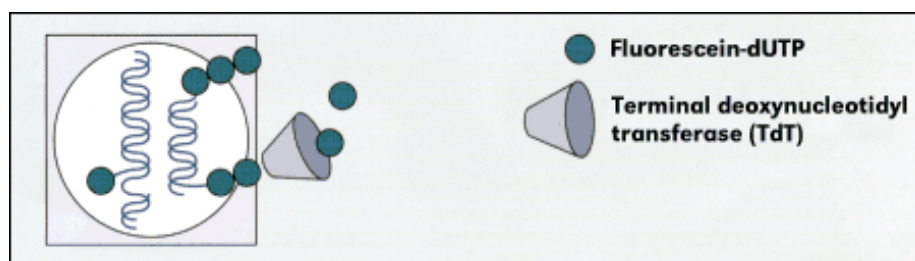


Abb. 4.3 : Prinzip des Apoptose-Nachweises (Roche-Diagnostics)

Der in situ Apoptose-Nachweis wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

## **4.3 Anlegen und Kultivierung primärer humaner Zellen**

### **Anlegen einer primären Podozytenkultur aus Nierencortexgewebe**

Die Anlage einer primären Podozytenkultur erfolgte anhand folgender unten aufgeführter Arbeitsschritte. Die Zeitdauer zwischen Gewebeentnahme und der Anlage der Kultur wurde so kurz wie möglich gehalten und überschritt 4h bei

Lagerung in Medium auf Eis nicht. Es wurde stets darauf geachtet, äußerst steril zu arbeiten.

**Method:**

- Nierengewebe in frisches Medium geben und auf Eis lagern
- Nierencortex von anderen Gewebeschichten in Medium säubern
- Gewebe mit Skalpell in 2-3mm kleine Stücke zerteilen
- Nierenstücke durch 3 Siebe aus Metall mit Porendurchmesser von 150, 100 und 80µm bei Nieren älterer Patienten oder aus Nylon bei Nieren jüngerer Patienten (bis 2 Jahre) mit Porendurchmesser von 120, 70, 30µm drücken
- Siebe mit viel Medium durchspülen und Gewebe immer feucht halten
- das Sieb mit den kleinsten Porendurchmesser abschließend von unten mit Medium gegenspülen. Die Glomeruli werden dadurch vom Sieb abgewaschen. Die Zahl der Glomeruli unter dem Mikroskop kontrollieren
- 5min bei 2000rpm zentrifugieren
- bei Nieren älterer Patienten sollte eine Collagenase-Behandlung erfolgen, dazu 10-20min bei 1U/ml bei 37°C inkubieren, unter Mikroskop betrachten
- 5min bei 2000rpm zentrifugieren
- in Medium aufnehmen und auf mit Collagen beschichtete 6-well Platten verteilen (zuvor kurz mit PBS einige Minuten bei 37°C in den Brutschrank stellen, PBS dann absaugen)
- 7-10 Tage nicht bewegen, anschließend sollten Podozyten aus Glomeruli ausgewachsen sein, Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung
- Mediumwechsel erfolgt zweimal die Woche. Bei geringer Passagenzahl einmal pro Woche umsetzen und 1:2 bis 1:5 verdünnen. Es sind üblicherweise 30 Passagen möglich.

**Passagieren von adherenten Zellen**

- Medium absaugen
- Trypsin / EDTA-Gemisch zu den Zellen in die Schale geben, vorsichtig schütteln und wieder abkippen
- Vorgang wiederholen, jedoch etwas Trypsin / EDTA (ca. 1-2ml) in der Schale lassen, bei 37°C inkubieren, nach 3-5 min unter dem Mikroskop beobachten, ob sich die Zellen lösen

- 
- 2ml Medium dazugeben und Zellsuspension je nach Zelldichte auf 2-5 Schalen verteilen, mit Medium auffüllen
  - Kultivierung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung, Mediumwechsel alle zwei Tage

### **Untersuchung auf Mycoplasmen**

Zur Analyse der Zellen in Kultur wurde regelmäßig der Mycoplasmen-Detections-Kit von Roche verwendet. Die Untersuchung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarose-gelelektrophorese (Kap. 4.6.2) analysiert.

## **4.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit dem Telomerase-Gen**

### **4.4.1 Transfektionsexperimente**

Transfektion ist die generelle Bezeichnung der Einschleusung von DNA in eukaryotische Zellen. Prinzipiell eignen sich alle verfügbaren Zellen als Wirtszellen für die Aufnahme von fremder DNA. Unterscheiden lassen sich:

- transiente Transfektion, bei der das eingeschleuste Gen nur vorübergehend aktiv ist und
- stabile Transfektion, bei der die Fremd-DNA fest in das Genom der Wirtszelle integriert wird und es zu einer dauerhaften Expression des transfizierten Gens kommt. Generell sehr schwierig ist die Transfektion von Zellen in Primärkultur. Verschiedene Transfektions-Techniken wurden ausgetestet.

Um die Transfektionseffizienz schneller überprüfen zu können, wurden auch Transfektionen mit einem Green-Fluorescent-Protein (GFP)-WT1-Fusionskonstrukt durchgeführt. Die Expression des GFP ließ sich im Fluoreszenz-Mikroskop nachweisen.

#### **a) Calciumphosphat-Technik**

Bei dieser Technik wird die DNA in Form von feinkörnigen Calciumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat erhält man durch Mischung von DNA/Calciumchlorid-Lösung mit HBS (enthält Phosphat-Ionen).

#### **Protokoll**

- 40µg Plasmid-DNA / 1ml HBS, mittels pipettieren mischen



- 
- Zugabe von 1/10 Volumen (100µl) 1,25M CaCl<sub>2</sub>
  - 30min bei RT inkubieren, schwaches Präzipitat (neblig) sichtbar
  - Zugabe von 0,5ml Präzipitat pro Schale, Inkubation für 4h bei 37°C
  - Medium entfernen, mit 4ml Medium (5% FCS) waschen, abziehen
  - Zugabe von 1ml 15% DMSO in HBS für 4min, abziehen
  - mit 4ml Medium (5% FCS) waschen (vorsichtig pipettieren, da Zellen nur noch schwach festsitzen)
  - 1-3min warten, Zellen sollten runde Form bekommen
  - Medium sehr vorsichtig abziehen, Zugabe von 5ml Vollmedium

### **Selektion**

- 3.Tag: Zellen verdünnen auf drei 150mm Schalen, mit 30ml Medium
- 4.Tag: Wechsel auf Selektivmedium (50µg Hygromycin/ml Medium)
- 2-3 Wochen: Verringerung der Hygromycin-Konzentration auf 10µg/ml

### **b) DEAE-Dextran-Technik**

Bei der DEAE-Dextran-Technik wird die DNA als Komplex mit Diethylaminoethyl-Dextran auf die Zellen aufgebracht. Diese Komplexe sollen besser und reproduzierbarer aufgenommen werden als DNA-Moleküle alleine.

### **Protokoll**

Trypsinierung der Zellen (75% Konfluenz), Zugabe von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml K1-Medium. Pro Well einer 6well-Platte je 2ml Medium mit Zellen

- zweiter Tag: Zellen sollten zu 60-70% konfluent sein
- EtOH-Fällung des Plasmids, Aufnahme in TE (Konz.: 20µg/ml)
- für jedes Well vermischen von 25µl DNA (500ng), 50µl PBS und 50µl DEAE-Dextran, Lagerung bei RT
- Entfernung des Mediums, Waschen der Zellen mit je 2ml PBS, dann 2x TBS
- Entfernen des TBS, Zugabe von je 125µl DNA/DEAE-Dextran zu Zellen
- Inkubation der Zellen 1h bei RT, alle 5ml per Hand schütteln (Verhinderung von Antrocknung)
- Waschen der Zellen mit je 2ml TBS, wieder entfernen
- Zugabe von je 2ml 10% DMSO in PBS, 1min Inkubation, anschließend waschen der Zellen mit je 2ml PBS
- Entfernen des PBS, Zugabe von je 100µM Chloroquine (2µl / 2ml) in K1-

Medium, Inkubation für 4h bei 37°C

- Medium ersetzen durch K1, 18h bei 37°C inkubieren
- dritter Tag: Medium durch K2-Medium ersetzen und drei Tage bei 37°C inkubieren, Selektion mit Hygromycin B starten

#### **c) Transfektion mit FuGENE™ 6 Transfection Reagent (Roche-Diagnostics)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 4 bzw. 8µg Vektor-DNA mit 6 bzw. 12µl Fugene-Reagenz kombiniert für die Transfektion in 6well-Plates eingesetzt.

#### **d) GeneJammer Transfection Reagent (Stratagene)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 1 bzw. 2µg Vektor-DNA mit 6 bzw. 12µl Genejammer kombiniert für die Transfektion in 6well-Plates eingesetzt.

#### **e) GenePORTER 2 Transfection Reagent (Peqlab)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 4µg Vektor-DNA mit 20µl Geneporter 2 Reagenz für die Transfektion in 6well-Plates eingesetzt.

#### **f) Geneshuttle 20 (Quantum)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 2µg Vektor-DNA mit 8µl GS40-Lösung für die Transfektion in 6well-Plates eingesetzt.

#### **g) Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Es wurden 4µg Vektor-DNA mit 8µl Lipofectamine für die Transfektion in 6well-Plates eingesetzt.

#### **h) Transfection Reagent Selector Kit (Qiagen)**

Die Transfektion wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Folgende Mengen an DNA und Transfektionsreagenzien wurden in 6well-Plates eingesetzt:

Tab. 4.1: Verwendete Kombinationen für Transfection Reagent Selector Kit (Qiagen)

Versuch	DNA-Menge	Effectene	Enhancer	Einwirkdauer
1	0,2µg	2µl	1,6µl	24h

Versuch	DNA-Menge	Effectene	Enhancer	Einwirkdauer
2	0,2µg	5µl	1,6µl	6h
3	0,4µg	10µl	3,2µl	24h
Versuch	DNA-Menge	Superfect		Einwirkdauer
4	3µg	2µl		2h
5	5µg	5µl		6h
6	2µg	10µl		4h

#### 4.4.2 Telomerase-Nachweis

Telomerase ist ein Ribonukleoprotein mit einer für die Aktivität des Ribozyms absolut notwendigen RNA-Komponente. Das Ribozym ist in der Lage entsprechende Monomere (TTAGGG, TTGGGG) an die 3'-Enden der DNA anzulagern. Die RNA codiert Sequenzen, die durch das Enzym an die 3'-Enden anligiert werden.

##### a) Telomerase-Enzymaktivitätsnachweis mittels TRAPEze-Kit (Intergen)

Die Methode beruht auf der Aktivität des Ribozyms. In vitro, unter geeigneten Bedingungen, ist die Telomerase in der Lage an das 3'-Ende eines Substrat-Oligonukleotids zahlreiche Telomerrepeats anzuhängen. In einem zweiten Schritt werden die verlängerten Substrat-Oligonukleotide mittels PCR (Kap. 4.6.3) amplifiziert und über eine Polyacrylamid-Elektrophorese nachgewiesen. Bei Telomerase-Enzymaktivität ist eine Produktleiter im 6Bp Abstand (50Bp, 56Bp, 62Bp...) nachzuweisen.

Die Methode wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Durchführung der Protein-Bestimmung ist unter Kapitel 4.9.1 beschrieben. Die Polyacrylamid-Elektrophorese wurde wie folgt durchgeführt:

##### **Methode:**

Herstellen eines 10% PAA-Gels (45ml):

- Zusammenfügen von: 8,5 ml PAA (40%, AA / BisAA (29:1)); 4,5ml TBE (10x), 0,4ml APS (10%), 31,6ml dH<sub>2</sub>O, nach dem Entgasen Zugabe von 20µl TEMED
- zügiges Einfüllen der Lösung in die mit Agarose abgedichtete Gelapparatur.  
Laufbedingungen: 150min bei 180V

Silberfärben des PAA-Gels (alle Schritte auf Schüttler):

- 
- Lösung B und D aus 10x Stammlösung verdünnen. Lösung A und C frisch herstellen
  - das Fixieren erfolgt durch zweimalige Inkubation für 3min bei RT in 300ml Lösung A
  - für 10min in Lösung B färben, dann zweimal mit dH<sub>2</sub>O waschen
  - bis zu einer deutlichen Anfärbung das Gels (etwa 20min) in Lösung C entwickeln
  - 5min in Lösung D fixieren

#### **b) Nachweis des exogenen Telomerase-Gens mittels PCR (Bodnar A.G., et al., 1998)**

Der Nachweis der Integration des exogenem *Telomerase*-Gens erfolgt mittels RT-PCR (Kap. 4.6.3). Es kann dabei zwischen exogenem und humanem, endogenem Telomerasegen unterschieden werden. Ausgenutzt wird dabei ein geringer Sequenzunterschied zwischen den Telomerasegenen. Für den Nachweis des endogenen Telomerasegens wurde die Primerkombination RA58 / hTRT3'UTR verwendet. Das exogene Telomerasegen wurde anhand der Primerkombination RA58 / RA55 nachgewiesen.

### **4.5 Laser-Capture-Mikrodissektion**

Die Laser Capture Mikrodissektion (LCM) ist eine Methode, um kleine Areale oder auch einzelne Zellen aus einem histologischen Schnitt zu isolieren. Zellgenaue und kontaktfreie Dissektionen aus heterogenen Gewebeschnitten ermöglichen Analysen von DNA, RNA und Proteinen, ohne Kontamination durch andere Zellsorten.

Bei der LCM wurde das Gewebe zunächst schonend entwässert, um die Mikrodissektion der Zellen zu ermöglichen. Das Aufsetzen des LCM-Caps, das mit einem speziellen Transferfilm versehen ist, erfolgte auf den gewünschten Gewebebereich. Der Transfer-Film wurde mittels eines Niedrigenergie-Infrarot-Lasers aktiviert und verschmolz dabei mit der jeweiligen Zelle oder Zellgruppe. Die DNA, RNA oder Proteine wurden direkt vom Cap extrahiert, damit mögliche Kontaminationen vermieden wurden (Abb. 4.4).

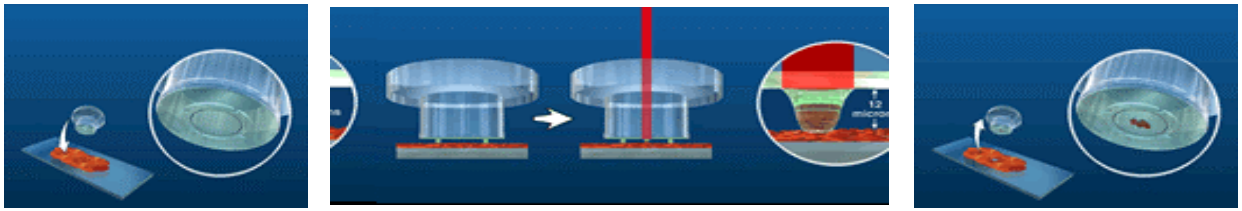


Abb. 4.4: Methode der Laser Capture Mikrodisektion (Arcturus): Das Cap wird aufgesetzt. Der Transferfilm wird durch Beschuß mit einem Infrarotlaser aktiviert und verschmilzt mit dem Gewebe. Das Cap mit angeheftetem Gewebe wird abgenommen und weiter verarbeitet.

### **Methode**

Mikrodisektion an Kryoschnitten:

- Gefiergewebestücke wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert
- Objektträger wurden vor dem Auftrag des Nierenschnittes 30min in Chloroform eingelegt oder alternativ 5h bei  $200^{\circ}\text{C}$  inkubiert (bei Protein-Extraktion 5min in Ethanol (abs.) eingelegt), getrocknet, luftdicht verpackt
- nach Anfertigung der  $8\mu\text{m}$  Kryoschnitte wurden die Schnitte auf Objektträger aufgetragen und direkt im Kryostaten eingefroren (keine Lufttrocknung)
- Objektträger mit Schnitt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagern

Färbung und Entwässerung

- Schnitte 30sec in 70% EtOH fixieren
- Schnitte 30sec in  $\text{H}_2\text{O}$  -DEPC wässern
- Schnitte 30min in Hämatoxylin färben
- Schnitte in  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC entfärben
- Schnitte je 45sec in 70%, 100% und 100% EtOH entwässern
- Schnitte 3min in Xylol entwässern
- Xylol abdampfen lassen (ca. 3min)

verwendete Einstellungen am LCM-Gerät:

Duration: 850ns; Repeat: 0,2s; Target: 0,205V; Current: 18,0mA; Spotsize:  $30\mu\text{m}$ ;  
Power: 80mW

Die Isolierung der RNA erfolgt durch den Stratagene Microprep-Kit (Kap. 4.7.1)

Die Isolierung der Proteine erfolgt nach Anleitung (Kap. 4.9.1)

---

## 4.6 DNA-Analysen

### 4.6.1 DNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

#### Plasmid DNA-Isolation aus Bakterien mittels QIAprep Spin-Kit

Die Methode der Plasmid-Isolation mittels QIAprep Spin-Kit beruht auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und nachfolgender DNA-Bindung an eine Silica-Membran unter Hochsalzkonditionen. Die Elution erfolgt mit einer Niedrigsalzlösung. Die Isolierung des Plasmides aus *E. Coli* geschah nach Angaben des Herstellers und die Überprüfung des Inserts durch Restriktionshydrolyse von 1 µl Plasmid-DNA mit den entsprechenden Enzymen.

#### DNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung

Um die Konzentration einer DNA-Lösung zu bestimmen, kann eine Messung der Absorption des Lichtes bei der Wellenlänge ihres Absorptionsmaximums (260 nm) in einem Spektralphotometer erfolgen. Um Verunreinigungen durch andere Licht absorbierende Stoffe auszuschließen, wurde stets ein Leerwert aus dem Lösungsmittel als Referenz verwendet, in das die DNA zuvor aufgenommen wurde. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der Formel:

$$1OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml doppelsträngige DNA}$$

Dann wurde der Wert bei 280nm gemessen und das Verhältniss  $OD_{260}/OD_{280}$  zur Bestimmung des Grades an eventuellen Verunreinigungen mit Phenol- oder Proteinresten errechnet. Das Verhältnis für nicht verunreinigte DNA-Präparationen sollte bei  $\cong 1,8$  liegen.

#### Quantitative Konzentrationsbestimmung durch Auftrag auf ein Agarosegel

Die Untersuchung ermöglicht die Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung durch Vergleich der Fluoreszenz-Intensität mit einem DNA-Mengenstandard (zum Beispiel  $\lambda$ /Hind III-Verdau eines  $\mu\text{g}$  DNA).

Es wurde die Bande der DNA mit den jeweils definierten Mengen der Banden des Standards verglichen (Tabelle siehe Materialteil). Die Anfärbung der DNA erfolgte dabei mit Ethidiumbromid und die Auftrennung durch eine Agarosegelelektrophorese.

### 4.6.2 Gelelektrophoresen

Es handelt sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung

von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. Das Verfahren kann sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt werden. Elektrophoresen werden meist in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid durchgeführt.

#### a.) Agarosegelelektrophorese

- Lösen der Agarose durch Aufkochen einer entsprechenden Menge in 1x TAE- oder 1x TBE-Puffer mit der Mikrowelle
- Abkühlen lassen auf ca. 60° C und Zugabe von 1µg Ethidiumbromid pro ml
- Laden der Proben mit 1/5 Volumen Ficoll Ladepuffer (5x) (25% Ficoll 70; 25mM EDTA; 0,1% Bromphenolblau) und Elektrophorese im entsprechendem Puffer, fotografieren des Gels unter UV-Licht der Wellenlänge 260nm.

#### b.) Polyacrylamidgele

Die Anwendung von Polyacrylamidgelen bietet sich unter anderem für die Fragmentanalyse an. Die Beschreibungen erfolgt in den Kapiteln: 4.4 Nachweis des Telomerase-Proteins und 4.9.3 Western-Blot-Analysen.

### 4.6.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

*In-vitro*-Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden (Mullis et al., 1987).

#### **Method:**

Zusammenfügen folgender Bestandteile.

- |   |            |
|---|------------|
| ➤ genomische DNA                            | 100ng      |
| ➤ pro Oligonukleotid (Primer)               | 0,5µM      |
| ➤ pro dNTP                                  | 0,2mM      |
| ➤ 10x PCR-Puffer (s. Materialteil)          | 5µl        |
| ➤ mit sterilem ddH <sub>2</sub> O auffüllen | auf 49,5µl |
- Reaktionsansatz 3 min bei 94°C denaturieren
  - Abzentrifugation und auf Eis stellen
  - Zugabe von 0,5µl (1,25U) Taq-Polymerase (Invitrogen)

In Tabelle 4.2 sind die Bedingungen der PCR-Reaktionen aufgeführt.

Tab. 4.2: PCR-Bedingungen für verschiedene Gene:

Gen (Primerkombination)	Fragment- größe (Bp)	Annealing Temp.(°C)	Zeiten für Denatu- rierung, Annealing und Extension (min)	Zyklen- zahl	PCR-Puffer
endogene Telomerase (RA58 / hTRT3'UTR)	541	62	1, 2, 2	30	Puffer B (Optimizer-Kit)
exogene Telomerase (RA58 / RA55)	525	51	1, 2, 2	30	Standard-P.,

*Die Bedingungen für die durchgeführten RT-PCRs sind unter Kap. 4.7.2 aufgeführt.*

## 4.7 RNA-Analysen

### 4.7.1 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

#### RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen

##### ***a.) mRNA-Isolation mittels Pharmacia Quick-Prep mRNA Purification Kit (Amersham-Pharmacia Biotech)***

Es können max. 100mg unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Gewebe oder  $10^7$  Zellen zur Extraktion von bis zu 6µg mRNA verwendet werden. Die mRNA-Isolation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde mit 10µl Glycogen und 40µl  $\text{NH}_4\text{OAc}$  in 1ml Ethanol (abs.) gefällt und das Pellet bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

##### ***b.) totalRNA-Isolation mit TRI-Reagent-LS-RNA-DNA-Protein-Isolationskit (Molecular Research Center Inc.)***

Es können max. 100mg unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Gewebe oder  $10^7$  Zellen zur Extraktion von bis zu 20µg totalRNA verwendet werden. Die RNA-Isolation wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### RNA-Isolation nach Laser-Mikrodissektion

Die RNA-Extraktion mit Guanidinisothiocyanatpuffer (GITC) wurde nur zu Beginn dieser Arbeit verwendet. Seit der StrataPrep total-RNA Microprep Kit (Stratagene) kommerziell erhältlich war, wurde nur noch dieser Kit verwendet.

##### ***a.) RNA- Extraktion mit Guanidinisothiocyanatpuffer:***

- 200µl RNA Denaturierungspuffer (GITC) und 1,6µl  $\beta$ -Mercaptoethanol in 0,5ml Röhren geben
- mehrmals invertieren, um das Gewebe vom Cap abzulösen



- 
- Lösung in ein 1,5ml Röhrchen umfüllen
  - 20µl (0,1x Vol.) 2M NaOAc, 220µl (1x Vol.) Phenol und 60µl (0,3x Vol.) Chloroform-Isoamylalkohol zugeben. Gut vortexen
  - 15min. bei 4°C zentrifugieren, wässrige Phase in neues Röhrchen überführen
  - 1-2µl Glycogen und 200µl kaltes Isopropanol hinzufügen
  - bei -80°C mind. 30min (oder ü.N.) fällen, 15min bei 4°C zentrifugieren
  - Überstand abnehmen, Pellet mit 400µl 70% Ethanol (-20°C) waschen. 5min bei 4°C zentrifugieren
  - Überstand abnehmen. restlichen Alkohol abdampfen lassen
  - Zugabe von 15µl DEPC-Wasser, 1µl 20U/µl RNase Inhibitor (RNasin), 2µl 10x DNase Puffer und 2µl U/µl DNase (20 Units total), bei 37°C 30min inkubieren
  - Zugabe von 20µl NaOAc, 220µl Phenol & 60µl Chloroform-Isoamylalkohol, 10min. bei 4°C zentrifugieren
  - obere, wässrige Phase in neues Röhrchen überführen
  - 1-2µl Glycogen und 200µl kaltes Isopropanol hinzufügen
  - bei -80°C ü.N. fällen, 15min bei 4°C zentrifugieren
  - Überstand abnehmen, mit 400µl kaltem 70% Ethanol waschen
  - 5min bei 4°C zentrifugieren, Überstand vollständig abnehmen
  - Lufttrocknen, Lagern des Pellets bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch.

**b.) RNA-Extraktion mittels StrataPrep total-RNA Microprep Kit (Stratagene):**

Zu 100µl Lysepuffer wurden 0,7µl β-Mercaptoethanol gegeben und das LCM-Cap mit Gewebeprobe aufgesetzt. Das Reaktionsgefäß wurde dann mehrfach invertiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde mit 20µl Elutionspuffer eluiert.

**RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Konzentrationsbestimmung wurde wie bei der DNA-Analyse durchgeführt. Die Berechnung erfolgte nach der Formel:  $1OD_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$ . Die optische Dichte wurde bei 280nm gemessen und das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  zur Bestimmung des Grades an eventuellen Verunreinigungen mit Phenol- oder Proteinresten berechnet. Es sollte für nicht verunreinigte RNA-Präparationen  $\cong 2,0$  betragen.

### 4.7.2 Reverse-Transkription (RT)-PCR

Die Reverse Transkriptase (RT) ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Unter Verwendung einer komplementären doppelsträngigen Startsequenz stellt die RT aus einer einzelsträngigen RNA-Matrize eine doppelsträngige Kopie (cDNA) her. Im Anschluss an die RT-Reaktion wird eine PCR (s.o.) durchgeführt.

#### **Protokoll der cDNA-Synthese:**

Für die cDNA-Synthese wurden im ersten Schritt folgende Bestandteile für das Oligonukleotid-Annealing zusammengefügt:

- RNA (1-5µg total RNA)                    x µl
- Random-Hexamere (100ng)            2,0µl
- auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O-DEPC    auf 11,0µl
- 5min bei 70°C inkubieren, dann 2min auf Eis abkühlen

Für die cDNA-Synthese wurde im zweiten Schritt folgende Bestandteile zugefügt:

- RNasin    1,0µl
- DTT (0,1M)                                    2,0µl
- dNTP (10mM)                                1,0µl
- cDNA-Synthese-Puffer (5x)            4,0µl
- RT (Superscript II, 200U/µl)        1,0µl
- 10min bei 25°C inkubieren; dann 1h bei 42°C inkubieren (Hybridisierofen)
- PCR wie unter Kapitel 4.6.3 beschrieben durchführen. Die RT-PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Tab. 4.3: RT-PCR-Bedingungen für verschiedene Gene:

Gen	Fragmentgröße (Bp)	Annealing Temp.(°C)	Zeiten für Denaturierung, Annealing und Extension (min)	Zykluszahl	PCR-Puffer
Aktin	660	58	1; 2; 2	35	Standard-P.
GapDH (Clont. Oligos)	480	65	0,25; 0,5; 2,5	25	Advantage-P. (Clont.)
WT1 Exon 6-10	453±444	55	1; 2; 2	35	Standard-P.
Synaptopodin	536	55	1, 2, 2	35	Accuprime.
Nephrin	408±388	59,5	1, 2, 2	35	Standard-P. mit 5mM MgCl <sub>2</sub>
GapDH (semi-quant. PCR)	446	61,5	1, 2, 2	30-40	Advantage-P. (Clont.)

Gen	Fragmentgröße (Bp)	Annealing Temp.(°C)	Zeiten für Denaturierung, Annealing und Extension (min)	Zykluszahl	PCR-Puffer
MMP7 (semi-quant. PCR)	393	60	1, 2, 2	40	Advantage-P. (Clont.).
Thy1 (semi-quant. PCR)	288	65	1, 2, 2	40	Advantage-P. (Clont.).
POD1 (semi-quant. PCR)	194	65	1, 2, 2	40	Advantage-P. (Clont.).

### Semiquantitative PCR- Methode

Bei der semiquantitativen PCR handelt es sich um eine RT-PCR-Methode. Es wurde zuerst eine cDNA-Synthese nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Für die cDNA-Synthese bei RT-PCR-Reaktionen wurde stets das Enzym Superscript II (Invitrogen) verwendet. Das cDNA-Gemisch wurde anschließend aufgeteilt und für bis zu sechs unabhängige PCR-Reaktionen (Kap. 4.6.3) eingesetzt. Die cDNA-Sequenzen folgender Gene wurden mit dieser Methode quantifiziert: *Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7)*, *Synaptopodin*, *Transkriptions Faktor 21 (POD1)*, *Wilms Tumor1* und *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GapDH)*.

#### Protokoll:

- cDNA-Synthese wie unter Kap. 4.7.2 beschrieben durchführen
- PCR-Ansatz wie unter Kap. 4.6.3 beschrieben durchführen
- Proben mit Loading-Buffer versetzen und mittels Agarosegel auftrennen (Kap. 4.6.2)
- quantifizieren der amplifizierten spezifischen DNA-Banden

Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4.3 aufgeführt.

Die genaue Quantifizierung erfolgte nach Auftrennung der einzelnen Reaktionsprodukte durch ein Agarosegel (Kap. 4.6.2) mittels der AIDA-Biopackage-Software nach Detektion der DNA in einem Phosphorimager. Die Quantifizierung wurde nach Anleitung des Softwareherstellers durchgeführt. Die Standardisierung erfolgte anhand des Nachweises des Housekeeping-Gens *GapDH*.

### 4.7.3 RNA-Amplifikation

Aufgrund der geringen RNA-Mengen, in mikrodisektiertem Gewebe muss stets

eine Amplifikation der gesamten mRNA erfolgen, bevor weiterführende Untersuchungen gemacht werden können. Da zu dem Zeitpunkt des Starts der Untersuchungen noch kein RNA-Amplifikationskit kommerziell erhältlich und noch keine Erfahrung im Institut vorhanden war, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene RNA-Amplifikationsmethoden neu erprobt. Aufgrund von Schwächen der T7-Amplifikations-Methode und der Poly-A<sup>+</sup>-PCR-Amplifikations-Methode und der im Oktober 2000 erfolgten Marktreife der SMART-Methode wurde diese standardmäßig durchgeführt.

### **RNA-Amplifikation mittels T7-Polymerase (Eberwine J., 1995)**

Bei der T7-Polymerase handelt es sich um eine DNA-Polymerase. Die aktive Form, ein Dimer aus einem 84kD Polymerase-Protein des T7-Phagen und dem 12kD Thioredoxin aus *E.coli*, zeichnet sich durch eine hohe Polymerisierungsaktivität (300Bp/sek.) aus, ohne von der RNA zu dissoziieren. Mit Hilfe dieses Proteins ist es unter Verwendung von Oligo-dT Primern, die die T7-Erkennungssequenz tragen, möglich, das komplette Transkriptom linear zu amplifizieren. Um eine bestmögliche Erkennung der T7-Sequenz dem T7-Enzym zu ermöglichen, wurden verschiedene T7-Oligonukleotide (Kap. 2.10) ausprobiert.

#### **Protokoll:**

cDNA-Synthese:

- Zusammenfügen von: RNA (100ng) 2µl, T7-Oligo-dT-Primer (1µg/µl) 1µl, Trehalose-Lsg (1,7M) 7µl
- 10min bei 65°C inkubieren, dann sofort auf Eis
- Zugabe von: 5x cDNA-Synthese-Puffer 4µl, DTT (0,1M) 2µl, dNTP-Mix (je 10mM) 1µl, Rnasin 1µl, Superscript II 1µl, Linear Acrylamid (0,1µg/µl) 1µl
- Folgende Schritte zur cDNA-Synthese werden durchgeführt: 37°C 5min; [45°C für 5 min, 60°C für 2 min, 55°C für 2 min] 10 Zyklen, 4°C

Zweit-Strang-Synthese:

- Zur Zweit-Strang-Synthese werden folgende Substanzen benötigt: 10x second-strand-buffer 15µl, dNTP's (je 10mM) 3µl, DNA-Polymerase I (10U/µl) 4µl, *E.coli* Rnase H (2U/µl) 1µl, *E.coli* DNA-Ligase (2U/µl) 5µl, 102µl H<sub>2</sub>O-DEPC
- Inkubation für 2h bei 16°C
- Zugabe von 4µl T4-DNA-Polymerase(1U/µl), 10 min bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 7,5µl Stop-Solution (1M NaOH, 2mM EDTA), 10min bei 65°C

---

Proteinfällung:

- Zugabe von 150µl Phenol-Chloroform-Isoamyl zum Reaktionsgemisch
- Extraktion über Phase-lock-gel-tubes (Eppendorf): obere Phase des Phe-Chl-Iso-Reaktionsgemisches in die Geltubes füllen
- 1min bei 12.000rpm zentrifugieren, Eluat mit 130µl NH<sub>4</sub>Ac (4M) versetzen
- 1ml EtOH (abs.) dazugeben, vortexen, 20min zentrifugieren (4°C)
- mit 100µl EtOH (abs.) waschen, 5min zentrifugieren (4°C)
- Ethanol sorgfältig entfernen und in 10µl H<sub>2</sub>O-DEPC aufnehmen

T7 RNA-Polymerase-Amplifikation (aRNA) (Megascript T7 Transcription):

- für die RNA-Amplifikation zusammenfügen: cDNA 16µl, 10xT7-Puffer 4µl; ATP, GTP, CTP und UTP (je 100mM) je 4µl, T7-RNA-Polymerase 4µl
- Inkubation bei 37°C für 6h
- versetzen mit 150µl Phe-Chl-Isoamyl, vortexen und in Phase-lock-gel tubes füllen, 5min zentrifugieren
- wässrige Phase auf Chroma-spin TE+30 Säulen (Clontech) geben, 5min bei 700g (3500rpm) zentrifugieren
- Durchfluß auffangen und auf 13µl lyophilisieren

erneute cDNA-Synthese:

- 10µl Filtrat versetzen mit 1µl Random hexamere (1µg/µl)
- Inkubation für 10 min bei 70°C, für 2min auf Eis, dann 10 min bei RT
- Zugabe von: 5x First Strang Buffer 6µl, DTT (0,1M) 3µl, dNTP's (10mM) 1µl, RNasin 1µl, Superscript RT II 1µl, Trehalose 9µl, 1µl lineares Acrylamid (0,1µg/µl, Ambion)
- Folgende Schritte zur cDNA-Synthese werden durchgeführt:
- 37°C für 5min; [45°C für 5 min, 60°C für 2 min, 55°C für 2 min] 10 Zyklen, 4°C
- Zugabe von 1µl RNase H, Inkubation für 20 min bei 37°C
- Inkubation für 2 min bei 95°C, anschließend sofort auf Eis
- 1µl Oligo dT Primer zugeben (1µg/µl)
- Inkubation für 5 min bei 70°C, dann 10 min bei 42°C

Zweit-Strang-Synthese: siehe oben

- anstelle der Stop-Solution-Zugabe von 10µl EDTA (0,5M), Inkubation für 10 min bei 65°C
- Protein-Fällung: siehe oben
- Aufreinigung des Nucleinsäuregemisches mittels Sephadex-G75-Säule:

- Gemisch auf Säule geben, 5min bei 700xg zentrifugieren
- in Speedvac Volumen auf ca. 10µl lyophilisieren
- Qualität und Quantität der amplifizierten RNA auf Agarose-Gel kontrollieren
- eventuell weitere Zyklen

### **RNA-Amplifikation mittels poly(A) PCR (Brady G. und Iscove N., 1993)**

Die RNA-Amplifikationsmethode nach Brady und Iscove benutzt die PCR zur Amplifikation des Transkriptoms. Ein Oligo-dT-Primer bindet an den poly-A-Schwanz der mRNA und initiiert die cDNA-Synthese. Das Enzym Terminale-Desoxyribonukleotid-Transferase (TRT) hängt einen poly-A-Schwanz an die cDNA, spezifische Oligonukleotide binden während der PCR-Methode und ermöglichen so die Amplifikation. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem niedrigen Preis, kombiniert mit geringem Aufwand. Der Nachteil liegt in den relativ kurzen cDNAs, die gebildet und amplifiziert werden und in der stets von neuem nötigen Optimierung der Reaktion.

#### **Protokoll:**

cDNA-Synthese:

- 1µl mRNA (50ng/µl, oder 1µg total RNA) versetzen mit Erstrang/Lysis-Puffer 96µl, Anti-RNase (Ambion) 1µl, RNasin (Promega) 1µl, cDNA-Primer-Mix (je 25µl dNTP's) 2µl, dT(24)-X-Oligo (22,2 OD/ml) 72µl und dH<sub>2</sub>O 28µl
- 1min bei 65°C erwärmen, dann 3min bei RT, anschließend auf Eis stellen
- Zugabe von 5µl Reverse Transkriptase (Superscript II)
- Inkubation für 5, 10 und 15min bei 37°C (Optimierung: Produkte sollten zwischen 100 und 700 Bp Länge erreichen)
- Inkubation für 10min bei 65°C, dann 2min auf Eis

Tailing-Reaktion:

- Zugabe von 100µl 2x Tailing Buffer und 3µl terminale-desoxyribonukleotid Transferase (45U)
- Inkubation bei 37°C für 15min, dann für 10min bei 65°C

PCR:

- 4µl der cDNA versetzen mit: 10x PCR-Puffer (Optimierung: 15-50mM MgCl<sub>2</sub> in 5mM Abständen) 2µl, dNTPs (100mM) 1,5µl, dT-X-Oligo (Optimierung: 1, 2 und 4 OD/ml); 0,7µl Taq-Polymerase auffüllen mit dH<sub>2</sub>O auf 20µl
- die Reaktionsansätze mit Mineralöl überschichten

- nach folgendem Programm amplifizieren:
- [1min bei 94°C, 2min bei 42°C, 6min bei 72°C] 25 Zyklen
- [1min bei 94°C, 1min bei 42°C, 2min bei 72°C] 25 Zyklen
- Kontrolle der PCR-Produkte auf Agarosegel (4.6.2)

### RNA-Amplifikation mittels SMART-Methode (Clontech)

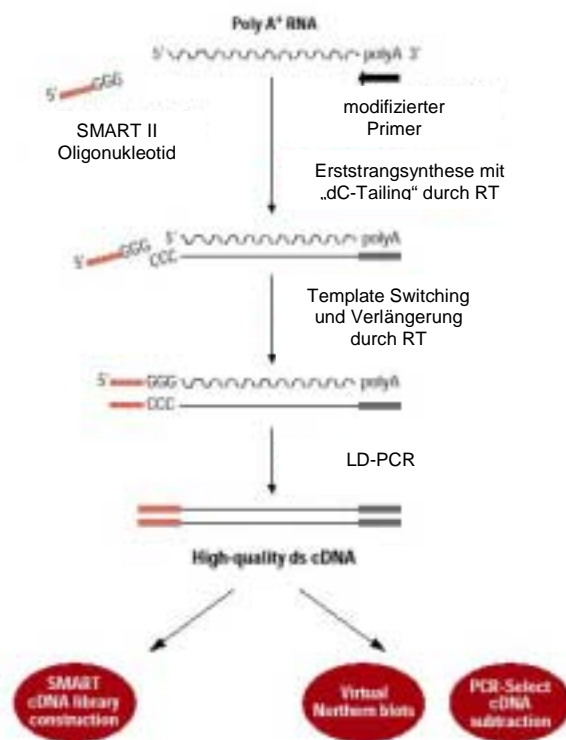


Abb. 4.5: Schematischer Ablauf der SMART-Methode (Switched Mechanism at 5' end of RNA Template)

darauffolgenden LD (long distance)-PCR dienen diese Sequenzen als Primerbindungsstellen. Dadurch kommt es zu einer starken Anreicherung an „full-length“-Fragmenten (Abb. 4.5). Vorteile dieser Methode sind, dass aus wenigen Nanogramm RNA bis zu 10µg Produkt amplifiziert werden können. Hinzu kommt die große Zuverlässigkeit der Methode.

#### **Method:**

##### cDNA-Synthese:

- Zusammenfügen von RNA-Probe (0,025-1µg Poly A<sup>+</sup>- oder 0,05-1µg total-RNA) 1-3µl, cDNA-Synthese (CDS)-Primer (10 µM) 1µl, SMART II-Oligonukleotide (10 µM) 1µl, auffüllen mit dH<sub>2</sub>O-DEPC auf 5µl

- 
- 2 min im Cyclor bei 70 °C inkubieren, anschließend bei RT lassen
  - folgende Reagentien hinzufügen: 5x First Strand Buffer 2µl, DTT (20mM) 1µl, dNTP (10 mM) 1µl, Superscript II 1µl
  - bei 42°C 1h im Wärmeschrank inkubieren, 40µl TE Puffer dazugeben
  - 7min bei 72°C im Cyclor inkubieren.

cDNA-Amplifikation mittels LD-PCR:

- Zur Optimierung der PCR jeweils drei Ansätze herstellen, zusammenfügen folgender Reagentien: cDNA 10µl, dH<sub>2</sub>O 74µl, 10x Advantage-Polymerase-P. 10µl, dNTP (10mM) 2µl, LD-PCR-Primer (10µM) 2µl, Advantage-Polymerase 2µl

Programm: 95°C, 1min; [95°C, 15sec; 65°C, 30sec; 68°C, 6min] 15-24 Zyklen

- alle PCR-Ansätze zunächst 15 Zyklen durchlaufen lassen
- zwei Ansätze aus Cyclor entfernen und auf Eis aufbewahren
- nach 15, 18, 21 und 24 Zyklen je 10µl aus dem Reaktionsgefäß entnehmen, gemeinsam auf Agarosegel auftragen und optimale Zyklenzahl bestimmen
- mit den zwei nach 15 Zyklen entnommenen Reaktionsgefäßen die PCR-Reaktionen bis zur optimalen Zyklenzahl weiterführen
- 5µl der Proben auf einem 1,2%iges Agarosegel kontrollieren
- zum Stop der Reaktion 2µl EDTA hinzufügen
- bei -20°C lagern

## 4.8 Erstellung von Expressionsprofilen

Es wurden Expressionsprofile von a) kompletten Glomeruli (mittels LCM, Kap. 4.5) und b) Podozyten aus Zellkultur mit Hilfe von cDNA-Arrays erstellt.

Zuerst wurden mit Hilfe der LCM-Methode (Kap. 4.5) Glomeruli aus gefrorenem Nierengewebe isoliert. Die RNA von gesunden und erkrankten Glomeruli wurde extrahiert (Kap. 4.7.1) und über die SMART-Technologie amplifiziert (Kap. 4.7.3).

Die PCR-Produkte wurde anschließend radioaktiv markiert und auf cDNA-Arrays hybridisiert. Die Arrays bestehen in der Regel aus Nylonmembranen, auf die genau charakterisierte Sonden (Oligonukleotide oder PCR-Produkte) gespottet sind. Bei den Sonden handelt es sich um DNA-Nukleotidsequenzen, die für jedes Gen eindeutig sein sollten.

Um die Auswirkungen von möglichen Einmaleffekten, die nicht methodisch bedingt sind, möglichst gering zu halten, wurden folgende Vorkehrungen getroffen:



- Poolen vier unabhängiger cDNA-Synthese-Ansätze, die aus derselben mRNA-Extraktion erstellt wurden, für die SMART-LD-PCR
- Poolen drei unabhängiger SMART-LD-PCR-Ansätze, die aus dem gepoolten cDNA-Synthese-Ansatz erstellt wurden, vor der radioaktiven Markierung.

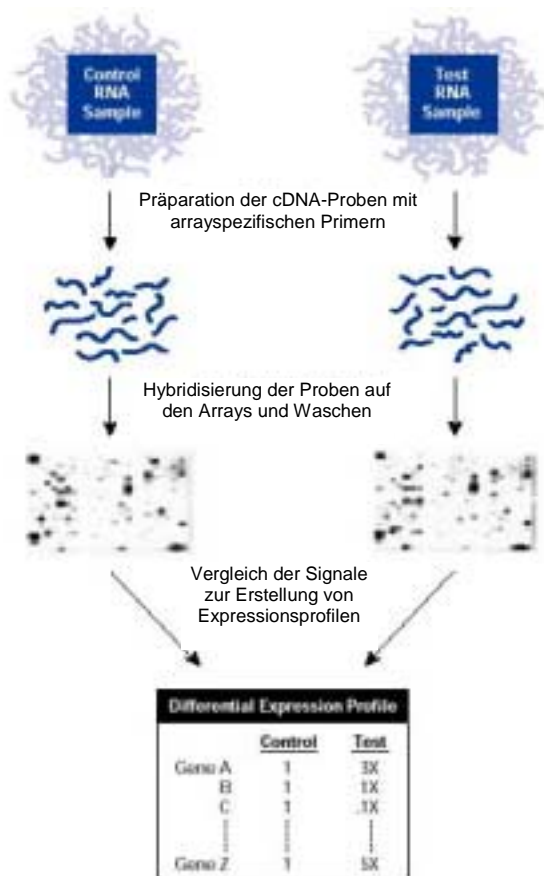
Beide Maßnahmen sollten bewirken, dass die erstellten Expressionsprofile gut miteinander vergleichbar sind und die berechneten Standardabweichungen zwischen gleichen Proben verringert werden.

Bei jedem Gefrier-Gewebe wurden zusätzlich mindestens zwei unterschiedliche RNA-Extrakte aus den Glomeruli hergestellt und daraus unabhängige Expressionsanalysen durchgeführt.

#### 4.8.1 Hybridisierung von cDNA auf Macro- und Microarrays

##### Atlas 3.6 human cDNA Expression Arrays (Clontech)

Bei dem Atlas 3.6 Array-Kit handelt es sich um drei Macro-Nylonarrays (je 8x12cm) mit je 1188 einfach gespotteten cDNAs bekannter Gene. Für die



Hybridisierung können die Produkte aus der SMART-RNA-Amplifikation verwendet werden. Das Schema der Methode ist in Abb. 4.6 dargestellt. Besonders vorteilhaft an den Nylon-Arrays ist, dass sie sich bis zu 15-mal bei nahezu gleichbleibender Qualität stripfen und wieder hybridisieren lassen. Dies ermöglicht es für verschiedene aufeinanderfolgende Experimente immer wieder die selben Membranen zu verwenden.

Abb. 4.6: Schematische Darstellung der Erstellung von Expressionsprofilen unter Verwendung von Atlas Arrays (Clontech)

**Protokoll der Array Hybridisierung:**

Die Aufreinigung der LD-PCR-Produkte erfolgte mittels Nucleospin Columns (Clontech). Die Markierung der SMART-Proben und Hybridisierung der Filter erfolgten nach Protokollen des Herstellers für den Probe-Amplification-Kit (Clontech). Statt der Klenow-Polymerase von Clontech wurde das Klenow-Enzym der Fa. Amersham mit beiliegendem 10x Puffer verwendet. Die Waschprozedur der Filter wurde wie folgt verändert:

- Im Anschluss an die Hybridisierung die Filter in eine Schale geben und für 30min in Waschlösung 1 inkubieren, den Vorgang wiederholen
- einen zusätzlichen Waschschrift für 10min mit Waschlösung 2 durchführen
- Zur Entfernung der radioaktiv markierten Proben wurden die Membranen 5min bei 95°C im Wasserbad mit 0,5% SDS inkubiert.

Die Exposition der Filter erfolgte auf Imaging Plates der Firma Fuji. Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels eines Fuji Phosphorimagers und der AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware der Firma Raytest (Kap. 4.8.2).

**Atlas Plastic Human 8K Microarray (Clontech)**

Der Atlas Plastic-Array besteht aus einer flexiblen Plastikmembran (8x12cm), auf die 8.327 unterschiedliche durchschnittlich 80Bp lange Oligonukleotide doppelt gespottet sind. Die Aufreinigung der LD-PCR-Produkte sowie die Markierung und die Hybridisierung erfolgten nach Angaben des Herstellers (Clontech). Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels eines Phosphorimagers (Fuji) und der AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware der Firma Raytest (Kap. 4.8.2).

**Human Unigene Set RZPD1 (RZPD)**

Bei dem Human Unigene Set RZPD1 handelt es sich um zwei Nylon-Membranen mit einer Größe von je 22x22cm. Aufgrund der extrem hohen Dichte von knapp 18.000 Spots auf jeder Membran zählen diese Filter zu den Micro-Arrays. Diese Filter wurden wie die Plastik-Arrays im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Erstellung von Expressionsanalysen verwendet, da große Zweifel hinsichtlich der Qualität der verwendeten PCR-Produkte vom DKFZ in Heidelberg (Hersteller) nicht ausgeräumt werden konnten.

Die Hybridisierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Um die unspezifischen Signale zu reduzieren, wurde zusätzlich je einmal mit 7,5µg Oligo

dT<sub>24</sub> und Oligo dA<sub>24</sub> in Hybridisierlösung gelöst für 30min präinkubiert.

Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels eines Fuji Phosphorimagers und der AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware der Firma Raytest (Kap. 4.8.2).

#### **4.8.2 Auswertung der Expressionsanalysen**

Die benutzten Macro- und Micro-Nylonarrays wurden nach der Waschprozedur zwischen zwei Whatmanpapieren kurz getrocknet, in Frischhaltefolie faltenfrei eingepackt und auf Imaging-Platten gelegt. Die Plastikfilter wurden an der Luft getrocknet. Die Imaging-Platten haben gegenüber Röntgenfilmen den Vorteil, dass sie radioaktive Signale verschiedener Intensitäten gleichmäßiger detektieren können und die gemessenen Signale sich digital quantifizieren lassen. Der Nachweis der Radioaktivitätssignale erfolgte über einen Phosphorimager. Die erhaltenen Messwerte gaben Auskunft über die vorhandene Radioaktivitätsmenge eines Spots. Um möglichst einheitliche Bedingungen zu haben, wurde darauf geachtet, die radioaktiven Signalintensitäten durch verschieden lange Expositionszeiten auszugleichen. Sehr lange Expositionszeiten wurden zum Teil in einer Bleibox ausgeführt, da durch die Bleibox die unspezifische Hintergrundstrahlung z.B. aus Beton und dem Kosmos um den Faktor fünf reduziert wird (persönliche Auskunft Dr. Quack, Fa. Raytest).

Die Originaldateien wurden am Phosphorimager auf CD gebrannt und später über die AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware (Version 3.1) der Fa. Raytest ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Folgende variable Einstellungen wurden verwendet: Der Hintergrund wurde über die Einstellung „local dot ring“ mit den Werten für ring=1 und dot=3 ermittelt und von den spezifischen Signalen abgezogen. Die Normalisierung der Expressionswerte erfolgte für jeden Filter einzeln, dazu wurden die gemessenen Werte absteigend sortiert. Die Spots, deren Intensitäten zu den stärksten zehn Prozent gehörten, wurden gemittelt und als 100% gesetzt.

Der Vergleich der Expressionsprofile wurde mittels Excel-Software (Fa. Microsoft) durchgeführt.

#### **4.8.3 Statistik**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde anhand des Student's T-Test (Ramm et al., 1987) und der Clusteranalyse durchgeführt (Eisen et al., 1998).

---

### **Reliabilitätstest (Stöber, 1995; Hampson et al, 1991)**

Die statistische Auswertung des Vergleichs der Expressionsprofile, die

- mittels Amplifikation der RNA über die SMART-Methode und
- ohne Amplifikation der RNA erstellt wurden,

erfolgte anhand des Reliabilitätstests. Der Reliabilitätstest ermittelt die Zuverlässigkeit einer Methode durch Messung der systematischen Verzerrungen, die bei der zu überprüfenden Methode im Vergleich zur ursprünglichen Methode auftreten.

Für die Berechnung der Zuverlässigkeit der SMART-Methode wurde wie folgt vorgegangen: Von zwei unterschiedlichen Zellkultur-Podozytenlinien wurde die mRNA isoliert und von jeder Probe Expressionsprofile mit und ohne SMART-Amplifikation erstellt. Anschließend wurde die differentielle Expression der Gene, die mit der SMART-Amplifikation analysiert wurden, ermittelt. Genauso wurde die differentielle Expression der Gene, die ohne Amplifikation analysiert wurden, ermittelt. Zur Berechnung der Reliabilität wurden dann von den gemessenen differentiellen Expressionen die Varianzen berechnet. Aus den Verhältnissen der Varianzen beider Methoden wurde die Zuverlässigkeit ( $\rho$ ) der Methode ermittelt.

## **4.9 Protein-Analysen**

Die verwendete Western-Blot-Analyse ist eine immunologische Messmethode. Die Untersuchung ermöglicht es, die Proteinexpression verschiedener Proben direkt nebeneinander abzuschätzen. Wichtig ist, ungefähr gleiche Mengen an Protein aufzutragen. Die Normalisierung erfolgte mittels des immunologischen Nachweises des  $\alpha$ -Tubulin-Proteins.

### **4.9.1 Protein-Extraktion**

#### **Protein-Extraktion nach der Lasermikrodissektion**

##### ***Protokoll:***

- 30min mikrodissektieren
- Cap auf 0,5ml Reaktionsgefäß mit 50,5 $\mu$ l Lyse-Puffer (50 $\mu$ l RIPA-Puffer + 0,5 $\mu$ l PMSF) setzen, während der 30-minütigen Inkubation mehrmals invertieren
- in der Zwischenzeit nächstes Cap mikrodissektieren, Reaktionsgefäß mit vorherigem Cap zentrifugieren und neues Cap aufsetzen, weiter verfahren wie

oben beschrieben

Lagerung des Proteinextraktes bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Die Protein-Extraktion aus Zellkultur**

#### ***Protokoll:***

- Zellen mit sterilem PBS dreimal gründlich waschen
- Zellen abtrypsinieren und in PBS aufnehmen
- Zellen für 5min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 300g abzentrifugieren
- Zellen erneut mit PBS waschen und zentrifugieren
- Zellen in 0,5ml Reaktionsgefäß mit 50,5 $\mu\text{l}$  Lyse-Puffer pro  $5 \times 10^6$  Zellen (50 $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer + 0,5 $\mu\text{l}$  PMSF) geben, während der 30-minütigen Inkubation mehrmals invertieren
- Lagerung des Proteinextraktes bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.9.2 Bestimmung des Proteingehaltes (Bio-Rad)**

- Erstellung einer Verdünnungsreihe mit einem Standard (1, 2, 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ )
- Vermischen von 0,8ml Standard oder Proteinprobe im Reaktionsgefäß mit 0,2ml Dye Reagent Concentrate
- Vortexen, 5min bei RT inkubieren
- Messung der optischen Dichte der Standards bei 595nm in Photometer
- Erstellung einer Eichkurve mittels Excel-Software (Fa. Microsoft)
- Messung der Proben bei 595nm
- rechnerische Bestimmung des Proteingehaltes

#### **4.9.3 Western-Blot-Analyse**

Bei der Western-Blot-Analyse handelt es sich um eine 1D-PAA-Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht. Anschließend werden mittels Blotting-Technik die Proteine auf eine Membran z.B. Nitrocellulose transferiert und immobilisiert. Anhand eines immunologischen Nachweises mittels spezifischer Antikörper wird das zu untersuchende Protein nachgewiesen und quantifiziert. Der Antikörpernachweis erfolgte durch den hochempfindlichen Supersignal-West Femto Kit (Pierce). Der Kit soll den Nachweis von nur wenigen femtogram ( $10^{-15}$ ) bzw. zeptomol ( $10^{-20}$ ) Protein ermöglichen.

---

**Methode**

Herstellung des PAA-Gels:

- SDS-Trenngel (10%): AA/Bis-AA (29:1, 40%) 10ml; Trenngel-Puffer (pH 8.8) 5,0ml, SDS (10%) 0,4ml, APS (10%) 0,3ml, dH<sub>2</sub>O 24,3ml
- entgasen, Zugabe von TEMED 15µl
- die PAA-Lösung vorsichtig in die abgedichtete Gelapparatur einfüllen, dann mit Isopropanol überschichten, PAA auspolymerisieren lassen
- SDS-Sammelgel (3,75%): AA/Bis-AA (29:1, 40%) 1,9ml, Trenngel-Puffer (pH 6.8) 5,0ml, SDS (10%) 0,2ml, APS (10%), 0,15ml, dH<sub>2</sub>O 12,75ml
- Zugabe von TEMED 15µl
- die PAA-Lsg. einfüllen, PAA auspolymerisieren lassen

Elektrophorese:

- PAA-Gel in Apparatur einspannen und Laufpuffer einfüllen
- Proteinlösungen mit 5x Lade-Puffer versetzen (Endkonzentration 1x) und 10min im Wasserbad kochen
- abzentrifugieren und direkt in die Slots des Gels auftragen
- Lauf starten mit 60V, bis die Proben eingelaufen sind; solange sich die Proben im Sammelgel befinden 100V Spannung anlegen; wenn die Proben im Trenngel sind, die Spannung auf 180V erhöhen

Blotten: die Blotapparatur in Transfer-Lösung wie folgt zusammenbauen:

- ⊖ 3 Lagen Whatmanpapier – Trenngel – Nitrocellulose (0,45µm) – 3 Lagen Whatmanpapier ⊕
- die Luftblasen rausstreichen, und die Transferlösung in die Blotkammer einfüllen, unter Rühren (Rührfisch) Ü/N bei 4°C und 150mA blotten

Antikörpernachweis (alle Schritte bei RT):

- Blot 1h blockieren mit PBS-T (0,1% Tween 20) + 5% Milchpulver
- Blot 10min waschen mit PBS-T
- Blot mit Primärantikörper (verdünnt in PBS-T + 0,5% Magermilchpulver) 1h inkubieren
- Blot 2x kurz, 1x15min, 2x5min in PBS-T waschen
- Blot mit Sekundärantikörper (verdünnt in PBS-T + 0,5% Magermilchpulver) 1h inkubieren
- Blot 25min waschen in PBS-T

- 5min in frischer Detektionslösung 1:1 (aus Luminol/Enhancer Solution und Stable Peroxide Solution) inkubieren (SuperSignal West Femto-Kit, Fa.Pierce)
- Chemolumineszenz mittels Röntgenfilm oder Imager detektieren, Blot nicht austrocknen lassen
- Antikörper von Blot stripfen durch 30minütige Inkubation im Schüttelbad bei 50°C mit Western-Blot-Strip-Puffer, anschließend zweimal 10min mit PBS-T bei Raumtemperatur waschen
- Nachweis mit anderem Antikörper wiederholen

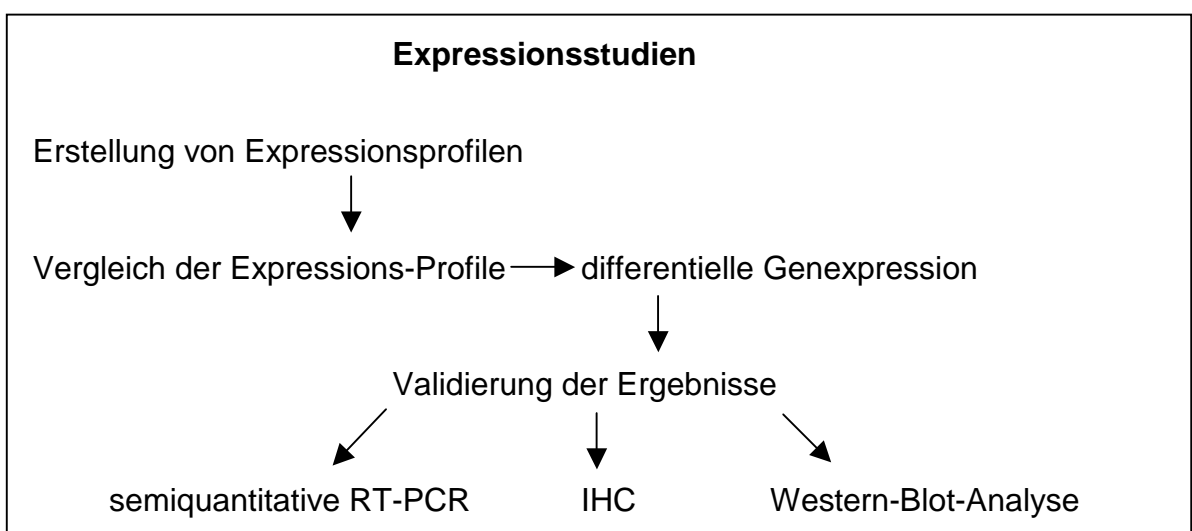
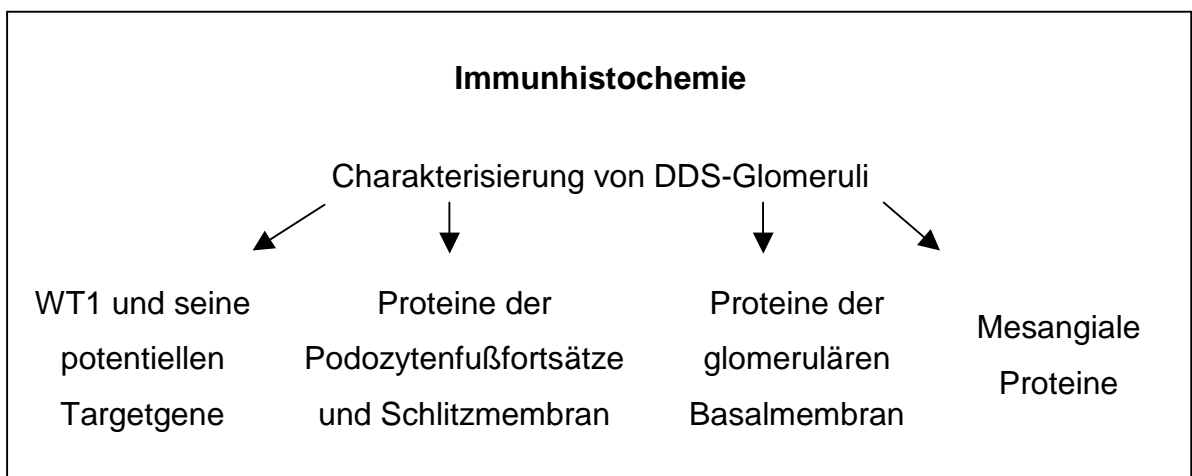
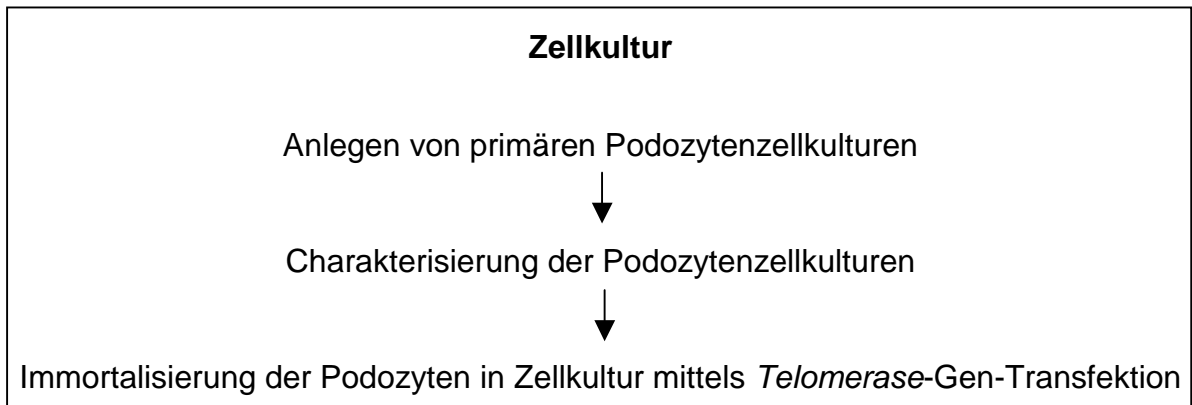
Die benutzten Antikörper wurden mit den in Tab. 4.4 aufgeführten Konzentrationen verwendet:

Tab. 4.4: Benutzte Antikörper bei der Western-Blot-Methode

<b>Primärantikörper</b>	WT1 (C-19)	WT1 (N-180)	$\alpha$ -Tubulin
<b>Konzentration</b>	1:10.000	1:10.000	1:5.000
<b>Sekundärantikörper</b>	Anti-Rabbit	Anti-Rabbit	Anti-Mouse
<b>Konzentration</b>	1:7.500	1:7.500	1:5.000

## 5 Ergebnisse

Der Ergebnisteil gliedert sich entsprechend der durchgeführten Untersuchungen in drei Teile:





## 5.1 Podozyten in Zellkultur

---

Wichtigster Grund für das Anlegen primärer Podozyten-Kulturen ist es, möglichst reine Kulturen ohne, oder nur mit geringer Durchmischung mit anderen Zelltypen der Nieren zu haben wie z.B.: Mesangiumzellen, Endothelzellen und Parietalzellen.

Um ein spezifisches Expressionsprofil von DDS-Podozyten zu erstellen - nur die exprimieren das mutierte WT1-Protein in der Niere - ist es wichtig, ausschließlich die mRNA und Protein-Expression von Podozyten zu untersuchen, da eine Durchmischung mit der RNA bzw. den Proteinen anderer Zellen die Ergebnisse verfälscht. Um diese Verfälschungen der Expressionsprofile, die aus kompletten Glomeruli erstellt wurden, nachweisen zu können, wurden die Expressionsprofile von DDS-Podozyten in Kultur mit denen der lasermikrodissektierten Glomeruli verglichen.

Ein zweiter wichtiger Grund für das Anlegen von Podozytenkulturen ist, dass Nierenmaterial von DDS-Patienten aufgrund des seltenen Auftretens der Erkrankung kaum für Untersuchungen zur Verfügung steht. Durchschnittlich einmal pro Jahr tritt in Deutschland diese Erkrankung auf. Normalerweise haben die Podozyten in Zellkultur nur eine recht kurze Lebenszeit. Die Erfahrungen zeigen, dass bei humanen Podozyten circa 30 Passagen möglich sind, bevor die Zellen senescent werden und keine weitere Proliferation stattfindet. Aus diesem Grund sollte die Immortalisierung der Podozyten durch Transfektion mit dem *Telomerase*-Gen erfolgen.

### 5.1.1 Isolierung von Glomeruli und Kultivierung von Podozyten

Für das Anlegen primärer Podozytenkulturen ist es wichtig, sehr frisches Nierencortexgewebe zu benutzen, da die Podozyten sehr empfindlich sind. Das Cortexgewebe wurde deshalb direkt im Operationssaal abgeholt, in Podozyten-Wachstumsmedium gelegt und auf Eis zu Prof. H. Pavenstädt an die Universitäts-Klinik Freiburg gebracht, der sich ausgezeichnet mit der Kultivierung von humanen Podozyten auskennt. Auch waren alle nötigen Spezialgeräte dort vorhanden.

Freundlicherweise hat mich Prof. H. Pavenstädt in das Anlegen primärer Podozytenkulturen eingewiesen.

Zwei primäre Podozytenkulturen wurden aus je ca. 2cm<sup>2</sup> großen Stücken des Cortex von nephrektomierten Nieren der Patienten DDS1 und DDS2 angelegt. Dazu wurden die Gewebestückchen mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend durch drei feinmaschige Siebe gedrückt (120, 70 und 30µm). Währenddessen wurde das Gewebe ständig mit Medium feucht gehalten und durch die Siebe gespült. Die Glomeruli-Fraktion des 30µm Siebes wurde für die Anlage der primären Kulturen verwendet.

Aus den isolierten Glomeruli wuchsen nach ca. sieben Tagen in Kultur Podozyten aus. Es ist in der Literatur (Mundel P. & Kriz W., 1995) beschrieben, dass Podozyten in Zellkultur zwei verschiedene Formen ausbilden können :

- die kopfsteinpflasterähnliche, polygonale Form und
- die verzweigte Form, die eine baumartige Struktur aufweist. Es wird vermutet, dass es sich bei den Podozyten mit der verzweigten Struktur um stärker ausdifferenzierte Zellen handelt. Für die Ausdifferenzierung scheint das WT1-Protein nötig zu sein.

Die Podozyten der primären Kulturen DDS1 wiesen zunächst die polygonale Form auf, mit zunehmendem Alter bekamen die Zellen jedoch immer stärker den verzweigten Charakter (Abb. 5.1). Die Podozyten DDS2 in Kultur wiesen direkt zu Beginn bereits die verzweigte Form auf.

Es zeigte sich, dass die beiden erstellten Podozytenkulturen unterschiedlich schnell wuchsen. Die kultivierten Podozyten des Patienten DDS1 waren sehr proliferationsfreudig; alle drei Tage verdoppelte sich ihre Zellzahl. Die Zellen des Patienten DDS2 proliferierten hingegen in Kultur nur relativ schwach; ihre Zellzahl nahm alle sieben Tage um ca. 50% zu. Für weitere Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich die kultivierten Podozyten des Patienten DDS1 verwendet.

Die primären Podozytenkulturen NAK11 und NAK12 von gesunden, erwachsenen Personen, die freundlicherweise von Prof. H. Pavenstädt zur Verfügung gestellt wurden, zeigten auch die verzweigte Form, die Podozyten in Zellkultur

auszeichnen (Abb. 5.1). Die kultivierten Podozyten des Spenders NAK11 proliferierten rasch; ihre Zellzahl verdoppelte sich alle zwei bis drei Tage. Die Podozyten des Spenders NAK12 hingegen steigerten in Kultur ihre Zellzahl ähnlich wie die DDS-Podozyten DDS2 nur alle sieben Tage um ca. 50%. Für weitere Untersuchungen wurden deshalb ausschließlich die Podozyten des Patienten NAK11 verwendet.

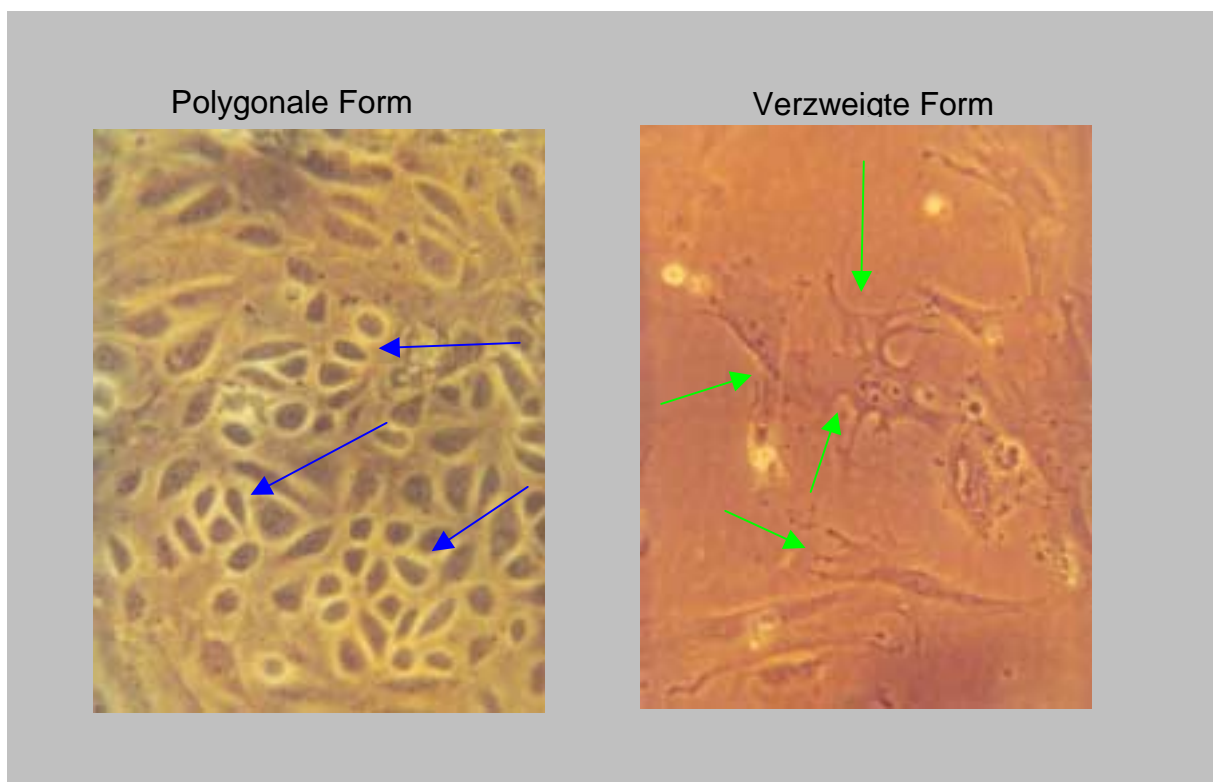


Abb. 5.1: Dargestellt sind Podozyten in Zellkultur, links NAK11 (32-fache Vergrößerung), rechts DDS2 (20-fache Vergrößerung). Mit blauen Pfeilen markiert sind Podozyten, die die typische Kopfsteinpflaster-Form aufweisen. Podozyten in der ausgeprägt verzweigten Form sind rechts dargestellt (grüne Pfeile).

### 5.1.2 Charakterisierung von Podozyten in Zellkultur

Die Charakterisierung der Podozyten hatte zum Ziel, eindeutig zu klären, ob es sich bei den Zellen, die in Zellkultur vorlagen, auch tatsächlich um Podozyten und nicht um andere im Glomerulus vorkommende Zelltypen handelt.

Anhand von podozytenspezifischen Markern erfolgte deshalb die genaue Einordnung der Zellen. Podozytenspezifische Marker sind Proteine, deren Expression in der Literatur nur Podozyten zugeordnet ist und nicht bei anderen

Nierenzellen detektiert wurde. Die Podozytenmarker wurden mittels Immunfluoreszenz und PCR untersucht.

Die Immunfluoreszenz (IF)-Methode wurde für die Podozyten in Zellkultur verwendet, da sie kaum oder nur geringe unspezifische Randeefekte aufweist, wie sie bei der LSAB-Methode, die normalerweise für die Immunhistochemie (IHC) bei Paraffin- und Kryoschnitten verwendet wurde, häufig beobachtet wird. Dies sollte bei den Podozyten in Zellkultur vermieden werden, da diese nur teilweise in Gruppen konzentriert waren (Abb. 5.1). Für die Fixierung der Zellen wurde eine Mischung aus 2% Paraformaldehyd und 4% Saccharose in PBS verwendet. Andere Fixierungen z.B. mit Aceton, Methanol, oder Formalin führten zu Ergebnissen, die entweder offensichtlich falsch waren oder überhaupt keine Signale zeigten. Als Sekundärantikörper wurden FITC-konjugierte (Fluorescein Isothiocyanat) Antikörper benutzt, die im Fluoreszenz-Mikroskop detektiert und fotografiert werden konnten.

### **Nachweis von Podozytenmarkern mittels Immunfluoreszenz**

Mittels Immunfluoreszenz wurde die Expression der Proteine Talin, Vinculin, Vimentin, (Smoyer W.E. & Mundel P., 2001; Nagata M. & Watanabe, T., 1997), Nephrin (Holthöfer et al., 1999; Holzman et al., 1999) und WT1 (Palmer et al., 2001) untersucht, die in Ihrer Gesamtheit nur bei Podozyten vorkommen.

**Talin** ist Bestandteil des kontraktiven Apparates der Fußfortsätze (Abb. 1.6) und besitzt Bindungsstellen für Aktin, Paxillin, Interleukin-Kinase und Integrin  $\alpha 3\beta 1$ .

**Vinculin** ist auch Bestandteil des kontraktiven Apparates und kann an Aktin und Paxillin binden (Abb. 1.6).

**Vimentin** ist ein Intermediärfilamentprotein, das vor allem im Zellkörper der Podozyten vorkommt. Podozyten exprimieren ebenso wie Nieren-Stammzellen und uninduziertes Mesenchym Vimentin aufgrund ihrer mesenchymalen Herkunft.

**Nephrin** ist der Hauptbestandteil der Schlitzmembran, die von den Podozyten zwischen den Fußfortsätzen gebildet wird (Abb. 1.6). Mutationen im *Nephrin* (NPHS1) verursachen das congenitale nephrotische Syndrom vom finnischen-Typ (CNF).

**WT1** ist ein kernlokalisiertes Protein, das als Transkriptionsfaktor in vollständig ausgebildeten Nieren nur von Podozyten während der Entwicklung, aber auch von uninduziertem und induziertem Mesenchym sowie von Podozytenvorläuferzellen exprimiert wird.

In der Abb. 5.2 sind die Ergebnisse der IF dargestellt. Beide Podozytenkulturen DDS1 und NAK11 exprimierten die Podozytenmarker Talin, Vinculin, WT1, Vimentin und Nephrin. Es ist zu erkennen, dass Talin und Vinculin verstärkt in den zytoplasmatischen Bereichen der Podozyten lokalisiert ist, dort, wo sich auch die Fußfortsätze ausbilden würden. Das Intermediärfilamentprotein Vimentin ist bei beiden Podozytenzellkulturen stark im Zytoplasma nachzuweisen. Das WT1-Protein ist vor allem in den Kernen der Podozyten zu detektieren. Der Nephrin-Nachweis zeigt, dass Nephrin nicht nur in den Bereichen der Plasmamembran lokalisiert ist, sondern dass es auch eine Form gibt, die im Zellkern lokalisiert ist (mündliche Information H. Holthöfer 2001, Saalem et al., 2002).

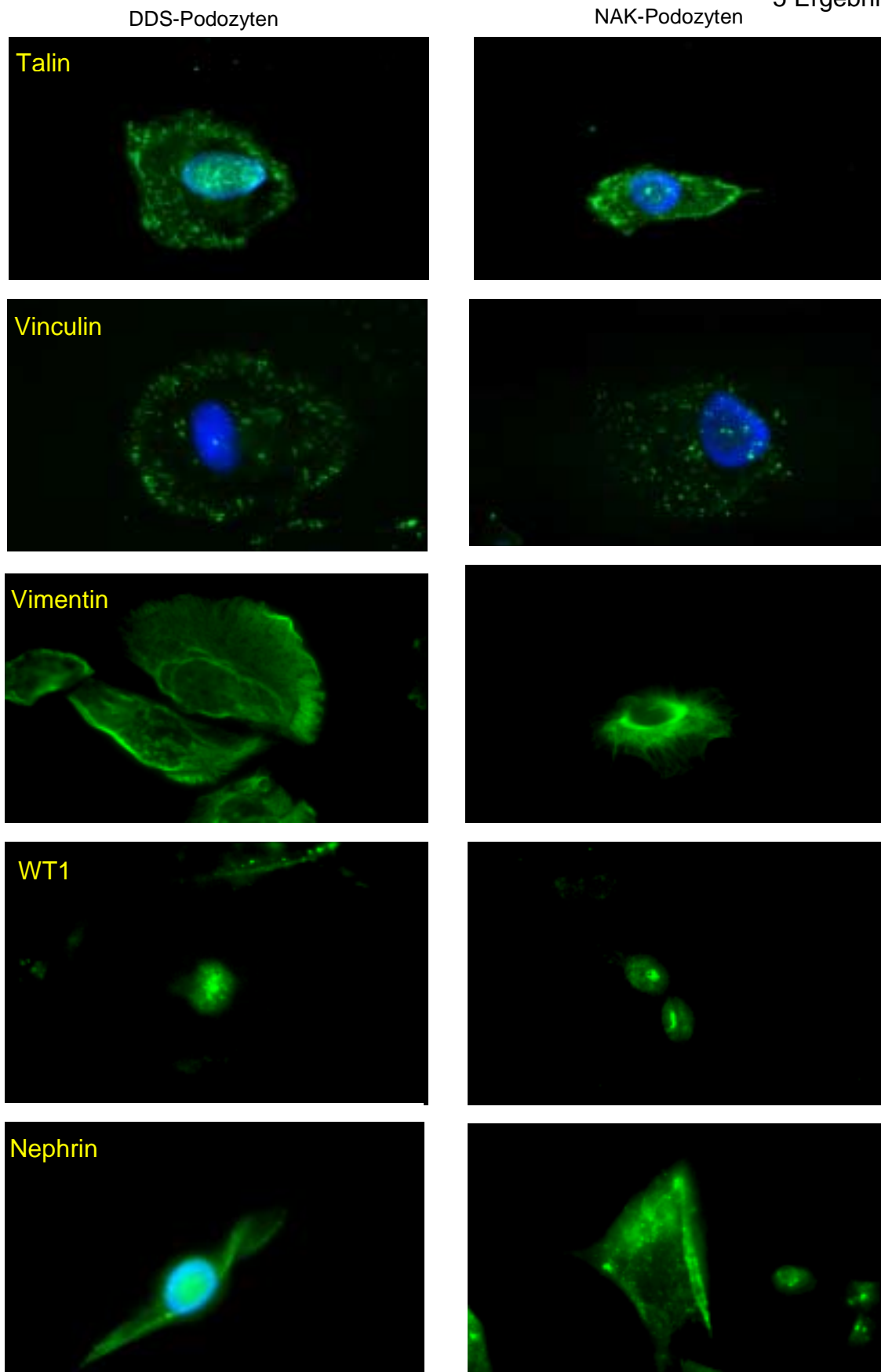


Abb. 5.2: IF-Aufnahmen von DDS- und NAK-Zellen in Kultur. Erstellt mit 400-facher Vergrößerung am Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop mit CCD-Kamera. Mittels FITC (grüne Färbung) wurden die spezifischen Antikörper detektiert. Die DAPI-Färbung (blau) zur Detektion der Zellkerne wurde bei allen Analysen von Talin, Vinculin sowie Nephrin (nur DDS-Podozyten) durchgeführt.

---

## Überprüfung von Podozytenmarkern mittels RT-PCR

Um auszuschließen, dass es sich bei den gezeigten Bildern um Artefakte der Immunfluoreszenz-Methode handelte, wurden einige Podozytenmarker auch mittels RT-PCR untersucht. Um Kontaminationen durch DNA auszuschließen, wurden die Primer über ein Exon hinweggelegt, so dass bei PCR-Produkten, die auf DNA beruhen, es zu größeren PCR-Produkten gekommen wäre. Die **Nephrin-** und **Synaptopodin-**RT-PCR-Reaktionen mussten zuvor optimiert werden. Für die *Nephrin-* und *Synaptopodin-*PCR-Reaktionen erwiesen sich die PCR-Bedingungen als optimal: 94°C für 3min [94°C 1min; 65°C 2min; 72°C 2min] 40Zyklen, 72°C für 5min. Es wurde für beide Analysen die Accurase-Polymerase von Invitrogen verwendet; das Accuprime-Protein bindet an Fehlhybridisierungen der Oligonukleotide und verhindert das Ablesen dieser fehlgepaarten Bereiche durch die Polymerase. Das Accuprime-Protein unterbindet so die Amplifikation unspezifischer Produkte. Die PCR-Produkte aus cDNA sollten bei *Nephrin* je nach Spleißvariante 408 bzw. 388Bp und bei *Synaptopodin* 536Bp groß sein. Die **WT1-**PCR-Analyse ist bereits von Dr. V. Schumacher etabliert worden.

Zusätzlich zu diesen drei bereits auch mit der IF-Methode untersuchten Genen wurde noch die Expression des Podozytenmarkers **POD1** mittels RT-PCR untersucht, da für das POD1-Protein keine Antikörper verfügbar waren. POD1 wird alternativ auch als Transkriptionsfaktor 21 bezeichnet. Das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor des Helix-Loop-Helix-Typs. POD1 wird während der Embryonalentwicklung nur von mesodermalen Zellen gebildet. In ausgereiften Nieren wird POD1 nur in den Podozyten exprimiert.

Die optimalen PCR-Bedingungen für POD1 unter Verwendung der Advantage II-Polymerase von Clontech waren: 94°C für 3min, [94°C 1min; 65°C 2min; 72°C 2min] 35 Zyklen, 72°C für 5min und führten zu einem 194Bp langen-PCR-Produkt.

Um mögliche Fehler auszuschließen wurden alle RT-PCR-Reaktionen zweimal unabhängig voneinander wiederholt und für die semiquantitative Auswertung die Mittelwerte zugrunde gelegt.

In beiden untersuchten Zellkulturen NAK11 und DDS1 wurden alle vier Podozytenmarker exprimiert. Abb. 5.3 zeigt, dass sowohl WT1 als auch Synaptopodin nachweisbar ist.

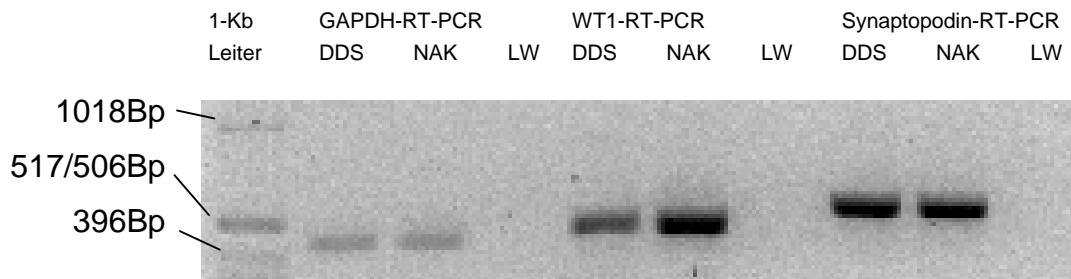


Abb. 5.3: Dieses Foto zeigt die Produkte der RT-PCR-Reaktionen von GAPDH (3 $\mu$ l), WT1 (10 $\mu$ l) und Synaptopodin (10 $\mu$ l). Aufgetrennt wurde die DNA in einem 2% Agarose-Gel. Der Leerwert (LW) wurde durch Verwendung von mRNA statt cDNA erstellt. Die Ehtidiumbromid-Färbung der DNA wurde in einem FLA3000-Phosphorimager detektiert und eingescannt.

Die quantitative Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels der AIDA-Biopackage-Software der Fa. Raytest. Jedes PCR-Produkt wurde dabei ins Verhältnis zum jeweiligen GAPDH-PCR-Produkt gesetzt, das als mengenmäßiger Standard bei jeder Probe zusätzlich amplifiziert wurde.

Tab. 5.1: Semiquantitative Auswertung der Expression von Podozytenmarkern in Zellkultur

	WT1	POD1	Synaptopodin	Nephrin
NAK11	1	1	1	+
DDS1	0,5	0,5	1	+

+: Expression nachweisbar, aber nicht quantifizierbar

Die semiquantitative Auswertung in Tab. 5.1 ergab, dass *Synaptopodin* in den Podozytenkulturen DDS 1 und NAK11 ungefähr gleichstark exprimiert wurde. Ein *Nephrin*-PCR-Produkt war zwar bei der Auftrennung über das 2% Nusieve-Agarose-Gel sichtbar, aber zu schwach, um quantifiziert zu werden. Bei *POD1* und *WT1* war hingegen eine um den Faktor 2 schwächere Expression in den DDS1 Zellkulturpodozyten zu messen.



## Synopsis

Anhand der durchgeführten Untersuchungen (Tab. 5.1 und Abb. 5.2) zur Charakterisierung der humanen Podozyten kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellkulturen DDS1 und NAK11 um Podozyten handelt. Sowohl die Podozytenmarker, die spezifisch in den Fußfortsätzen zu finden sind, wie Talin, Vinculin, Synaptopodin und Nephrin, als auch podozytenspezifische Transkriptionsfaktoren wie WT1 und POD1 und das für Podozyten typische Intermediärfilamentprotein Vimentin konnte in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Es ist nicht bekannt, dass es in der Niere noch weitere Zelltypen gibt, die alle untersuchten Proteine und cDNAs exprimieren.

Tab. 5.2: Zusammenfassung der Untersuchung von podozytenspezifischen Markern

Podozyten	Immunfluoreszenz					RT-PCR			
	Talin	Vinculin	WT1	Vimentin	Nephrin	WT1	POD1	Synaptopodin	Nephrin
<b>NAK11</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>DDS1</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Expression nachweisbar

### 5.1.3 Optimierung der Transfektionseffizienz für Podozyten

Ziel der Transfektion mit dem *Telomerase*-Gen war es das generelle Problem, dass Podozyten in Zellkultur nach 30 Passagen seneszent werden, zu beheben. Die *Telomerase* sollte die Podozytenkulturen NAK11 und DDS1 veranlassen die Populationsverdopplungen zu steigern. Nach neueren Erkenntnissen (O'Hare et al., 2000) reicht die Transfektion mit dem *Telomerase*-Gen alleine nicht aus, um die Zellen zu immortalisieren. Es kann aber von einer deutlich erhöhten Lebensspanne ausgegangen werden. Mit dem *Telomerase*-Gen transfizierte Zellen können eine bis zu fünffach höhere Passagenzahl erreichen. Erst eine Co-Transfektion mit dem *SV-40-T-Antigen* führt zu einer vollständigen Immortalisierung von Zellen. Ein für die Erstellung von Expressionsprofilen deutlich negativer Effekt ist allerdings die starke Expressions-Veränderung, die durch das *SV-40-T-Antigen* in den Zellen verursacht wird. Deshalb wurde beschlossen die Zellen nur mit dem *Telomerase*-Gen und nicht noch mit dem *SV-40-T-Antigen* zu transfizieren.

Für die Transfektion wurde der Expressionsvektor pGRN145 verwendet, der das *Telomerase*-Gen unter Kontrolle des MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus)-Promotors enthält. Für die Transfektion wurden frühe Passagen der Podozyten DDS1- und NAK11-Kulturen genommen. Diese wiesen noch die polygonale Form auf.

Die Transfektion des *Telomerase*-Gens in primäre humane Zellen erwies sich als sehr schwierig. Die verwendeten kommerziellen Transfektionsreagentien Fugene 6 (Roche-Diagnostics), Effectene und Superfect (Qiagen) sowie die Transfektion nach den Protokollen der Calciumphosphat- und DEAE-Dextran-Methode führten, trotz zahlreicher Veränderungen an den Protokollen, nicht zu transfizierten Klonen, die die Selektion mit Hygromycin B überstanden.

Um die Transfektionseffizienz besser überprüfen zu können, wurden deswegen zunächst Optimierungsexperimente mit einem pEGFP-WT450a-Konstrukt, das ein EGFP-WT1-Fusionsprotein bildet, vorgenommen. Das EGFP-System stellt eine sehr elegante Methode dar, um die Expression und die Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen ohne die Hilfe von Antikörpern zu untersuchen. In den

transfizierten Zellen wird ein Fusionsprotein aus dem Green-Fluorescent-Protein (GFP) und dem WT1-Protein synthetisiert. Das Gen steht dabei unter Kontrolle des CMV-Promotors. Die Fusionsproteine werden dabei in der Zelle wie das WT1-Protein lokalisiert und sind über den GFP-Teil im Fluoreszenzmikroskop detektierbar.

Für die *EGFP-WT1*-Transfektion wurden die aufgeführten Transfektionsreagentien benutzt. Die Transfektionseffizienzen von Lipofectamine 2000 (Invitrogen), Fugene 6 (Roche-Diagnostics), Effectene und Superfect (Qiagen) und Geneporter 2 (Peqlab) lagen bei unter 1 %; bei Genejammer (Stratagene) und Geneshuttle 20 bzw. 40 (Quantum) lag die Effizienz der Transfektion des EGFP-Vektors in die Podozyten bei ca. 2%.

Die Abbildung 5.4 zeigt Podozyten, die das EGFP-WT1-Fusionsprotein exprimieren. Das Fusionsprotein ist vor allem im Zellkern lokalisiert.

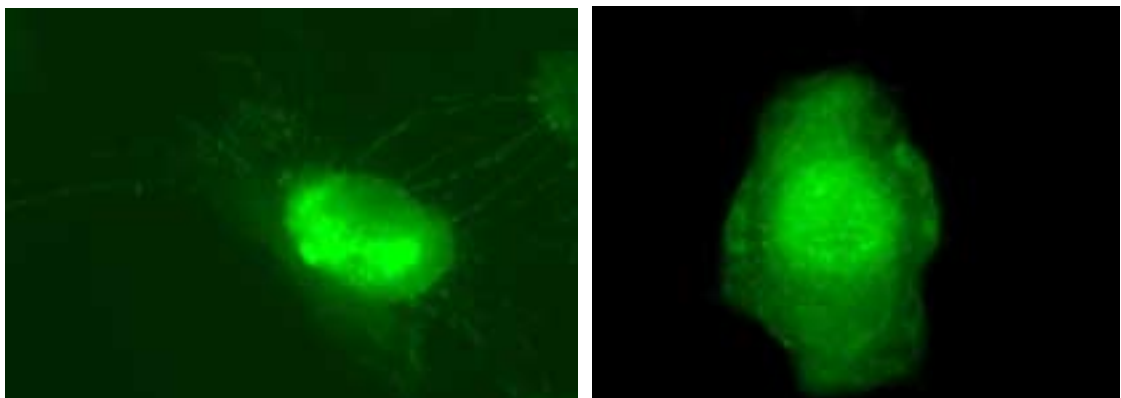


Abb. 5.4: EGFP-WT1-Nachweis nach erfolgreicher Transfektion bei NAK-Podozyten. Die grüne Anfärbung wird durch das in den Zellen exprimierte Fusionsprotein EGFP-WT1 verursacht. Die Zellen wurden bei einer 100-fachen Vergrößerung mit einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop fotografiert

Für die anschließenden Transfektionsexperimente mit dem *Telomerase*-Gen wurden die Transfektionsreagentien Genejammer und Geneshuttle 20 bzw. 40 verwendet. Die Transfektion des *Telomerase*-Gens mittels Genejammer und Geneshuttle 20 / 40 in Podozyten führte jedoch ebenfalls nicht zu transfizierten Klonen, die die Hygromycin-B Selektion überlebten.

Um herauszufinden, ob die schlechte Transfektionseffizienz nur in der Verwendung primärer humaner Zellkulturen oder aber an dem Konstrukt an sich lag, wurde die Transfektionseffizienz in NIH3T3-Zellen getestet.

Nach wenigen Wochen der Hygromycin-B-Selektion bildeten sich bei den transfizierten Zellen Klone, die scheinbar stabil transfiziert waren; bei den nicht transfizierten und den mit einem Leervektor transfizierten Zellen überlebten keine Zellen die Selektion. Anschließend wurde die Telomerase-Aktivität in den transfizierten und nicht transfizierten Zellen untersucht (TRAPeze-Kit, Fa. Intergen). Es wurde bei den transfizierten NIH3T3-Zellen zwar eine Telomerase-Aktivität festgestellt, jedoch auch:

- bei nicht transfizierten NIH3T3-Zellen und
- bei NIH3T3-Zellen, die mit dem leeren Vektor ohne exogenes *Telomerase*-Gen transfiziert wurden.

Es konnte daher nicht geklärt werden, ob die Telomerase-Aktivität der stabil transfizierten Zellen vom exogen eingeführten *Telomerase*-Gen stammte (Abb. 5.5).

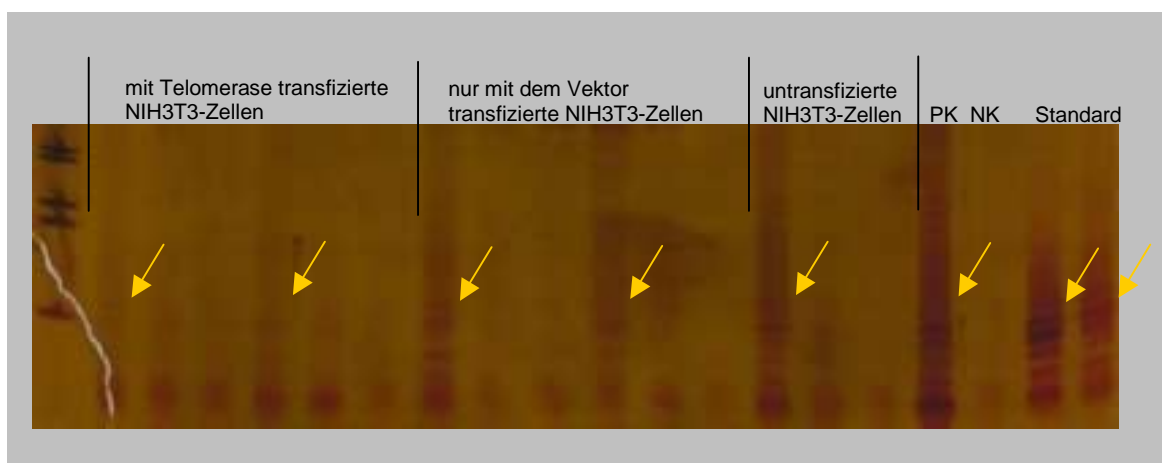


Abb. 5.5: Aktivitätsnachweis des Telomerase-Enzyms in den NIH3T3-Zellen. Die durch das Enzym erzeugten DNA-Banden sind mit Pfeilen markiert. Die DNA wurde mittels eines PAA-Gels aufgetrennt.

Die Ursache für die schlechte Transfektionseffizienz des pGRN145-Vektors samt *Telomerase*-Gen in die primär angelegten Podozyten scheint darin begründet zu sein, dass dieser Vektor mit 14,0kB im Vergleich zum pEGFP-C1 Vektor, der nur 4,7kB misst, recht groß ist und somit von primären humanen Zellen schlechter aufgenommen wird. Die NIH3T3-Zellen belegen jedoch, dass das Konstrukt von

Zellen aufgenommen wird. Ein Grund für die gescheiterten Transfektionsversuche an Podozyten könnte deshalb gewesen sein, dass sich humane Primärkulturen schlecht transfizieren lassen.

Ferner stellte sich heraus, dass Podozyten am besten wachsen, wenn sie sehr dicht beieinander sind. Je geringer die Dichte der Podozyten in einer Schale, desto schlechter war die Proliferationsrate. Da die benutzten Transfektionsmethoden nur eine Effizienz von max. 2% bei den Podozyten aufwiesen, starben bei der Selektion sehr viele Zellen ab. Es könnte sein, dass dadurch die Zelldichte für eine weitere Proliferation der erfolgreich transfizierten Podozyten zu gering war.

### **Erfolgreiche Transfektion der Podozyten mittels retroviralen Gentransfers**

Mit dem *Telomerase*-Gen wurden die NAK11-Podozyten erfolgreich von PD Dr. T. Benzing (Freiburg), anhand eines retroviralen Gentransfers transfiziert. Aufgrund der mit circa 80% sehr hohen Transfektionseffizienz werden mehrere zehntausend Zellen gleichzeitig transfiziert (mündliche Information Dr. T. Benzing), die das *Telomerase*-Gen stabil exprimieren. Dies hatte zur Folge, dass die Podozyten infolge der Selektion nicht so stark ausdünneten.

Im Rahmen dieser Arbeit reichte die verbliebene Zeit nicht mehr aus, die selektionierten Podozytenklone auf die Expression exogener Telomerase und typischer Podozytenmarker zu untersuchen. Es zeigte sich aber, dass die Proliferationsrate der transfizierten Podozyten angestiegen war.

## **5.2 Charakterisierung von Veränderungen in den Glomeruli beim Denys-Drash-Syndrom**

Patienten mit DDS sind durch eine früh auftretende Proteinurie charakterisiert, die meistens rasch zu einem nephrotischen Syndrom und zu terminalem Nierenversagen führt, häufig vor dem dritten Lebensjahr. Histologisch präsentiert sich diese Nephropathie meistens als diffuse mesangiale Sklerose (DMS) und seltener als fokale segmentale Glomerulosklerose. Habib und Mitarbeiter (1985) beschrieben die histopathologischen Läsionen bei DDS-Patienten sehr genau. Im Lichtmikroskop fanden sie unterschiedlich betroffene Regionen, wobei im cortico-medullären Bereich gelegene Glomeruli eine starke Vermehrung der mesangialen Matrix ohne Proliferation der Mesangiumzellen aufwiesen. Die Podozyten waren oft hypertroph und vakuolisiert und die Basalmembran wie auch die Bowmansche Kapsel verdickt. Ein Grossteil der proximalen Tubuli war dilatiert und mit abgeplattetem Epithel ausgekleidet. Dagegen befanden sich im subkapsulären Cortex kleine, unreife sklerotisierte Glomeruli mit höchstens drei bis vier Kapillarschlingen und kranzartig aufgereihten Podozyten. Diese Glomeruli waren von kleinen atrophischen Tubuli mit undifferenziertem Epithel und schmalen Lumen umgeben. Auffällige Anomalien der Arterien wurden nicht beobachtet. Elektronenmikroskopisch fanden sie unter anderem fusionierte Podozytenfußfortsätze.

Mit immunhistochemischen Analysen an Gefrier- und Paraffinschnitten wurde untersucht, ob es aufgrund der Expression eines mutierten WT1-Proteins zu einer veränderten Expression von WT1-Targetgenen, zu Strukturveränderungen des Podozyten-Zytoskeletts und der glomerulären Basalmembran in den DDS-Glomeruli kommt. Zusätzlich wurden DDS-Gewebe morphologisch betrachtet.

Es zeigte sich bei den DDS-Geweben eine unvollständige Nephrogenese mit einer reduzierten Glomerulizahl; nur einige Glomeruli hatten sich vollständig entwickelt, zeigten jedoch das typische von Habib und Mitarbeitern beschriebene Bild der DMS. Aus anderen Nephronanlagen entstanden nur noch kleine rudimentäre Glomeruli mit wenigen oder keinen Kapillarschlingen. Weiterhin auffällig waren die stark vermehrte mesangiale Matrix in den Glomeruli und die verdickten Wände der

corticalen afferenten Arterien mit stark verengten Lumina. Die Morphologie der NAK-Gewebe war unauffällig.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Gefrierschnitte der Gewebe DDS1-6 und Paraffinschnitte der Gewebe DDS4, DDS7 und DDS9 angefertigt. Als Normalkontrollen standen für die immunhistochemischen Untersuchungen die Kryogewebe NAK1-9 und das in Paraffin eingebettete Gewebe NAK10 zur Verfügung. Der immunhistochemische Nachweis der Proteine erfolgte mittels des LSAB<sup>+</sup>-Systems von DAKO (siehe Methodenteil). Nach Inkubation mit einem Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper findet eine enzymatische Reaktion statt, bei der das Substrat-Chromogen DAB oxidiert wird und sich braun färbt. Diese Färbung ist im Lichtmikroskop zu sehen. Es wurden von den Gefriergeweben 8µm dicke Schnitte mit einem Kryostat angefertigt. Für die Kryoschnitte musste die Art der Fixierung und die Antikörperkonzentration zuvor optimiert werden. Die in Tab. 5.3 aufgeführten Konzentrationen der Antikörper sowie die Art der Fixierung haben sich als günstig erwiesen.

Tab. 5.3: Zusammenstellung der optimierten Bedingungen für IHC bei Kryoschnitten

Antikörper	Art	Herkunft	Fixierung	Antikörpertiter bei Gefrierschnitten
<b>α-Actinin</b>	M	Dianova	A / M	1:5
<b>Agrin</b>	P	Santa Cruz	A / M	1:50
<b>Bcl-2</b>	M	DAKO	Aceton	1:400
<b>Collagen IV</b>	M	DAKO	A / M	1 :50
<b>EGFR</b>	M	DAKO	A / M	1:20
<b>Fibronektin</b>	P	DAKO	A / M	1:400
<b>HSP 72/73</b>	P	Santa Cruz	A / M	1:50
<b>Integrin α3β1</b>	M	DAKO	A / M	1:1000
<b>Laminin A</b>	M	DAKO	Aceton	1:25
<b>MMP7 (Ab-3)</b>	M	Calbiochem	A / M	1:50
<b>Nephrin</b>	P	H. Holthöfer	A / M	1:800
<b>p21</b>	M	DAKO	A / M	1:50
<b>PAR 4</b>	P	Santa Cruz	A / M	1:20
<b>Synaptopodin</b>	P	P. Mundel	A / M	1:5
<b>Talin</b>	M	Sigma	A / M	1:100
<b>Thy 1</b>	M	Dianova	A / M	1:1200

Antikörper	Art	Herkunft	Fixierung	Antikörpertiter bei Gefrierschnitten
<b>Utrophin</b>	M	Santa Cruz	A / M	1:100
<b>Vimentin</b>	M	DAKO	A / M	1:20
<b>Vinculin</b>	M	Dianova	A / M	1:500
<b>WT (C-19)</b>	P	Santa Cruz	A / M	1:300
<b>YB1</b>	P	B.Royer.Pokora	A/M	1/250

*M: monoklonaler Antikörper; P: polyklonaler Antikörper; A / M: Aceton-Methanol-Fixierung*

Für die immunhistochemischen Untersuchungen der Paraffingewebe musste die Demaskierungsbehandlung und der Antikörpertiter optimiert werden. Die genaue Durchführung ist im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben. Die in Tab. 5.4 aufgeführten Demaskierungsbehandlungen der Paraffinschnitte und Antikörpertiter erwiesen sich als optimal.

Tab. 5.4: Zusammenstellung der optimierten Bedingungen für IHC bei Paraffinschnitten

Antikörper	Art	Herkunft	Antikörpertiter bei Paraffinschnitten	Vorbehandlung der Paraffinschnitte
<b><math>\alpha</math>-Actinin</b>	M	Dianova	1:2	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Bcl-2</b>	M	DAKO	1:40	TRS (high pH)
<b>Collagen IV</b>	M	DAKO	1 :25	TRS (low pH)
<b>EGFR</b>	M	DAKO	1:10	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Fibronectin</b>	P	DAKO	1:400	unbehandelt
<b>Laminin A</b>	M	DAKO	1:20	Pepsin
<b>MMP7 (Ab-3)</b>	M	Calbiochem	1:25	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Nephrin</b>	P	H. Holthöfer	1:400	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Synaptopodin</b>	P	P. Mundel	1:5	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Talin</b>	M	Sigma	1:50	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>Tenascin</b>	M	DAKO	1:25	Pepsin
<b>Utrophin</b>	M	Santa Cruz	1:50	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer
<b>WT (C-19)</b>	P	Santa Cruz	1:100	Mikrowelle, in Na-Citrat-Puffer

*M: monoklonaler Antikörper; P: polyklonaler Antikörper; TRS: Target-Retrieval-Solution*



### 5.2.1 WT1 und seine potentiellen Zielgene

Analysiert wurden potentielle WT1-Zielgene, deren Expression durch das mutierte WT1-Protein in DDS-Geweben verändert sein könnte. Die untersuchten Proteine haben häufig eine Funktion bei der Differenzierung oder Proliferation von Zellen, wie dies auch für WT1 selbst bekannt ist.

Das WT1-Target-Gen ***Insulin-like growth factor-2 (IGF2)*** spielt eine wichtige Rolle bei der Embryogenese und Differenzierung von Zellen, wird jedoch nicht mehr in ausdifferenzierten epithelialen Zellen exprimiert (Drummond et al., 1992). Weiterhin wurde beschrieben, dass IGF2 die Expression von mesangialer Matrix in Zellkultur stimuliert (Pricci et al., 1996).

**NovH** ist ein IGF2-bindendes Protein; es spielt eine Rolle bei der Nephrogenese und Differenzierung von Zellen. Der Promotor des *NovH*-Gens wird ebenfalls vom WT1-Protein reguliert (Perbal B., 1999). Die NovH-Expression korreliert in Wilms-Tumoren invers mit der WT1-Expression (Chevalier et al., 1998).

Bei ***Bcl2*** handelt es sich auch um ein WT1-Target-Gen. Bcl2 ist ein integrales Protein der Mitochondrienmembran und wirkt in Zellen anti-apoptotisch (Hewitt et al., 1995). Konstitutive *Bcl2*-Expression konnte mit der Entstehung von Lymphomen in Verbindung gebracht werden. Weiterhin wird vermutet, dass Bcl2 eine Rolle bei der Nephrogenese spielt (Stuart et al., 2001).

**Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)** ist ein Transmembranprotein und eine Tyrosinkinase. Englert und Mitarbeiter (Englert et al., 1995a) beschrieben eine Regulation des Promotors durch WT1. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass EGF über den EGF-Rezeptor epitheliale Gewebe zu gesteigerter Wachstumsaktivität veranlassen kann (Schlessinger et al., 1992). Ferner wurde beobachtet, dass EGFR bei Aktin-Rearrangements des Zytoskeletts involviert ist (Suzuki et al., 2001).

Für die aufgeführten Proteine wurden abgesehen von WT1 nur immunhistochemische Untersuchungen an Kryoschnitten durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Paraffinschnitte noch nicht zur Verfügung standen.

Gefrierschnitte weisen gegenüber Paraffinschnitten eine bedeutend schlechtere Histologie auf.

Die Ergebnisse, die bei den immunhistochemischen Untersuchungen erhalten wurden, sind in der Tab. 5.5 zusammengefasst. Die wahrgenommene relative Expressionsstärke wurde durch + gekennzeichnet. Wenn in einem Feld zwei Bewertungen vorgenommen wurden, so bezieht sich die erste auf große, kaum sklerotisierte Glomeruli und die zweite auf kleine, stark sklerotisierte Glomeruli.

Tab. 5.5: Übersicht der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an WT1 und seinen potentiellen Targetgenen

Paraffingew.	WT1	IGF2	NovH	Bcl2	EGFR
<b>NAKParaffin</b>	+++				
<b>DDS4</b>	+++				
<b>DDS7</b>	+++				
<b>DDS9</b>	+++				
Gefriergew.	WT1	IGF2	NovH	Bcl2	EGFR
<b>NAK Kryo</b>	+	(+)	+++	-	++
<b>DDS1</b>	+	-	+++/+	-/(+)	+
<b>DDS2</b>	+				
<b>DDS3</b>	+	-	+++/+	-/-	+
<b>DDS4</b>	+	-	++/+	-/(+)	+
<b>DDS5</b>	+	-	+++/+	-/-	+
<b>DDS6</b>	+	-	++/+	-/-	+

(+) schwache Färbung; +; geringe Färbung; ++: mittlere Färbung; +++ starke Färbung

Bei WT1 ist die Braunfärbung der Zellkerne in den Podozyten (rote Pfeile) und den Parietalzellen (gelbe Pfeile) gut sichtbar (Abb. 5.6). Drei unterschiedliche DDS-Glomeruli sind in Abbildung 5.6 dargestellt. Zwei stärker sklerotisierte Glomeruli, deren Podozyten kranzartig an den Rand gedrängt wurden (grüne Pfeile) und deren mesangiale Matrix in der Mitte stark vermehrt ist, befinden sich unten links und oben rechts. Oben links ist ein kaum sklerotisierter DDS-Glomerulus abgebildet. Ein großer Unterschied besteht jedoch in der Zahl der Podozyten; während der DDS-Glomerulus links oben in etwa halb so viele Podozyten enthält wie der NAK-Glomerulus, sind in den stärker sklerotisierten Glomeruli nur noch wenige Podozyten wahrzunehmen. Die Zellkerne der Podozyten wiesen in etwa

gleichstarke Anfärbungen auf. Eine unspezifische Hintergrundfärbung ist im Tubulusepithel zu erkennen.

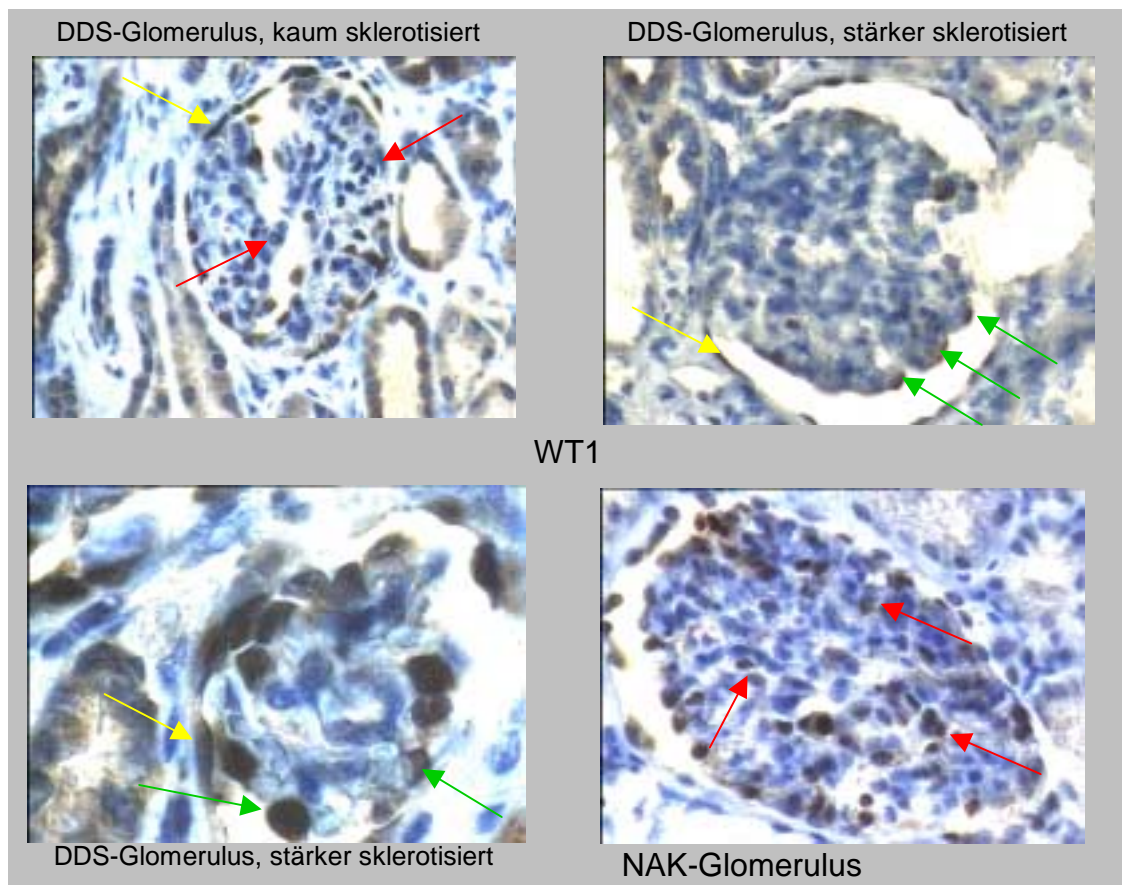


Abb. 5.6: Immunhistochemische Analyse des WT1-Proteins in Glomeruli von NAK- und DDS-Gewebe (Paraffinschnitte). Die braune Anfärbung zeigt welche Zellen das WT1-Protein aufweisen. Die Hämatoxylin-Gegenfärbung verursacht eine Blaufärbung der Zellkerne. Das Bild links unten wurde mit 40-facher, die anderen Bilder mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Mit Antikörpern gegen IGF2 ließen sich in den Glomeruli im NAK-Gewebe eine stärkere Expression als in DDS-Gewebe nachweisen. Dies kann aber nicht mit Sicherheit bestätigt werden da erst noch weitere Normalgewebe untersucht werden müssen. IGF2 ist interessant, weil es in der Lage ist, die Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen in Mesangiumzellen zu stimulieren (Pricci et al., 1996). Wie bereits beschrieben, ist die Vermehrung der mesangialen Matrix gerade bei stark sklerotisierten Glomeruli ein Hauptmerkmal der DMS bei DDS-Patienten.

Mit Antikörpern gegen NovH konnte bei stark sklerotisierten Glomeruli nur eine schwache Expression nachgewiesen werden. Eine reduzierte NovH-Expression in den stärker sklerotisierten Glomeruli könnte an der Ausbildung des DDS-Krankheitsbildes beteiligt sein, da es zu zahlreichen Expressionsveränderungen von NovH-Targetgenen in den Glomeruli kommen könnte. Die weniger stark sklerotisierten DDS-Glomeruli wiesen bedeutend höhere Expressionen als die stark sklerotisierten Glomeruli auf. Gegenüber den NAK-Glomeruli war eine Verminderung der NovH-Detektion nur bei zwei Proben wahrnehmbar.

Anhand des immunhistologischen Nachweises konnte gezeigt werden, dass das WT1-Zielgen *EGFR* tatsächlich in seiner Expression bei Podozyten in DDS-Glomeruli reduziert ist. Die Reduktion von EGFR könnte durch seinen Einfluss auf das Aktin-Arrangement zur Veränderung der Zytoskelettstruktur bei DDS-Glomeruli führen.

Eine Expression von Bcl2 konnte bei zwei DDS-Geweben in stark sklerotisierten Glomeruli schwach detektiert werden, wahrscheinlich handelte es sich aber um Parietalzellen; dies müsste noch eingehender untersucht werden. Die anti-apoptotische Wirkung von Bcl2 könnte erklären, warum es bei DDS-Patienten nach einigen Jahren zu Tumoren in den Nieren kommt.

### **5.2.2 Proteine der Podozytenfußfortsätze und der Schlitzmembran**

Das Zusammenwirken der wichtigsten Proteine in den Fußfortsätzen der Podozyten und der GBM wurden bereits in Abb. 1.6 in der Einleitung dargestellt.

Der kontraktile Apparat der Fußfortsätze ist aus einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen aufgebaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression und Lokalisation von **Utrophin**, **Talin**, **Vinculin** und  **$\alpha$ -Actinin** in den Podozyten untersucht. Die vier Proteine sind ausgesprochen wichtig, um den kontraktilen Apparat aufzubauen, der die unterschiedlichen Kräfte, die auf den Podozyten einwirken, wie z.B. den Blutdruck, auszugleichen. Kann dies nicht mehr geschehen, kommt es zu einer Ablösung der Fußfortsätze und damit des Podozyten von der GBM.  $\alpha$ -Actinin ist ferner für die Quervernetzung der Aktin-Mikrofilamente notwendig. Weiterhin wurde die Expression von **Synaptopodin**

und des Intermediärfilamentproteins **Vimentin** untersucht. Synaptopodin ist ein Aktin-assoziiertes Podozytenmarker, der in den Fußfortsätzen der Podozyten vorkommt.

Verankert sind die Fußfortsätze vor allem über **Integrin  $\alpha3\beta1$**  in der GBM. Eine Verminderung von Integrin  $\alpha3\beta1$  führt, bei dem artifiziell erzeugten nephrotischen Syndrom mittels Puromycin-Aminonukleosid, zu einer Ablösung der Fußfortsätze von der GBM und anschließend zur Verschmelzung der Fußfortsätze, so dass die Filtrationsfunktion der Podozyten nicht mehr stattfinden kann und es zur Proteinurie kommt (Smoyer et al., 1997). Zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten wird eine Schlitzmembran ausgebildet, deren Hauptbestandteil **Nephrin** ist. Eine Verminderung von Nephrin kann auch eine Proteinurie verursachen, wie es beim kongenitalen nephrotischen Syndroms vom finnischen Typ der Fall ist.

Bei **Fibronektin** handelt es sich um ein membranständiges Protein, das auch Aktin-assoziiert an Collagen IV-Fasern und Proteoglykane der GBM binden kann.

Tabelle 5.6 stellt eine Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen dar. Die wahrgenommene relative Expressionsstärke wurde durch (+) bis +++ gekennzeichnet. Wenn in einem Feld zwei Bewertungen vorgenommen wurden, so bezieht sich die erste auf große kaum sklerotisierte Glomeruli und die zweite auf kleine stark sklerotisierte Glomeruli. Bei dem normalen embryonalen Geweben NEK1 bezieht sich der erste Wert auf das glomeruläre Stadium der S-shaped-bodies und der zweite Wert auf spätere Glomerulistadien.

Tab. 5.6: Übersicht der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen an Proteinen der Podozytenfußfortsätze und Schlitzmembran

Integrale Proteine der Podoz.-Membran			Proteine der Podozyten-Fußfortsätze und Schlitzmembran					Proteine des Zytoskeletts der Podozyten	
Paraffin-gewebe	Fibro-nektin	Integrin $\alpha 3\beta 1$	$\alpha$ -Actinin	Utrophin	Talin	Vinculin	Neph-rin	Synapto-podin	Vimen-tin
NAK	(+)		++	(+)			++	+++	
DDS4	(+)		+	(+)			+	+	
DDS7	(+)		++/-	(+)			+	(+)	
DDS9	(+)		+	(+)			+	+	
Gefrier-gewebe	Fibro-nektin	Intgrin $\alpha 3\beta 1$	$\alpha$ -Actinin	Utrophin	Talin	Vinculin	Neph-rin	Synapto-podin	Vimen-tin
NAK		++	++	++	+	++	+	++	+
DDS1		+	+	+	(+)	++	+/-	+/(+)	+
DDS2		+					+/-	+/(+)	+
DDS3		+	+	++	(+)	++	+/-	+/(+)	++
DDS4			+	+	(+)	++	+/-	+/(+)	+
DDS5		+	+	+	(+)	++	+/-	+/(+)	+
DDS6		+	+	+	(+)	++	+/-	+/(+)	+

(+) schwache Färbung; +; geringe Färbung; ++: mittlere Färbung; +++ starke Färbung

Es zeigte sich, dass Proteine, die an der Funktion des kontraktiven Apparates beteiligt sind wie  $\alpha$ -Actinin und Talin, in DDS-Podozyten schwächer exprimiert werden (Abb. 5.7). Bei Utrophin hingegen sind die Ergebnisse nicht ganz klar, bei DDS-Gefrierschnitten scheint eine schwächere Expression detektierbar zu sein, bei den Paraffinschnitten dagegen nicht. Bei Vinculin konnte beim IHC-Nachweis kein Unterschied zwischen den DDS- und NAK-Glomeruli nachgewiesen werden.

Das die Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten bildende Protein Nephryn ist in allen untersuchten DDS-Glomeruli schwächer nachzuweisen als in gesunden Glomeruli (Abb. 5.7). Es fällt außerdem auf, dass in stark sklerotisierten Glomeruli nahezu keine Nephryn-Expression zu detektieren ist.

Beim Antikörpernachweis gegen das Membran-Ankerprotein Fibronectin ist kein Unterschied zwischen den NAK- und DDS-Glomeruli festzustellen. In allen untersuchten Gewebeschnitten ist eine schwache Braunfärbung in den Glomeruli nachzuweisen.

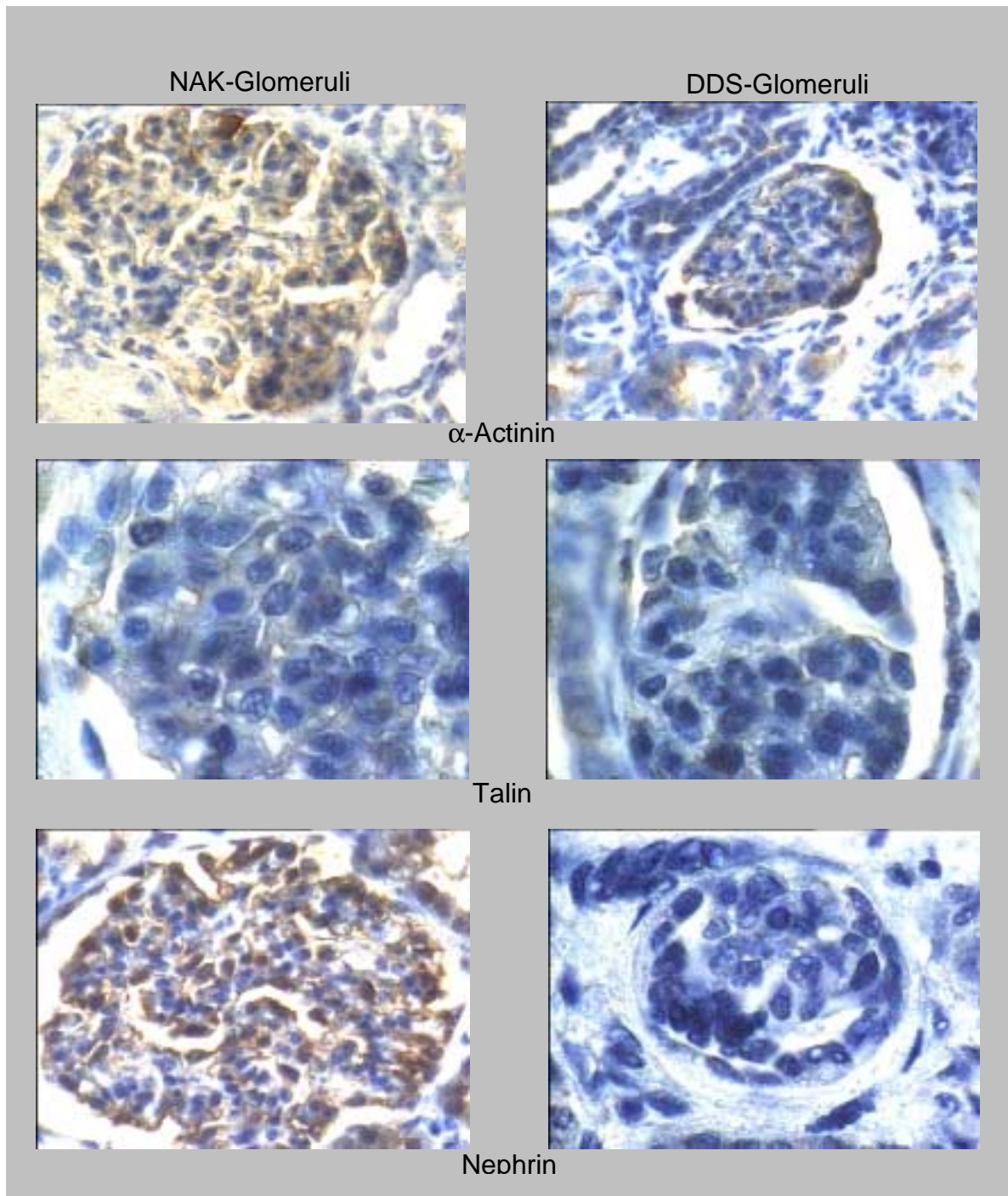


Abb. 5.7: Immunhistochemische Untersuchungen an NAK- und DDS-Glomeruli (Paraffinschnitte). Die Abbildungen in der Mitte und rechts unten sind mit 40-facher Vergrößerung, die anderen mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Hämatoxylin-Blaufärbung zeigt die Zellkerne, die Braunfärbung weist die untersuchten Proteine nach.

Integrin  $\alpha3\beta1$ , das als Ankerprotein fungiert, ist dagegen in den DDS-Glomeruli (Abb. 5.8) auffallend weniger stark nachzuweisen. Das Intermediärprotein Vimentin ist in allen untersuchten Gewebeschnitten gut zu erkennen, es lassen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen.

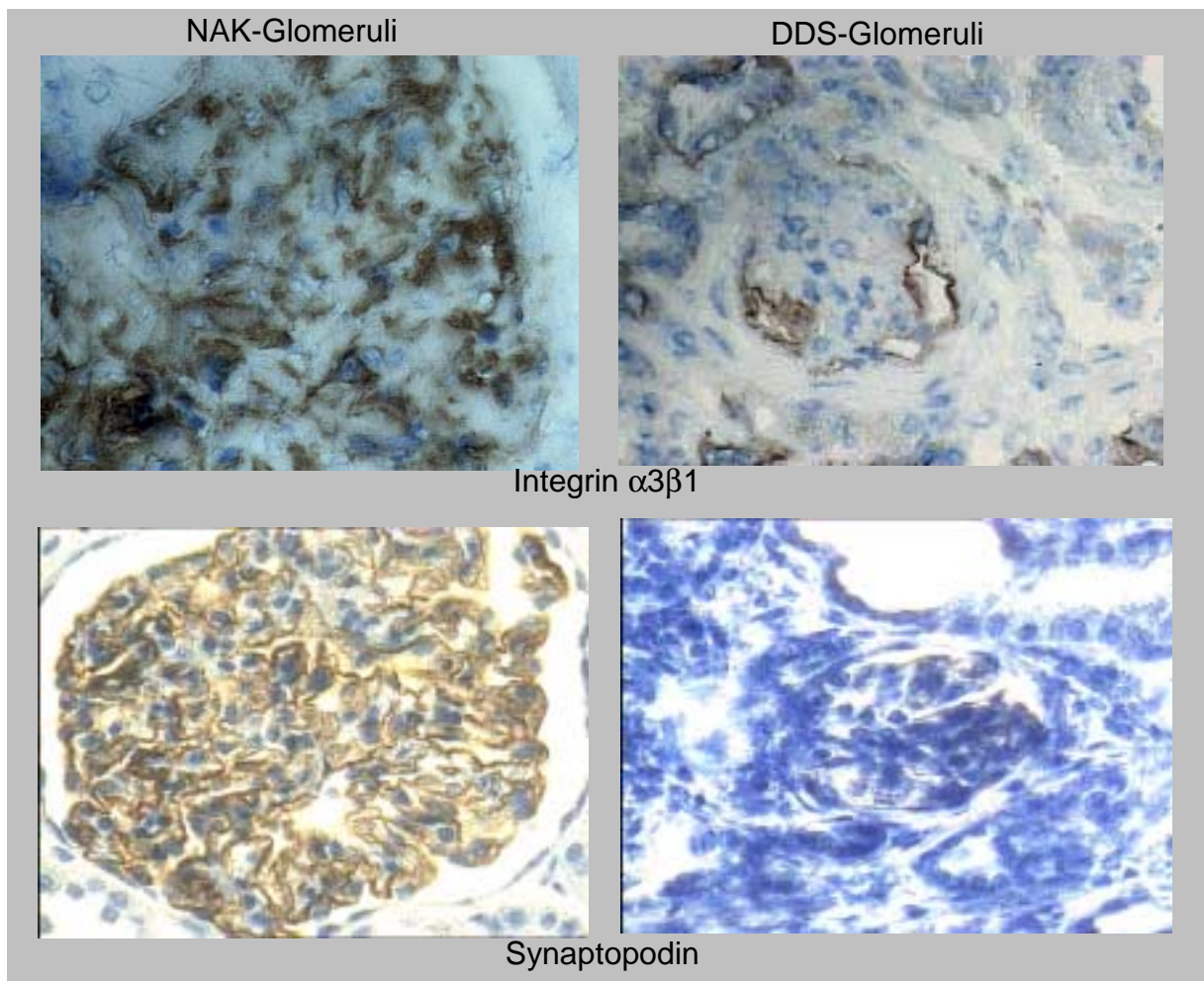


Abb. 5.8: Immunhistochemische Untersuchungen an NAK-, NEK- und DDS-Glomeruli. Die IHC-Analysen von Integrin erfolgten an Kryoschnitten, die Analysen von Synaptopodin an Paraffinschnitten. Die Abbildung links oben wurde mit 40-facher, die anderen mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Hämatoxylin-Blaufärbung zeigt die Zellkerne, die Braunfärbung weist die untersuchten Proteine nach.

Das Aktin-assoziierte Synaptopodin ist sowohl bei den NAK Paraffin- als auch bei den NAK-Kryoschnitten viel stärker nachzuweisen als bei den jeweiligen DDS-Geweben. In Abb. 5.8 ist im NAK-Glomerulus eine sehr intensive Anfärbung von Synaptopodin zu sehen, die gleichmäßig über den gesamten Glomerulus verteilt ist und die Fußfortsätze der Podozyten nachzeichnet; im DDS-Glomerulus ist



dagegen nur an einigen Randbereichen des Glomerulus das Antigen zu detektieren. In stärker sklerotisierten DDS-Glomeruli ist nur sehr wenig Synaptopodin zu detektieren.

### 5.2.3 Proteine der glomerulären Basalmembran

Die GBM ist eine der kritischsten Komponenten der Ultrafiltrationsbarriere der Niere. Es handelt sich um eine ungewöhnlich dicke Basalmembran, die von zwei Seiten eingegrenzt wird: den gefensterten Endothelzellen und den viszerale Epithelzellen (Podozyten). Diese beiden Zelltypen bauen durch Abgabe der extrazellulär lokalisierten Proteine über Golgi-Vesikel die GBM auf. Immunhistochemisch wurden Proteine untersucht, von denen bekannt war, dass sie eine Rolle bei der Verankerung des Podozyten in der GBM spielen (Abb. 1.6) oder essentiell für die Funktion der Filtrationsbarriere sind. Die Hauptbestandteile der GBM sind Collagen IV, Laminin 11 (besteht u.a. aus Laminin A) und Proteoglycane wie Agrin und Tenascin (Miner J.H., 1998). Für alle Komponenten wurde bei DDS-Patienten in den Glomeruli eine gesteigerte Expression beschrieben (Yang et al., 2001).

Tab.5.7: Übersicht der an Proteinen der glomerulären Basalmembran durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen

Paraffingew.	Collagen IV	Laminin A	Agrin	Tenascin
NAK	+	+++		
DDS7	+(+) diffus	+		
DDS4	+(+) diffus	+		
DDS9	+(+) diffus	+		
Gefriergew.	Collagen IV	Laminin A	Agrin	Tenascin
NAK	+		+	++
DDS3	++/+++		+	+
DDS5	++/+++		+	+
DDS1	++/+++		+	+
DDS4	++/+++		+	+
DDS6	++/+++		+	+
DDS2				

(+) schwache Färbung; +; geringe Färbung; ++: mittlere Färbung; +++ starke Färbung

Es zeigte sich, dass weder bei Laminin A, das Bestandteil aller Laminine ist, noch bei den HSPGs Agrin und Tenascin eine verstärkte Expression detektierbar war.

Die Laminin-Expression war in den Geweben der DDS-Patienten deutlich verringert (Abb. 5.9). Die Verringerung der Laminin-Bildung zusammen mit der verringerten Integrin  $\alpha 3\beta 1$ -Expression könnten erklären, wie es zu der Ablösung der Podozytenfußfortsätze mit anschließender Verschmelzung dieser kommt. Die Detektion der Heparansulfatproteoglycane (HSPG) ergab zwei unterschiedliche Ergebnisse. Bei Agrin, dem häufigsten HSPG, konnte keine Veränderung nachgewiesen werden. Tenascin hingegen schien in DDS-Geweben schwächer exprimiert zu werden.

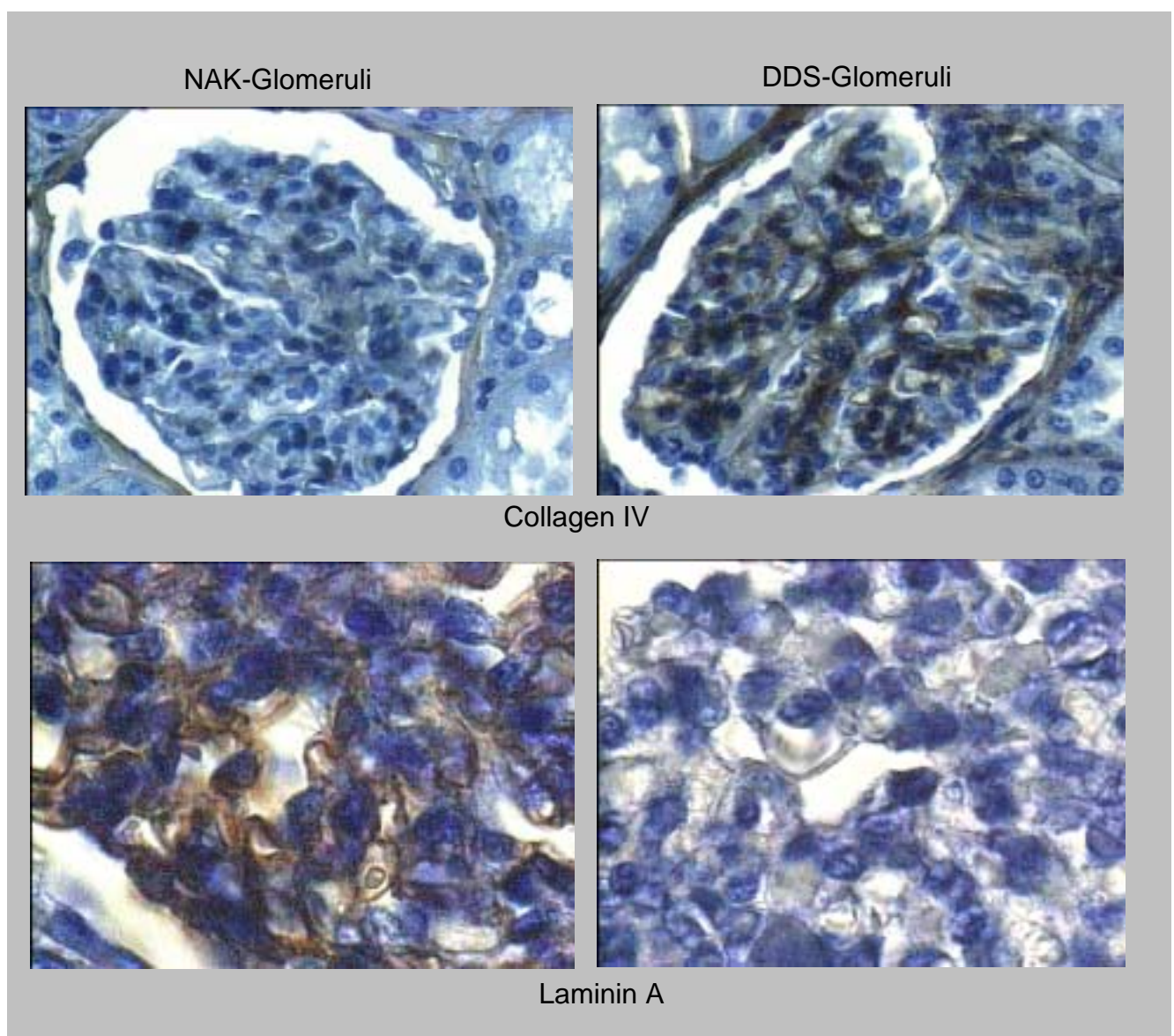


Abb. 5.9: Immunhistochemische Untersuchungen an NAK- und DDS-Glomeruli (Paraffinschnitte). Die Abbildungen oben sind mit 20-facher, die anderen sind mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen worden. Die Hämatoxylin-Blaufärbung zeigt die Zellkerne, die Braunfärbung weist die untersuchten Proteine nach.

Die Färbung von Collagen IV erscheint in DDS-Glomeruli deutlich intensiver. (Abb. 5.9). Bei besonders stark sklerotisierten Glomeruli ist eine weitere Steigerung der Färbung zu erkennen. Collagen IV könnte eine Marker für den Sklerotisierungsgrad der Glomeruli bei DDS-Patienten sein.

Die erhaltenen Ergebnisse stimmen nur zum Teil mit denen von Yang und Mitarbeitern überein. Eine Erklärung für die Verdickung der GBM könnte sein, dass die beschriebene Zunahme der extrazellulären Matrix neben Collagen IV von weiteren nicht im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteinen wie Collagen I und HSPG´s (z.B. Osteonektin) stammen könnte; ähnliche Befunde machten Mooney und Mitarbeiter bei der experimentellen Thy1-Nephritis (Mooney et al., 1999).

#### 5.2.4 Mesangiale Proteine

Bei dem ebenfalls untersuchten **Thy1** handelt es sich um ein Transmembranprotein, das in Mesangiumzellen vorkommt (Kroszek et al., 1986). Es ist bekannt, dass dieses Glycoprotein bei Stammzellen und T-Lymphozyten den mesangialen Ursprung charakterisiert (Ito et al., 2001). Thy1 spielt bei Differenzierungsprozessen eine Rolle und sollte von ausgereiften Zellen kaum exprimiert werden.

Tab. 5.8: Immunhistochemische Untersuchung von Thy1

Gefriergewebe	Thy1
NAK	-
DDS1	+ / ++
DDS2	+ / ++
DDS3	+ / ++
DDS4	+ / ++
DDS5	+ / ++
DDS6	+ / ++
NEK1	++ bis (+)

Für Thy1 (Abb. 5.10) konnte in DDS-Geweben eine intensive Anfärbung beobachtet werden. Beachtenswert ist, dass Thy1 bei embryonalem Nierengewebe (NEK) in den Glomeruli-Vorläuferstadien gut nachweisbar ist.

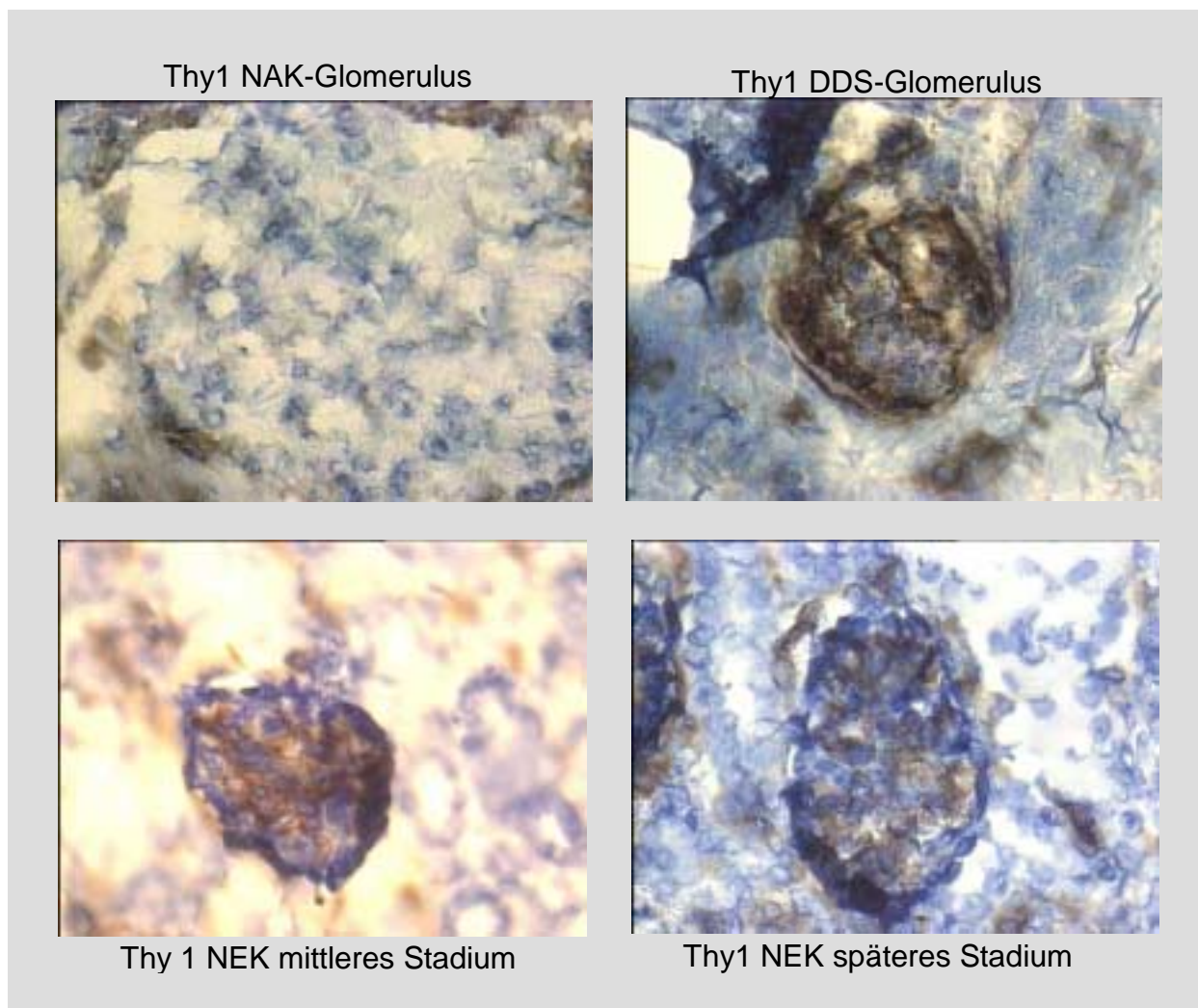


Abb. 5.10: Immunhistochemische Untersuchungen an NAK-, DDS- und NEK-Glomeruli (Gefrierschnitte). Die Abbildungen sind mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen worden. Die Hämatoxylin-Blaufärbung zeigt die Zellkerne, die Braunfärbung weist die untersuchten Proteine nach.

Es ist erkennbar, dass vom mittleren zum späteren Entwicklungsstadium des Glomerulus eine Abnahme der Thy1-Anfärbung erfolgt. Im adulten Gewebe (NAK) ist Thy1 nur noch in den Parietalzellen detektierbar. Die Thy1-Expression in den DDS-Glomeruli könnte darauf hindeuten, dass diese Glomeruli noch unreif und nicht vollständig ausdifferenziert waren und deshalb eine Thy1-Expression weiter bestehen blieb.

### 5.3 Untersuchung der Apoptose in Glomeruli

Sowohl für Mesangiumzellen als auch für Podozyten entwickelte sich der Verdacht, dass Apoptose zu einer Reduktion beider Zelltypen führen könnte. Bei den Mesangialzellen könnte der beobachtete Anstieg von Thy1 mit zunehmendem Sklerotisierungsgrad der DDS-Glomeruli zu einer gesteigerten Sensitivität der Mesangiumzellen bezüglich der Complement-induzierten Apoptose durch Apoptose-auslösende Faktoren führen.

Neben den beschriebenen Veränderungen bei den Mesangialzellen ist auch bei DDS-Podozyten das Auftreten von Apoptose möglich. In späteren Stadien der diffusen mesangialen Sklerose kommt es im Anschluss an die Verschmelzung der Fußfortsätze zu einer Ablösung vieler Podozyten von der GBM und zu einer Hypertrophierung der verbliebenen Podozyten sowie einer Vermehrung der Mesangialzellmatrix. Die Verminderung der Podozyten in den Glomeruli der DDS-Patienten wirft die Frage auf, ob die Podozyten apoptotischen Vorgängen unterworfen sind, die dazu führen, dass die Podozytenzahl immer stärker abnimmt. Besonders beachtenswert ist, dass die Zahl der verbliebenen Podozyten in den Fällen, in denen die Ursache wie z.B. toxische Stoffe oder Bluthochdruck wieder verschwunden ist, nicht mehr zunimmt.

Um bei beiden Zelltypen eine mögliche Veränderung der Apoptoserate zu analysieren, wurden die DDS- und NAK-Glomeruli mittels eines in-situ Zelltod-Detektionstests (TUNEL-Assay; Roche) auf Apoptose untersucht. Der Test beruht darauf, dass es in apoptotischen Zellen aufgrund der Zerfallserscheinungen gehäuft zu Strangbrüchen der DNA-Doppelhelix kommt. Die Detektion dieser DNA-Brüche erfolgt über das Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT). TdT hängt an überhängende Einzelstränge Nukleotide an. Wenn diese mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert sind, lassen sich die Strangbrüche direkt im Fluoreszenz-Mikroskop nachweisen.

Für die Untersuchung wurden Paraffinschnitte und Kryoschnitte von DDS- und NAK-Glomeruli verwendet. Eine Positivkontrolle wurde durch 10-minütige Inkubation eines Paraffinschnittes von NAK10 mit DNaseI erzeugt.

Bei den Kryoschnitten zeigte sich keine Apoptose in den Glomeruli. Die Ergebnisse bei den Kryogeweben offenbarten, dass bei den Glomeruli der DDS-Patienten Apoptose weder bei den Podozyten noch bei den Mesangiumzellen auftrat. Die Erhöhung von Thy1 bei den DDS-Mesangiumzellen führte nicht zu einer zunehmenden Apoptose.

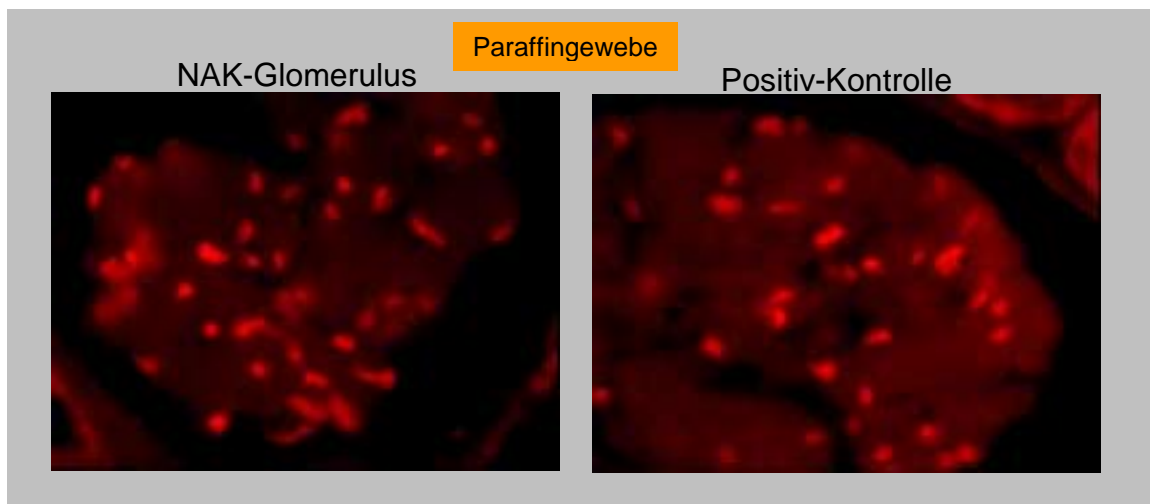


Abb. 5.11: Untersuchungen zur Apoptose in Glomeruli. Links dargestellt ist die Normalkontrolle, rechts die Positiv-Kontrolle. Die Rotfärbung wird durch den Einbau von, mit Texas-Red markierten, dNTP's an gebrochene DNA-Stränge verursacht und weist auf apoptotische Zellkerne hin. Die Fotos wurden an einem Fluoreszenz-Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung vorgenommen.

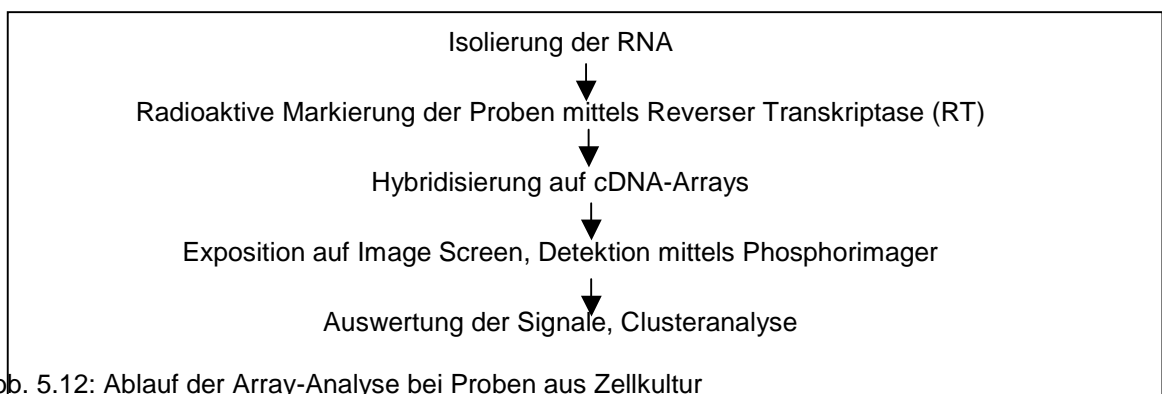
In Abbildung 5.11 sind die Ergebnisse des Apoptose-Tests an Paraffingeweben dargestellt. Es zeigt sich, dass in dem NAK-Gewebe und in der Positiv-Kontrolle ungefähr gleich viele Zellkerne Apoptose aufweisen.

Bei den Paraffinschnitten waren alle Zellkerne sowohl bei den NAK- als auch bei den DDS-Glomeruli apoptotisch. Es war auch kein Unterschied zur Positiv-Kontrolle festzustellen. Die Ursache der vermeintlichen Apoptose dürfte in der zu langen Lagerung des Gewebes in Formalin liegen. Es ist beschrieben, dass es mit ansteigender Fixierungsdauer zu einer pH-Senkung der Formalinlösung kommt, diese pH-Änderung führt zur beschleunigten Degradation der DNA (Wiegand et al., 1996).

## 5.4 Erstellung der Expressionsprofile von Podozyten gesunder und erkrankter Personen

### 5.4.1 Array-Analysen

Zur Anfertigung der Expressionsprofile (Abb. 5.12) wurden cDNA-Arrays verwendet. Das Verfahren des „Expression-Profiling“ ermöglicht die simultane Expressionanalyse der Expression tausender Gene innerhalb einer Gewebeprobe. Dabei werden die cDNAs verschiedener Gewebe als Proben nacheinander auf dieselben Arrays hybridisiert, um die differentielle Expression von Genen zu bestimmen. Mit wenigen Experimenten wird beim „Expression-Profiling“ schon ein Screening ermöglicht, das mit herkömmlichen Methoden (Northern Blot, RT-PCR, etc.) einen enormen Aufwand erfordern würde. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Auswahl der Kontroll-RNA, die als „normal-exprimiert“ für alle zu betrachtenden Gene anzusehen ist, da die Genexpression von einer Vielzahl örtlicher, zeitlicher und exogener Faktoren abhängig ist.



Für die Erstellung der Expressionsprofile von Podozyten wurde total-RNA aus den Zellkulturen NAK11 und DDS1 mittels des Microprep-Kits von Stratagene isoliert. Für jede Hybridisierung wurden pro Filter je 4µg total RNA radioaktiv mit  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP oder  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP markiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die Methode musste jedoch bei einigen Einzelschritten optimiert werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen. So war das von Clontech mitgelieferte Klenow-Enzym aufgrund der kleinen Portionierung instabil. Dies hatte zur Folge, dass es bei der Probenmarkierung zu unterschiedlich starken Hybridisierungsergebnissen kam. Nach Feststellung des Problems wurde das Klenow-Enzym von Amersham verwendet, das eine gleichbleibende Qualität zeigte. Die Waschprozedur wurde insofern modifiziert, dass nur zweimal (statt 4x) mit Waschpuffer 1 und einmal für 10min (statt 2x 30min) mit Waschpuffer 2 die Membranen gewaschen wurden. Waschpuffer 2 wurde zusätzlich in seiner Zusammensetzung geändert; statt 0,1x SSC und 0,5% SDS wurden 0,4x SSC und 0,5% SDS verwendet. Die veränderten Waschbedingungen waren vollkommen ausreichend, um die unspezifischen Signale zu entfernen. Der Vorteil lag darin, dass die Signale stärker waren und die Waschprozedur schonender für die auf die

Membranen gespotteten Sonden war, so dass die Membranen bis zu fünfzehnmal statt nur viermal verwendet werden konnten.

Um die Fehler bei der Auswertung der Array-Analysen möglichst klein zu halten, wurden die radioaktiven Signale für mindestens zwei unterschiedlich lange Zeitspannen gemessen und die Ergebnisse gemittelt. Weiterhin wurden die RNA-Proben aus Zellkulturen aus mehreren RNA-Extraktionen gepoolt, um Zellzyklus- und Zelldichte-abhängige Expressionsveränderungen so gering wie möglich zu halten. Die Proben wurden mindestens zweimal getrennt voneinander gelabelt und auf die Filter hybridisiert.

Drei verschiedene Typen von Arrays standen für die Erstellung der Expressionsprofile zur Auswahl:

- Das **Human Atlas-Array-Set 3.6** (Clontech) wurde für die Erstellung der Expressionsprofile verwendet. Das Set besteht aus drei Nylon-Membranen, auf die jeweils 1188 unterschiedliche cDNA-Sequenzen einfach aufgebracht (gespottet) sind. Insgesamt standen somit knapp 3600 bekannte Gene zur Analyse differentieller Genexpression zur Verfügung. Bei den verwendeten Nukleinsäuren handelt es sich um PCR-Produkte, die vom Hersteller auf ihre Richtigkeit hin mittels Sequenzierung überprüft wurden. Von Vorteil war, dass die Filter sich häufiger benutzen ließen; dies ermöglichte einen besseren Vergleich bei der Feststellung der differentiellen Expression von Genen, da hierzu die gemessenen cDNA-Expressionen der verschiedenen Gewebe miteinander verglichen werden konnten. In der Abbildung 5.13 ist ein Beispiel einer Array-Analyse anhand der Hybridisierung von markierten Proben aus den Zellkulturen DDS1 und NAK11 auf den Atlas Array Filter eins dargestellt. Mit Kreisen markiert sind Expressionsunterschiede, die sich bereits mit dem bloßen Auge wahrnehmen lassen. Die genaue Quantifizierung der radioaktiven Signale, die die Expressionsstärke der Gene darstellen, erfolgte über die AIDA Image Analysis-Software (Raytest). Erst wenn mindestens ein Unterschied von Faktor zwei in der Signalstärke zwischen zwei unterschiedlichen Proben zu beobachten war und dies in einem weiteren Versuch bestätigt werden konnte, wurde eine differentielle Genexpression in Erwägung gezogen. Vereinfacht wurde die Detektion differentieller Expression durch Sortierung der Daten nach dem Students-T-Test und einer Clusteranalyse (Eisen et al., 1998). Die Array-Analysen ergaben immense Datenmengen, die deshalb in dieser Arbeit nur in Auszügen wiedergegeben werden.

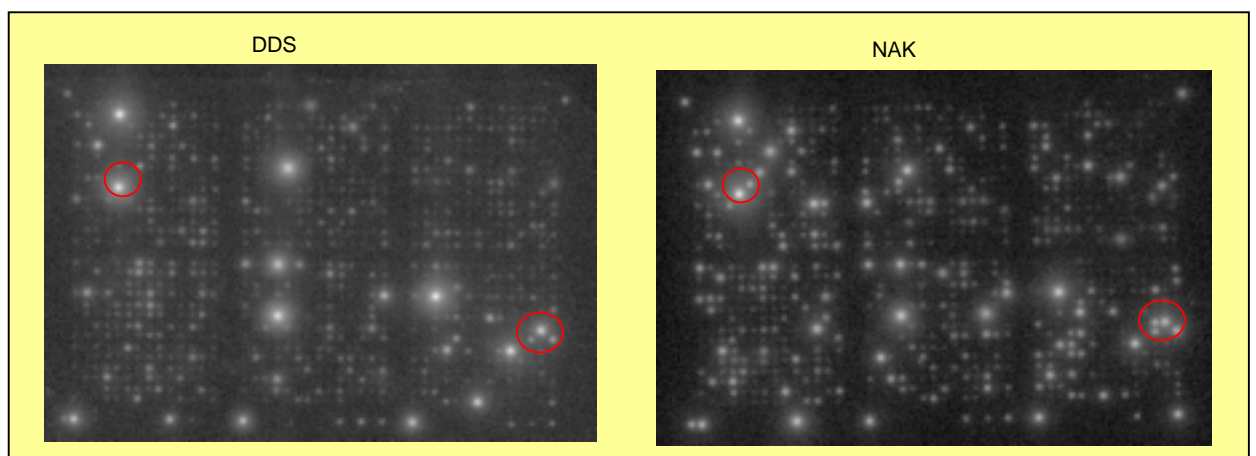




Abb. 5.13: Vergleich zweier Atlas Array-Membranen, die mit zwei verschiedenen radioaktiv-markierten Proben hybridisiert wurden. Die radioaktiven Signale sind hell dargestellt und wurden mittels eines Phosphorimagers detektiert. Mit Kreisen gekennzeichnet wurden offensichtliche Expressionsunterschiede.

Die Expressionsprofile der Podozyten in Zellkultur DDS1 und NAK11 sind zusammen mit den in-vivo-Expressionsdaten der Glomeruli in Kapitel 5.6 aufgeführt.

Besonders große Unterschiede zwischen den DDS- und NAK-Podozyten in Kultur zeigten sich bei einigen im Folgenden aufgeführten Genen. Es muss jedoch beachtet werden, dass jeweils nur eine DDS- und eine NAK-Primärkultur zur Verfügung stand und deshalb sehr große Schwankungen möglich sind.

**In DDS-Zellen höher exprimiert waren:**

*Empty Spiracles (Drosophila) Homolog 2-Gen (EMX2)*: EMX2 wurde ursprünglich bei der Gehirnentwicklung entdeckt. Es ist nach neueren Erkenntnissen aber auch bei der Morphogenese des Urogenitaltraktes wichtig. Bei EMX2-mutierten Mäusen fand keine Nieren und keine Gonadenentwicklung statt. (Miyamoto et al., 1997; Ogata et al., 2000.)

*Insulin Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3)*: IGFBP3 vermag die Aktivität der Insulin Wachstums-Faktoren (IGFs) zu modulieren. Interessant ist, dass bei einer für das verwandte IGFBP1 transgenen Maus eine höhere Expression von IGFBP1 zu einer Vermehrung der extrazellulären Matrix, insbesondere von Collagen IV und letztendlich zu einer Glomerulosklerose führte (Doublier et al., 2000).

**In DDS-Zellen schwächer exprimiert waren:**

*Cortactin (EMS1)*: Cortactin hat unter anderem die Funktion das Zytoskelett und die Zell-Adhäsion von Epithel- und Tumorzellen zu organisieren (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>, 2002, van Damme et al., 1997). Die Reduktion von Cortactin könnte deshalb eine Rolle bei den in der Immunhistochemie beobachteten Veränderungen des Zytoskeletts bei den DDS-Zellen spielen.

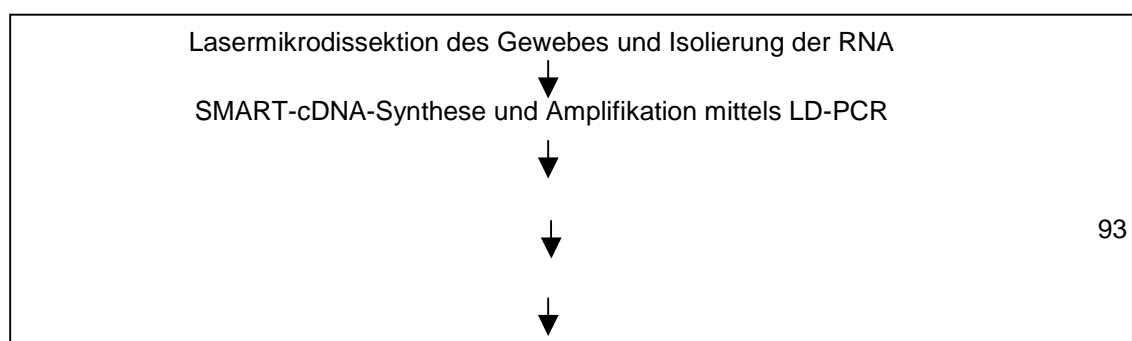
Einige Cyclingene wie *Cyclin A1*, *Cyclin D1* und *Cyclin D2*: Dies dürfte jedoch auf die Bedingungen der Zellkultur zurückzuführen sein, da eine unterschiedliche Konfluenz in den Kulturschalen schnell zu Veränderungen in der Proliferation führt. Die Cyclingene steuern die Regulation des Zellzyklus und damit auch die Proliferation. Die RNA wurde aus verschiedenen Kulturstadien mehrfach isoliert und es wurde immer darauf geachtet die RNA möglichst von Zellen bei gleicher Konfluenz zu isolieren, doch lässt sich eine volle Übereinstimmung nicht herstellen. An diesem Beispiel wird deutlich, dass es sinnvoll ist die Zellkulturexpressionsdaten zusammen mit den Expressionsdaten der Gefrierschnitte zu betrachten.

- Das **Unigene cDNA Array Set** (DKFZ, Heidelberg) besteht aus 2 Nylon-Filtern, die je mit über 17.000 verschiedenen cDNA's doppelt gespottet wurden. Insgesamt standen also knapp 35.000 bekannte Gensequenzen und unbekannte Expressed-Sequence-Tags (EST) für die Analyse der Genexpressionen zur Verfügung. Bei den gespotteten Fragmenten handelt es sich um 300 bis 500Bp lange PCR-Produkte. Bedauerlicherweise konnten die als differentiell exprimiert erkannten Gene nicht für die Erstellung von Expressionsprofilen verwendet werden, da weder vom Hersteller der Unigene-Filter (das DKFZ in Heidelberg) noch vom Vertreiber (das RZPD in Berlin) zweifelsfrei die Qualität der für die Filterherstellung verwendeten Nukleinsäuren geklärt werden konnte. Bedenken betrafen eine mangelnde Kontrolle (keine Sequenzierung) der gespotteten PCR-Produkte und die Auswahl der verwendeten Sequenzen. Weiterhin wies die Unigene-Datenbank, die für die Zuordnung der gespotteten Fragmente verwendet wurde, viele falsche Annotationen auf.
- Beim **Atlas Plastik Human 8.3K MicroArray** (Clontech) werden 8300 durchschnittlich 80Bp-lange Oligonukleotide vom Hersteller zweimal auf einer Plastikmembran fixiert. Bei allen verwendeten Sequenzen handelt es sich um bekannte Gene. Auch dieser Filtertyp wurde nicht für die Erstellung von Expressionsprofilen verwendet, da es Zweifel gab, wie lange die fixierten Oligonukleotide auf der Plastikmembran bleiben. Eine gleichbleibende DNA-Menge der Spots auf dem Filter ist bei einer Mehrfachverwendung von entscheidender Bedeutung, weil schwache Signale bei mehrmaliger Verwendung zusätzlich abgeschwächt werden oder ganz verschwinden. Dies kann letztlich zur Verursachung falsch negativer Ergebnisse führen.

## 5.5 Erstellung der Expressionsprofile von Glomeruli gesunder und erkrankter Personen

Die Erstellung der Expressionsprofile aus Kryogewebe hatte zum Ziel, die differentielle Expression von Genen in Glomeruli unter in-vivo Bedingungen zu analysieren. Die meisten zur Zeit verfügbaren Daten zur Regulation von Genen in Glomeruli wurden unter in-vitro Bedingungen gewonnen und haben somit nur einen reduzierten Aussagewert (Palmer et al., 2001). Häufig kommt es bei in-vitro Analysen z.B. in Zellkultur zu Versuchsbedingungen, die die Expression von Zellen so stark verändern, dass sie als Artefakte bezeichnet werden können und nur bedingt mit der in-vivo Situation vergleichbar sind.

Für die Erstellung der Expressionsprofile (Abb. 5.14) wurde total RNA aus kompletten lasermikrodissektierten Glomeruli isoliert; die enthaltene mRNA wurde mittels der SMART-Methode amplifiziert. Die amplifizierte cDNA wurde analog zu den Expressionsanalysen der Zellkulturproben radioaktiv markiert und auf die Membranen des Atlas-Arrays-Set 3.6 hybridisiert.



---

Radioaktive Markierung der Proben mittels Klenow-Enzym

Hybridisierung auf cDNA-Arrays

Exposition auf Image Screen, Detektion mittels Phosphorimager

Auswertung der Signale, Clusteranalyse

Abb. 5.14: Ablauf der Array-Analyse bei Proben aus Kryogewebe

### 5.5.1 Lasermikrodissektion von Glomeruli

Die Lasermikrodissektion erfolgte an entwässerten Gefrierschnitten von fünf gesunden Personen (NAK 1, 6-9), deren Nierengewebe im Mikroskop als normal bewertet wurde, und von zwei Denys-Drash Patienten (DDS 1, 3) mit diffuser mesangialer Sklerose.

Wegen der Größe der Podozyten war es nicht möglich, Einzellzellen zu mikrodissektieren. Infolgedessen wurden aus allen Geweben komplette Glomeruli isoliert.

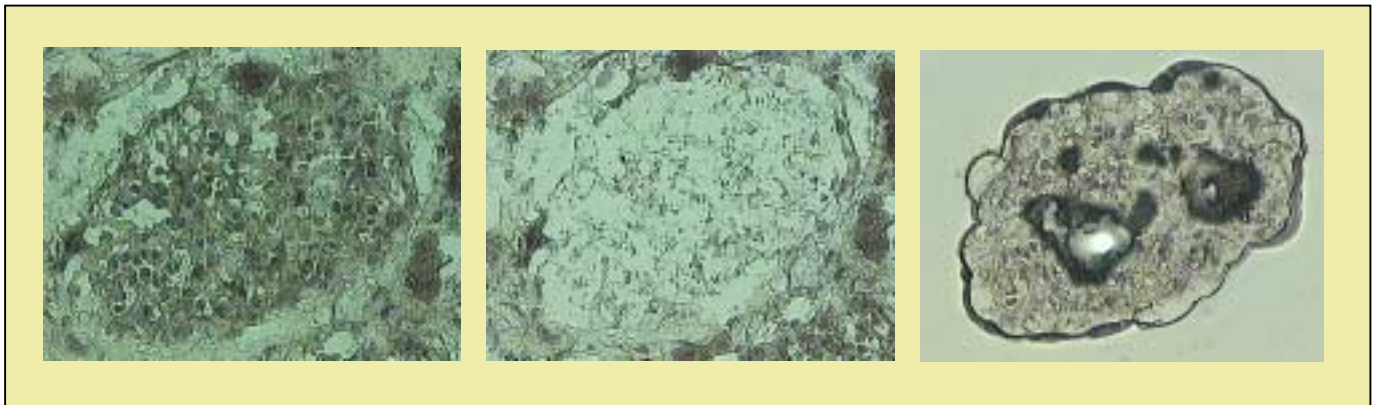
Die Podozytenzahl in den Glomeruli der Normal- und DDS-Patienten unterschied sich durchschnittlich um ca. den Faktor 2,5 (Tab. 5.9). Um ungefähr die gleiche Podozytenzahl zu isolieren, wurden bei den Normalkontrollen jeweils ca. 1200 Glomeruli (Abb. 5.14) und bei den DDS-Geweben jeweils ca. 3000 Glomeruli mikrodissektiert.

Tab. 5.9: Ermittelte Podozytenzahlen pro Schnittfläche der Glomeruli

Gefrier-Gewebe	Podozytenzahl pro Schnittfläche eines Glomerulus	Durchschnittliche Zahl der mikrodissektierten Podozyten
NAK 1	18,2	
NAK 6	17,8	
NAK 7	13,6	
NAK 8	16,5	
NAK 9	17,2	
<b>Mittel NAK</b>	<b>16,7</b>	<b>20.040</b>
DDS 1	5,4	
DDS 3	7,2	
DDS 9	8,1	
<b>Mittel DDS</b>	<b>6,9</b>	<b>20.700</b>

Die Zahl der tatsächlich mikrodisezierten Podozyten ergibt sich aus der Podozytenzahl pro Schnittfläche eines Glomerulus und den insgesamt isolierten Glomeruli. Durchschnittlich wurden bei beiden Gruppen mit je circa 20.000 die gleichen Podozytenmengen untersucht.

Abb. 5.15: Dargestellt ist ein Glomerulus einer Normalperson vor (linkes Bild) und nach (rechtes Bild) der Mikrodisektion. Im mittleren Bild ist die Stelle im Kryoschnitt zu sehen, an der sich vorher der Glomerulus befand. Alle Aufnahmen wurde mit 20-facher Vergrößerung am LCM-



Gerät aufgenommen.

Die Abbildung 5.15 lässt erkennen, dass der Glomerulus nahezu komplett mikrodiseziert werden konnte.

### 5.5.2 Optimierung der RNA-Amplifikation

Für die Hybridisierung der Arrays ist eine Mindestprobenmenge im Bereich von 4 Microgramm nötig. Durch die Lasermikrodisektion von Glomeruli mit anschließender RNA-Extraktion (ca. 100ng) ist allerdings nicht die nötige Probenmenge zu erreichen. Die LCM-Prozedur ließ sich auch nicht ausdehnen, da die Mikrodisektion von 3000 DDS-Glomeruli bereits einige Tage in Anspruch nahm. Um trotzdem genug Probenmaterial für die Erstellung von Expressionsprofilen zu bekommen, blieb nur die Möglichkeit, die mRNA zu amplifizieren. Zur Amplifizierung der RNA standen verschiedene Methoden zur Auswahl: die lineare Amplifikation mittels der T7-DNA-Polymerase oder zwei Amplifikationsmethoden, die beide die PCR zur Amplifikation nutzen.

#### Lineare Amplifikation der mRNA mittels T7-Polymerase

Diese Amplifikation nutzt die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7. Spezielle Random-Oligonukleotide, ausgestattet mit einer T7-Erkennungssequenz, binden an die in der Lösung befindlichen mRNA-Stränge. Dies ermöglicht der T7-Polymerase die Oligonukleotide zu verlängern. Ist der Strang bis ans Ende kopiert, fällt die T7-Polymerase ab und kopiert den nächsten RNA-Strang nach dem gleichem Schema.

In Veröffentlichungen wurden voneinander stark abweichende Amplifikationseffizienzen der mRNA mittels T7-Polymerase von  $10^2$  (Van Gelder et al., 1990) bis zu  $10^6$  (Luo et al., 1999) beschrieben.

Trotz vielfältiger Modifizierungen des Protokolls (Kap. 4.7) ist es nicht gelungen, die RNA-Menge mehr als zu verdoppeln.

Die Modifizierungen betrafen den Einsatz von

- sechs unterschiedlichen Oligonukleotiden mit T7-Erkennungssequenzen
- unterschiedlichen Säulen zur Aufreinigung und Konzentrierung der RNA
- T7-Polymerasen verschiedener Hersteller

Als problematisch bei dieser Methode hat sich erwiesen, dass die Kontaminationsfreiheit in einem „normalen“ Labor, in dem viele verschiedene Untersuchungen mit bakteriellen Plasmiden und der RNA und DNA von einigen eukaryotischen Lebewesen durchgeführt werden, sehr schwierig zu gewährleisten ist. Dies war sicherlich gerade bei dieser Methode mit äußerst vielen Arbeitsschritten ein großes Problem.

Für die Amplifikation der RNA wurden deshalb andere Methoden getestet, die nur sehr wenige Arbeitsschritte benötigten. In Frage dafür kamen die RNA-Amplifikationsmethoden mittels poly(A)-PCR (Brady & Iscove, 1993) und die SMART-Methode (Clontech).

#### **RNA-Amplifikation mittels poly(A) PCR (Brady & Iscove, 1993)**

Diese RNA-Amplifikation-Methode besteht aus drei Schritten: cDNA-Synthese, Verlängerung der cDNA um einige dATP-Nukleotide mittels der Terminalen-Deoxynukleotidyl-Transferase und die anschließende Amplifikation der cDNA durch PCR. Die Amplifikation verschiedener RNA's funktionierte zuverlässig. Problematisch war jedoch die aufwendige und für jede frisch isolierte RNA stets von neuem nötige Optimierung (Abb. 5.16) der bis zu 1kB langen PCR-Produkte. Die immer wieder neuen Optimierungen der PCR betrafen die Pufferbedingungen und die Oligonukleotidkonzentrationen.

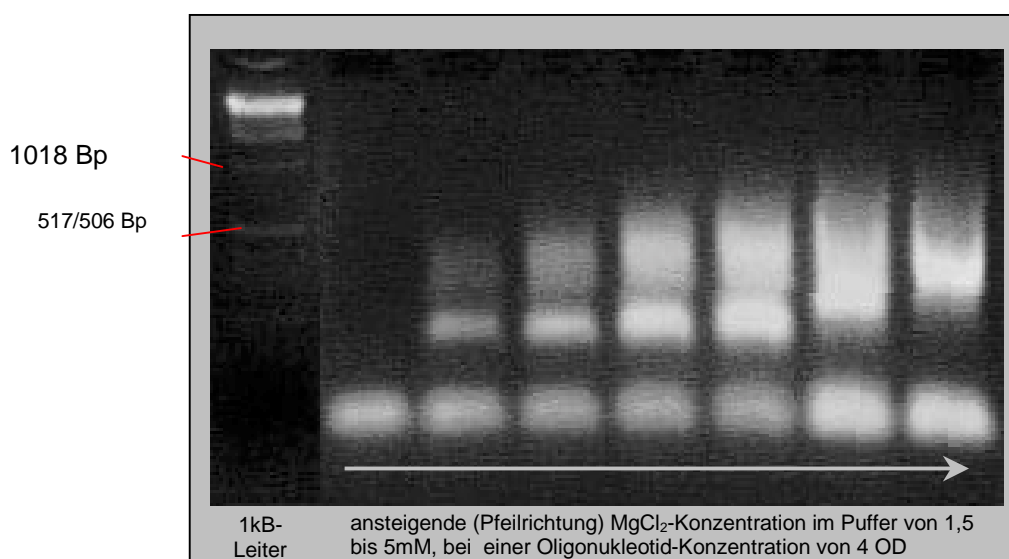


Abb. 5.16: Optimierung der PCR-Produkte mit Hilfe der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration nach Brady & Iscove. Aufgetragen wurden je 10µl PCR-Produkt. Von links nach rechts ansteigend wurden die MgCl<sub>2</sub>-

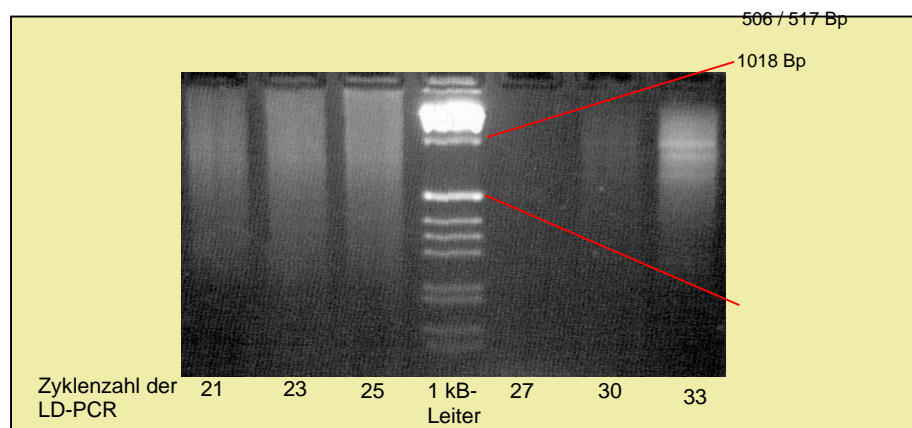
Konzentrationen im jeweils verwendeten PCR-Puffer erhöht (1,5mM; 2,0mM; 2,5mM; 3,0mM, 3,5mM; 4,0mM; 4,5mM; 5,0mM). Die Auftrennung der DNA erfolgte mittels eines 1% Agarose-Gels.

### RNA-Amplifikation mittels SMART-Methode (Clontech)

Die SMART-Methode hat sich als am geeignetsten zur RNA-Amplifikation erwiesen. Es werden lediglich zwei Arbeitsschritte (cDNA-Synthese und LD-PCR) benötigt, um die RNA in ausreichender Menge zu amplifizieren. Bei dieser Methode wurden einige Optimierungen vorgenommen. Die RNA wies die beste und höchste Quantität auf, wenn total-RNA mit dem totalRNA Microprep-Kit von Stratagene extrahiert wurde. Mit Hilfe dieses Kits war es innerhalb von 45min möglich, einen - aufgrund eines DNaseI-Verdau - von DNA freien, total-RNA-Extrakt zu isolieren. Mit der herkömmlichen Methode der RNA-Extraktion mittels Ethanol-Fällung wurde eine geringere RNA-Ausbeute bei gleichzeitig schlechterer Qualität erzielt. Nachgewiesen werden konnten diese Unterschiede durch die nachfolgende LD-PCR. In Abb. 5.17 sind die PCR-Produkte von zwei Proben, die mittels beider Methoden gewonnen wurden, nach verschiedenen PCR-Zyklen dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass bei der RNA-Extraktion mittels des Stratagene-Kits schon bei einer bedeutend geringeren Zyklenzahl ein PCR-Produkt zu sehen ist, das die verschiedenen Transkripte gleichmäßiger repräsentiert.

Abb. 5.17 Vergleich der SMART-Amplifikation zweier Proben aus dem gleichen Gewebe. Bei der linken Probe wurde die RNA durch den RNA-Microprep-Isolation Kit extrahiert; bei der rechten Probe wurde die RNA mittels Ethanol-Fällung extrahiert. Aufgetragen wurde je 10µl der amplifizierten Proben nach den angegebenen LD-PCR-Zyklen. Die Auftrennung erfolgte über ein 1% Agarose-Gel.

Die Veränderungen betrafen auch die Reverse Transkriptase (RT). Die RT von Clontech war bei



Verwendung des SMART-Kits in Packungsgrößen von 7µl beigelegt. Auch hier zeigte sich, wie bei dem Klenow-Enzym von Clontech (siehe 5.4), dass das Enzym bei solchen geringen Mengen nicht stabil war. Dies äußerte sich in sehr unterschiedlichen Effizienzen der cDNA-Synthese. Dieses Problem konnte durch gesonderte Bestellung von größeren Enzymmengen beseitigt werden.

Generell problematisch ist die PCR-Amplifizierung von RNA, da sich hierdurch Verfälschungen der Expressionen eines jeden Gens ergeben können, weil jede Taq-Polymerase bestimmte Sequenzen bei der Amplifizierung bevorzugt. Um einschätzen zu können, ob sich die repräsentative Häufigkeit bestimmter Transkripte in den Expressionsprofilen veränderte, wurde ein Vergleich von amplifizierten und nicht amplifizierten Expressionsprofilen vorgenommen.

### **5.5.3 Vergleich der Expressionsprofile amplifizierter und nicht amplifizierter Proben (Überprüfung der Zuverlässigkeit der SMART-Methode)**

Die Untersuchungen zur Qualität der RNA-Amplifizierung mittels der SMART-Methode wurden an Zellkulturproben durchgeführt, da aus den Zellkulturen NAK11 und DDS1 große Mengen an RNA isoliert werden konnten, während die zu isolierende RNA-Menge aus LCM-Proben für eine Hybridisierung der Atlas Arrays mit unamplifizierter RNA nicht ausreichte.

Um einschätzen zu können, wie stark die SMART-Methode zu Fehlern in der Darstellung der Expression einzelner Gene führt, wurde anhand je zweier Proben die differentielle Expression nicht amplifizierter RNA mit der SMART amplifizierter RNA verglichen (Abb. 5.18).

Die Überprüfung der SMART-Methode erfolgte über einen Reliabilitäts-Test (Hampson et al., 1991). Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit einer Methode wurden die Varianzen zweier Methoden miteinander verglichen. Der sich daraus ergebende Koeffizient ermöglichte, Gene mit ähnlichen Werten der differentiellen Expression auszuwählen und die interne Konsistenz der neuen Methode zu bestimmen.



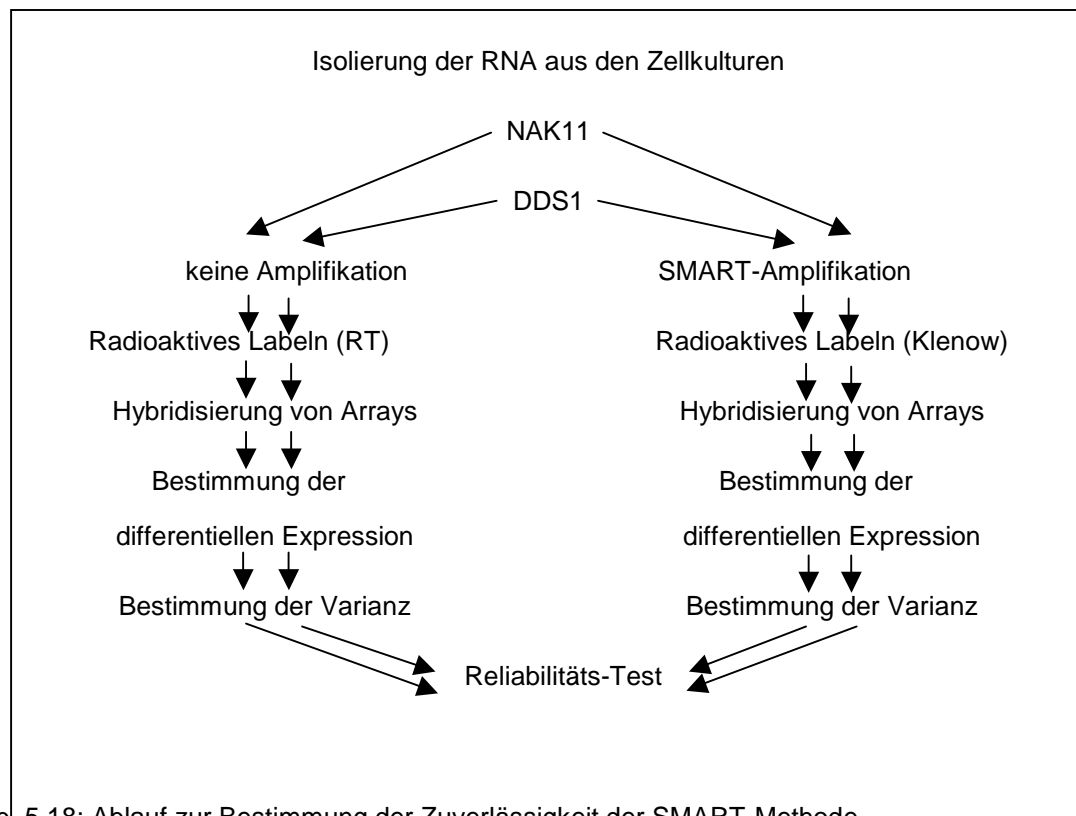


Abb. 5.18: Ablauf zur Bestimmung der Zuverlässigkeit der SMART-Methode

Von den 3530 untersuchten wiesen 2861 Gene eine detektierbare Expression ( $>0$ ) auf. Bei diesen Genen wurden die differentiellen Expressionen beider Methoden miteinander ins Verhältnis gesetzt. Aus dem Verhältnis der Varianzen wurde die Zuverlässigkeit (Reliabilität) der SMART-Methode bestimmt. Wenn nur die Gene, deren Verhältnis der differentiellen Genexpression beider Methoden maximal um den Wert 0,67 nach unten oder 1,5 (der Wert hat nichts mit den Werten aus Abb. 5.19 gemeinsam) nach oben ausschlägt, berücksichtigt werden, so erhält man aus dieser Gruppe einen Gütewert der internen Konsistenz  $\rho$  (rho) = 0,85. Dieser Wert bedeutet eine hohe Übereinstimmung (Stöber J., 1999) der zwei untersuchten Methoden für knapp 1500 exprimierte Gene. Werden hingegen alle 2861 exprimierten Gene zur Ermittlung der Zuverlässigkeit herangezogen, ergibt sich mit  $\rho = 0,41$  eine relativ geringe Zuverlässigkeit der SMART-Methode. Zu beachten ist jedoch, dass die Expressionsprofile nur je zweimal erstellt wurden, bei einer höheren Wiederholungsrate dürfte die Zuverlässigkeit höher sein, da einzelne Ausreißer nicht mehr so stark ins Gewicht fallen.

In Abb. 5.19 sind die differentiellen Expressionen der einzelnen Gene bei beiden Methoden in Gruppen zusammengefasst. In den Säulen ist die differentielle Genexpression der einzelnen Gene in Gruppen zusammengefasst. In den unteren Balken der Säulen befinden sich die Gene, deren Genexpression in den DDS-Podozyten erhöht ist (Verhältnis NAK zu DDS 0 bis 0,5). In den oberen Balken sind die Gene zahlenmäßig erfasst, deren Expressionen in den DDS-Zellen reduziert ist (Verhältnis NAK zu DDS ab 1,75). Es zeigt sich, dass die Methode der RNA-Amplifikation mittels SMART nicht so feine Unterschiede darstellt und es zu einer Reduzierung stärkerer Expressionsunterschiede (größer 1,75 und kleiner 0,75) führt. Somit lassen sich mittels der

SMART-Methode nicht alle differentiell exprimierten Gene auffinden. Es werden scheinbar aber kaum falsch positive Expressionsveränderungen verursacht.

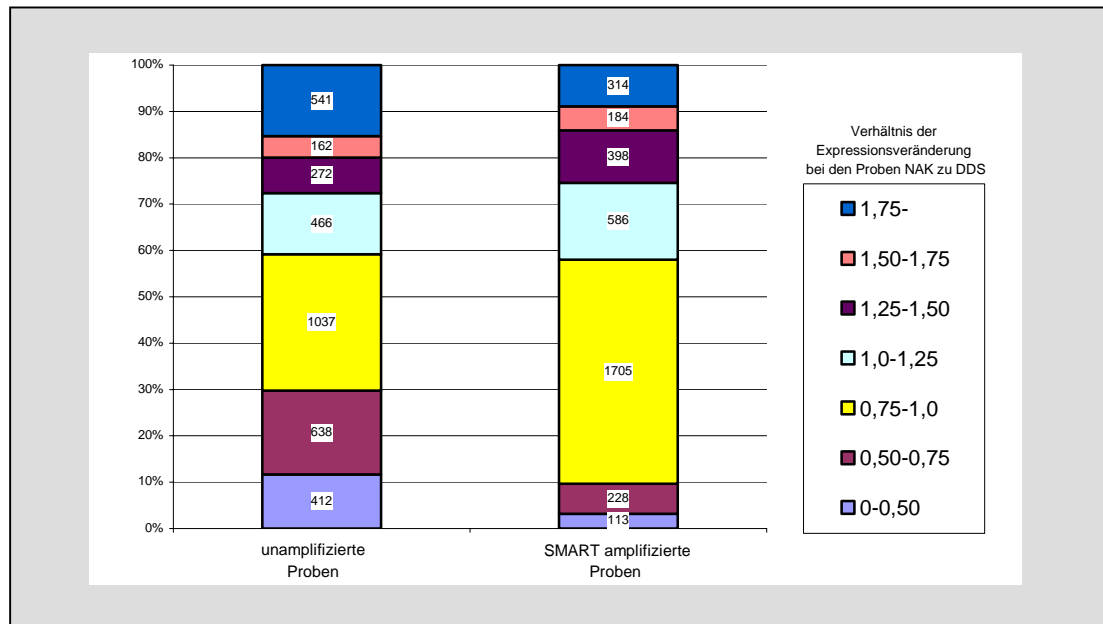


Abb. 5.19: Vergleich der differentiellen Genexpressionen bei unamplifizierten und SMART-amplifizierten Proben

### 5.5.4 Array-Analysen

Für die Erstellung der Expressions-Profile aus den Kryogeweben wurde wie bei den Zellkultur-Proben das Atlas-Array-Set 3.6 (Clontech) verwendet.

Es wurden bei den DDS-Patienten jeweils 3000 Glomeruli und bei den Normalkontrollen 1200 Glomeruli mikrodisektiert. Die daraus extrahierte Gesamt-mRNA-Menge lag bei allen Proben unter 100ng, so dass die cDNA amplifiziert werden musste. Für die Hybridisierung jedes Filters wurden 600ng LD-PCR-Produkt radioaktiv markiert und über Nacht inkubiert. Bei allen untersuchten Geweben wurde mindestens zweimal die Glomeruli mikrodisektiert und daraus RNA extrahiert. Von der RNA wurde in drei getrennten Ansätzen die cDNA synthetisiert, anschließend gepoolt und in vier getrennte LD-PCR-Reaktionen eingesetzt, die auch wieder gepoolt wurden. Die amplifizierte cDNA wurde mit zwei verschiedenen Atlas-Array-Sets 3.6 hybridisiert und jeweils zu zwei Zeitpunkten die radioaktive Signalstärke bestimmt, die anschließend gemittelt wurde.

In Abb. 5.13 wurde bereits das Beispiel einer Array-Analyse dargestellt. Die genaue Quantifizierung der radioaktiven Signale bei den Expressionsdaten der Glomeruli erfolgte analog zu den Zellkultur-Proben mittels der AIDA-Image-Analysis-Software.

Die Expressionsdaten der mikrodisektierten Glomeruli sind in Kapitel 5.6 zusammen mit den Zellkulturdaten dargestellt, um einen besseren Überblick der Expressionswerte zu haben und mögliche Fehler durch die SMART-Methode oder die in-vitro Bedingungen der Zellkultur besser erkennen zu können.

## 5.6 Vergleich der Expressionsprofile

Um differentiell exprimierte Gene zu finden wurden die Expressionsprofile der Normalkontrollen und der DDS-Patienten aus Podozyten-Zellkulturen und Glomeruli aus Gefrierewebe miteinander verglichen. Insgesamt konnten die in Tab. 5.10 aufgeführten Expressionsprofile mittels des Atlas-Array-Sets 3.6 erstellt werden.

Tab.5.10: Übersicht der erstellten Expressionsprofile

Expressions-Profile	Kryogewebe							Zellkultur	
	NAK1	NAK6	NAK7	NAK8	NAK9	DDS1	DDS3	NAK11	DDS1
unamplifiziert								ja	ja
SMART-Amplifikation	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja

Zu beachten sind einige Unterschiede bei der Erstellung der Expressionsprofile je nach verwendetem Probenmaterial.

- Die extrahierte RNA aus Kryogewebe wurde aus kompletten Glomeruli gewonnen und über die SMART-Methode amplifiziert.
- Die Podozyten in der Zellkultur unterliegen artifiziellen Wachstumsbedingungen, die die Expression einzelner Gene und ganzer Gengruppen verändern kann.

Die durchgeführten Clusteranalysen dienten dazu, Gene mit ähnlichen Expressionsmustern einander zuzuordnen. In der Abb. 5.19 ist ein Teil der Expressionsdaten, die aus den Glomeruli der Kryogewebe erstellt wurden, dargestellt.

Um die großen Datenmengen systematisch zu analysieren wurden folgende Gruppierungen vorgenommen:

- Gene mit starken Tendenzen zur differentiellen Expression
- Gene, die glomeruläre Basalmembran- und Transmembranproteine kodieren
- Gene, die Proteine der Podozytenfußfortsätze kodieren
- Putative WT1-Targetgene
- Gene, die in der Nierendatenbank beschrieben wurden

### 5.6.1 Gene mit starken Tendenzen zur differentiellen Expression

Beim Vergleich der Expressionsprofile (Abb. 5.20) mittels der Clusteranalyse (Eisen et al., 1998) konnten die Gene zwei Gruppen, aufgrund einer guten Homogenität innerhalb der Gruppen und einer guten Abgrenzbarkeit zueinander, zugeordnet werden.

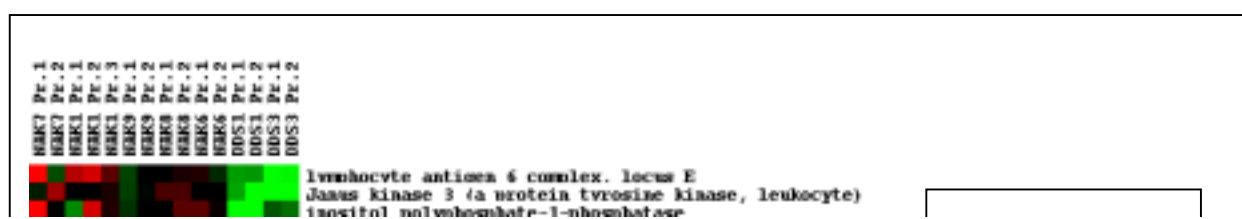


Abb. 5.20: Ausschnitt der geclusterten Expressionsprofile aus Kryogewebe. In den 11 linken Spalten befinden sich die Normalkontrollen (NAK), in den vier rechten Spalten sind die DDS-Patienten aufgeführt. Rote Farbe bedeutet eine starke Expression, mittlere Expression ist durch schwarz dargestellt, Kästchen in grün stehen für eine geringe Expression. Je intensiver die Farben sind, desto stärker ist die Tendenz der Expression in eine Richtung.

Dieser Ausschnitt stellt jedoch nur einen ganz kleinen Bereich dar, letztendlich müssen alle Daten durchgesehen werden.

In der oberen Gruppe finden sich Gene, deren Expression in den Glomeruli von Normalgeweben überwiegend stärker (rote Kästchen) als in den Glomeruli der DDS-Patienten war. In der unteren Gruppe finden sich die Gene, die in den Glomeruli der DDS-Patienten stärker exprimiert wurden.

Die Daten der Gene, die im Ausschnitt der Clusteranalyse dargestellt sind, sind in Tab. 5.11 als Mittelwerte mit den Standardabweichungen und den Werten aus den Expressionsprofilen der Podozyten in Zellkulturen zusammengefasst.

Tab. 5.11: Expressionsdaten von den Genen, die in der Clusteranalyse (Abb. 5.20) dargestellt sind

Gennamen	NAK LCM mit SMART		DDS LCM mit SMART		Zellkultur mit SMART		Zellkultur unamplifiziert	
	Mittel NAK	Standard abw.	Mittel DDS	Standard abw.	NAK11, ZK	DDS2, ZK	NAK11, ZK	DDS1, Zk
lymphocyte antigen 6 complex, locus E	46	30	9	5	4	5	24	13
Janus kinase 3 (a protein tyrosine kinase, leukocyte)	558	271	134	80	119	151	74	62
inositol polyphosphate-1-phosphatase	38	20	14	4	4	2	5	15
protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	32	16	10	5	1	3	1	2
Ifgr4	22	15	4	2	45	3	73	8
GATA-binding protein 4	19	20	5	2	1	1	3	6
lysosomal-associated membrane protein 1	15	9	4	2	1	2	2	29
fibroblast growth factor 1 (acidic)	15	8	2	1	1	1	2	1
dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	12	7	7	1	1	1	43	38
Wilms tumor 1	10	7	2	1	1	1	1	1
cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 4	5	4	2	1	1	1	5	1
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2	3	2	11	4	1	2	7	6
matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	4	7	108	61	50	152	8	14
RAR-related orphan receptor C	28	14	81	59	35	44	3	23
skeletal muscle tropomyosin alpha subunit	17	13	42	2	97	248	115	114
similar to mouse growth/differentiation factor 7 (GDF7)	6	3	42	40	4	1	20	10
empty spiracles (Drosophila) homolog 2	4	4	28	18	1	1	1	11
putative c-Myc-responsive	4	3	21	9	10	16	15	35
elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome)	4	2	11	4	1	2	2	4
pleiotrophin (heparin binding growth factor 8)	7	6	25	13	5	2	3	1
homeo box B7	1	1	7	6	3	1	13	6
ribosomal protein S28	32	18	240	37	32	36	25	19
ribosomal protein L35	51	24	205	43	110	71	465	510
eukaryotic translation elongation factor 1 delta	48	24	160	32	30	36	82	81
POD1 / transcription factor 21	25	31	9	5	1	2	9	7
Synaptopodin	1	0	3	3	1	1	23	17

Um die Besonderheiten bei der Erstellung der Expressionsprofile (s.o.) zu berücksichtigen, wurden die Expressionsprofile der Podozyten und kompletten Glomeruli nebeneinandergestellt und zusammen betrachtet. Durch die gemeinsame Betrachtung wurde ein Schwerpunkt auf die differentielle Genexpression bei Podozyten gelegt.

Die Verhältnisse der gemessenen Expressionswerte der SMART-amplifizierten Zellkultur-Proben verhielten sich bei 12 Genen ähnlich wie die nicht amplifizierten Proben; bei sechs Genen war eine Übereinstimmung aller drei Methoden zur Bestimmung der differentiellen Expression festzustellen.

Weiterhin ließ sich feststellen, dass die Mittelwerte der Expressionswerte häufig relativ große Standardabweichungen aufwiesen. Dies zeigte sich auch in der Abb. 5.19 der Clusteranalyse: So sind die geclusterten Expressionswerte von *GATA4* relativ heterogen. Bei Betrachtung der Originalwerte der *GATA4*-Expression in den Proben spiegelt sich dies in der starken Heterogenität, die zu einer hohen Standardabweichung führt, wieder. Vier von elf Normalkontrollen exprimierten *GATA4* schwach, die anderen sieben Normalkontrollen exprimierten *GATA4* stärker.

Bei den Genen der oberen Gruppe mit einer höheren Expression in den Normalkontrollen (*Lymphocyte Antigen 6*, *Janus Kinase 3*, *Fibroblast Growth Factor 1*, *Dystroglycan 1* und *Cholinergic Receptor*) sind die Verhältnisse der Expressionswerte bei den SMART-amplifizierten LCM-Proben und den nicht amplifizierten Proben der Podozyten in Zellkultur ähnlich. Im Falle des *WT1*-Gens war eine Expression in den Podozyten nicht nachweisbar. Vier Gene wiesen beim Vergleich der Expressionsverhältnisse aus Gefriergewebe und Zellkulturpodozyten eine konträre Expression auf. Es handelt sich um *Inositol Polyphosphate-1-Phosphatase*, *Protein Tyrosine Phosphatase* und *Lysosomal-associated Membrane Protein 1*.

In der unteren Gruppe ließen sich die aus den LCM-Proben gewonnenen Expressionsdaten für die Gene *Matrix Metalloproteinase 7 (MMP7)*, *RAR-related Orphan Receptor C*, *Empty Spiracles (Drosophila) Homolog 2 (EMX2)*, *putative c-Myc-responsive-Gen* und *Elastin* mit den Expressionswerte der Podozyten in Zellkultur bestätigen.

Bei den sieben anderen Genen waren die Expressionsdaten der Podozyten in Zellkultur, *Growth Differentiation Factor7*, *Homeobox B7*, das *ribosomale Protein L35-Gen* und *Pleiotrophin* genau konträr zu den Expressionsdaten, die aus den LCM-Proben erstellt wurden. Bei den Genen *Membran-Spanning 4-Domain*, *Skeletal Muscle Tropomyosin* und *Eucaryotic Translation elongation Factor* war die Expression in den Zellkulturen NAK11 und DDS1 ungefähr gleich hoch.

Aufgeführt sind auch die Expressionsdaten für die Podozytenmarker *POD1* und *Synaptopodin*. *POD1* schien in DDS-Glomeruli und Podozyten niedriger exprimiert zu sein. Hingegen wies *Synaptopodin* in allen untersuchten Proben ungefähr gleiche Expressionsstärken auf.

Im Folgenden sind für vermeintlich differentiell exprimierte Gene die in der Literatur bereits beschriebenen Funktionen mit ihren mutmaßlichen Wirkungen aufgeführt. Die Auswahl der Gene erfolgte aufgrund erkennbarer Tendenzen zur differentiellen Expression durch eine relativ hohe

---

Homogenität innerhalb der Gruppen der Normal- und DDS-Gewebe und durch eine gute Abgrenzbarkeit der beiden Gruppen für die Gene.

**In DDS-Geweben niedriger exprimiert sind:**

*Lymphocyte Antigen 6*: Mitglied der Lymphocyte-6-Antigen-Familie, spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Zelladhäsion von Keratinozyten (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>).

*Janus Kinase 3*: Ist eine Tyrosinkinase. JAK3 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der Signaltransduktion, kann aber auch mit Mitgliedern der STAT-Familie interagieren. JAK3 wird vor allem in Immunzellen exprimiert. Mutationen im *JAK3*-Gen können zur Immundefizienz führen (Macchi et al., 1995; (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>).

*Inositol-Polyphosphate-1-Phosphatase*: Ist Teil des Phosphoinositidweges, der Moleküle liefert, die oft als Signalmoleküle dienen (z.B. Phosphatidylinositol (PI) 3,4,5 Triphosphat). Ein Substrat des Enzyms Inositol-1,4,5-Triphosphat öffnet intrazelluläre Ca-Speicher im ER (York et al., 1993; Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>, 2002).

*Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor-Gen* vom TypN (PTPRN): PTPRN kann den Zellzyklus regulieren und Proliferation, Differenzierung und onkogene Transformation von Zellen beeinflussen (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>, 2002). Ein weiterer Vertreter von *Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor-Genen* ist das in Podozyten exprimierte Glepp1 (PTPRO), für dieses Gen konnte bei der experimentellen PAN-Nephrose im Rattenmodelle eine suprimierte Expression nachgewiesen werden (Kim et al., 2002).

*GATA binding-4-protein-Gen* (Gb4P): Gb4P kann kompakte Chromatin-Strukturen entpacken und der Transkription zugänglich machen (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>, 2002).

*Lysosomal-associated Membrane Protein 1-Gen* (CD107a): CD107a hat verschiedene Funktionen, Es ist beteiligt bei zellulärer Adhäsion, inter- und intrazellulärer Signal-Transduktion und schützt die Zellen vor lysosomalem Selbstverdau (Howe et al., 1988).

*acidic Fibroblast Growth Factor 1-Gen* (aFGF1): Es konnte nachgewiesen werden, dass aFGF1 durch HSPGs in ihrer Aktivität dramatisch reduziert werden kann (Selleck et al., 2000). aFGF1 selbst kann *MMP7* hochregulieren (Udayakumar et al., 2002).

*Dystroglycan1-Gen*: Dystroglycan1 ist ein Rezeptor für Agrin und Laminin2 und ein Zelloberflächenprotein bei Podozyten (Yamada et al., 1996).

*Wilms-Tumor1-Gen*: die Funktion wurde bereits in Abschnitt 5.1.2 beschrieben.



*Cholinergic Receptor*-Gen: Cholinergic Receptor ist ein neuronaler Rezeptor (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>, 2002).

*Interleukin 1 Rezeptor*-Gen (IL1R): IL1R vermag alle drei Interleukin-Formen zu binden. Beschrieben ist, dass IL1R eine Rolle bei der Regulierung der Proliferation von Knochenmarksfibroblasten spielen könnte (Rameshwar et al., 1997).

### **In DDS-Geweben stärker exprimiert sind:**

*Protein-Tyrosin-Phosphatase-Rezeptor*-Gen vom Typ C (CD45): Die Tyrosin-Phosphatase CD45 spielt eine wichtige Rolle bei Proliferation, Differenzierung und onkogener Transformation (Justement, 2001; Issarachai et al., 2002). In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das Transmembranprotein vor allem von B-Zellen und hämatopoetischen Stammzellen während Differenzierungsprozessen exprimiert wird. Der Anstieg der Tyrosin-Phosphatase könnte stellvertretend für eine zunehmende Infiltration von B-Zellen in die Glomeruli stehen und damit ein Anzeichen für eine höhere Aktivität des Immunsystems in den DDS-Glomeruli sein.

*Membran-spanning 4-domain*-Gen: Dieses Gen wurde in der Literatur – soweit mir bekannt - noch nicht beschrieben.

*Matrix-Metalloproteinase7*-Gen (MMP7): Die MMP7 ist in den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen involviert. Das Enzym MMP7 degradiert HSPG's und spielt eine Rolle bei Wundheilungsprozessen. MMP7 kommt bei normalen physiologischen Prozessen in der Embryonalentwicklung oder bei Gewebe-Neuorganisation vor. Die MMP's werden in einer inaktiven Form sekretiert und extrazellulär durch andere Proteinasen aktiviert (Schiozawa et al., 2000; Obermüller et al., 2001).

*Skeletal Muscle Tropomyosin*-Gen: Tropomyosin ist ein Zytoskelett-Protein, das Aktin-Mikrofilamente stabilisieren kann. Tropomyosin vermag auch das Zytoskelett zu reorganisieren (Shah et al., 2001). Eine Wirkung wurde auch als Suppressor maligner Transformation beschrieben.

*Growth Differentiation Factor7* (GDF7): GDF7 wird vor allem in neuronalen Geweben exprimiert. GDF7 gehört zu den BMP-Wachstumsfaktoren (Monuki et al., 2001). Es spielt eine Rolle bei Zelldifferenzierung und Morphogenese (Settle et al., 2001).

*Empty Spiracles (Drosophila) Homolog 2*-Gen (EMX2): EMX2 wurde bereits auf Seite 93 vorgestellt.

*putative c-myc response protein*-Gen: Das „putative c-myc response protein“ wurde bei verschiedenen Tumoren nachgewiesen, die eine erhöhte Expression des Onkogens c-Myc aufwiesen. Das putative c-myc Protein ist kernlokalisiert und spielt wahrscheinlich eine Rolle

während der Proliferation der Zellen (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>, 2002).

*Elastin*: Elastin ist die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von Arterien. Es hat regulatorische Funktionen während der Arterien-Entwicklung und reguliert die Bildung der glatten Muskulatur und stabilisiert die Arterien (Li et al., 1998).

*Pleiotrophin*: Pleiotrophin spielt eine Rolle bei der epithelialen Organogenese und ist ein mesenchymaler Reifefaktor, der an der Verzweigung der Ureterknospe beteiligt ist (Sakurai et al., 2001).

*Homeobox b7*: Hox b7 ist ein DNA-bindendes Protein, das Genexpressionen während der Morphogenese und Differenzierung reguliert. Mittels EGFP (unter Hox b7-Promoter Kontrolle) konnte in einer Hox b7-mutanten Maus gezeigt werden, dass Hox b7 von der Ureterknospe bis zum reifen Glomerulus exprimiert wird (Srinivas et al., 1999). Zudem steuert Hox b7 die Rezeptor-Tyrosin-Kinase RET, die eine wichtige Funktion bei der Nephrogenese hat (de Graaf et al., 2001).

*Elongation-Factor-Gen delta (EEF1D)*: Der EEF1D enthält ein Leuzin-Zipper-Motiv, das die DNA-Bindung ermöglicht. Koletta und Mitarbeiter (Koletta et al., 1998) konnten bei Mammatumoren eine verstärkte Expression von EEF1D nachweisen. Sie postulierten, dass eine erhöhte Expression des EEF1D für eine maligne Transformation der Zellen benötigt wird. Der Elongation-Faktor ermöglicht den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus und hat deshalb onkogenes Potential. Bei in-vitro-Zellkultur-Versuchen ermöglichte die Expression des EEF1D ein Kontakt-unabhängiges Wachstum und versetzte die Zellen in die Lage, Tumoren zu bilden. Die Abschaltung des Gens machte diese Entwicklung rückgängig (Joseph et al., 2002).

*POD1-Gen*: Die Funktion wurde bereits in Abschnitt 5.1.3 beschrieben.

*Signal-Sequence-Receptor delta (TRAPD)*: TRAPD ist involviert in die Protein-Sekretion (Wang et al., 1999). Die genaue Funktion des TRAPD ist unklar. Andere Signal-Sequenz-Rezeptoren spielen eine Rolle als Teil des Signal-Erkennungs-Partikel (SRP), der in die Membran des Endoplasmatischen Reticulums integriert ist.

*Transforming-growth-factor beta 2 (TGFβ2)*: TGFβ2 ist ein multifunktionales Zytokin mit zahlreichen Zell- und Gewebe-Aktivitäten: Zellzyklus-Kontrolle, Regulierung früher Entwicklung, Differenzierung, extrazelluläre Matrixbildung, Hämatopoese, Angiogenese, Chemotaxis, Immunfunktionen und Induktion von Apoptose (Schuster et al., 2002).

*Glypican 3*: Glypican 3 gehört zu der Gruppe der HSPGs. Es ist ein integrales Zell-Oberflächen-Protein, das zur Verankerung von Zellen dient. Mutationen im Glypican 3-Gen führen zum Simpson-Golabo-Behmel-Syndrom, das zur Übergroße führt und mit einer Prädisposition für Wilms-Tumoren assoziiert ist (Pilia et al., 1996). Die Ursache liegt in der Regulation des

Wachstums mesodermaler embryonaler Gewebe; es kann auch Komplexe mit verschiedenen Wachstumsfaktoren (z.B. IGF2, TGF $\beta$ ) bilden und deren Aktivität mindern (Selleck et al., 2000).

### 5.6.2. Expressionsanalyse von Genen, die glomeruläre Basalmembran- und Transmembranproteine kodieren

In Abb. 5.21 sind die Expressionsdaten der Gene geclustert dargestellt, von denen bekannt ist, dass die Proteine eine Rolle beim Aufbau der glomerulären Basalmembran spielen. Aufzufinden sind dabei auch Gene, deren Expression bereits immunhistochemisch analysiert wurden. Es handelt sich um *Collagen IV* und *Laminin A*. Die in der IHC verwendeten Antikörper waren nicht spezifisch, sondern erkannten viele Subformen.



linken Spalten sind die Werte der NAK-Glomeruli, in den vier rechten Spalten die Werte der DDS-Glomeruli dargestellt. Rote Farbe bedeutet eine starke Expression, mittlere Expression ist durch schwarz dargestellt, Kästchen in grün stehen für eine geringe Expression. Je intensiver die Farben sind, desto stärker ist die Tendenz der Expression in eine Richtung.

Anhand der Clusteranalyse lässt sich erkennen, dass nur bei *Glypican 3* eine nahezu einheitliche Veränderung des Expressionsmusters festzustellen ist. Dieses Gen scheint in allen untersuchten DDS-Glomeruli-Proben stärker exprimiert zu sein als in den NAK-Glomeruli-Proben.

Bei Glypican 3 handelt es sich um ein extrazelluläres Heparan-Sulfat-Proteoglycan (HSPG). Glypican 3 wurde im Kapitel zuvor besprochen.

Bei allen weiteren Genen ist keine einheitliche Expressionsveränderung zu registrieren. Es fällt jedoch auf, dass die Proben NAK8 und NAK9 generell hohe Expressionswerte aufweisen.

### 5.6.3 Gene, die Proteine der Podozytenfußfortsätze kodieren

Die Gene *Synaptopodin*,  *$\alpha$ -Actinin 1* (Welsch et al., 2001), *Integrin* und das *ZO1* (Reiser et al., 2000) bilden Proteine, die wichtig für den Aufbau der Fußfortsätze des Podozyten sind. Die geclusterten Expressionsdaten sind in Abb. 5.22 mitaufgeführt. Es lässt sich jedoch keine einheitliche Expressionsveränderung erkennen. Die immunhistochemisch festgestellte verminderte Expression von Synaptopodin und Integrin  $\alpha\beta 1$  in DDS-Glomeruli konnte anhand der Array-Analysen nicht bestätigt werden.

### 5.6.4 WT1-Targetgene

In Abb. 5.22 sind die Gene geclustert abgebildet, von denen bekannt ist, dass sie durch WT1 reguliert werden (*Bcl2*, *EGFR*, *p21*, *IGF2*, *PAX2*, *PDGF $\alpha$* , *TGF $\beta$ 2* und *EGR1*) können.

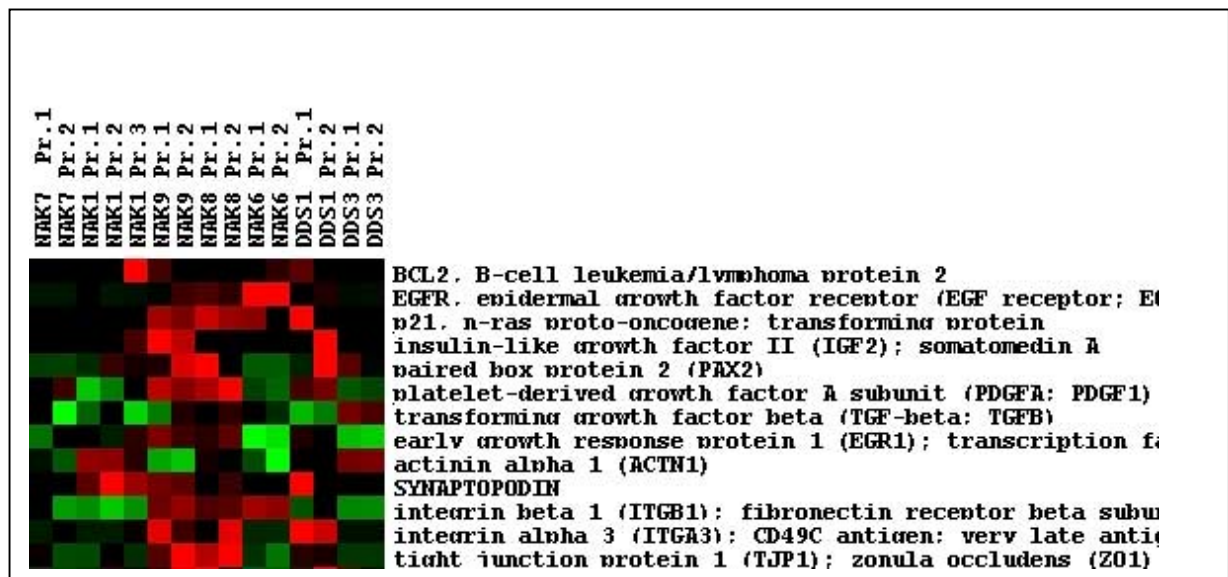


Abb. 5.22: Clusteranalyse von WT1-regulierten Genen und Genen deren Produkt eine wichtige Funktion für die Podozytenfußfortsätze hat. In den elf linken Spalten sind die Werte der NAK-Glomeruli, in den vier rechten Spalten die Werte der DDS-Glomeruli dargestellt. Rote Farbe bedeutet eine starke Expression, mittlere Expression ist schwarz dargestellt, grüne Kästchen stehen für eine geringe Expression

Die Expressionsdaten der Gene aus Abbildung 5.22 lassen in der Clusteranalyse keine einheitlichen Expressionsveränderungen erkennen.

Immunhistochemisch wurden zwei der hier aufgeführten Gene bereits untersucht. IGF2 und EGFR zeigten eine schwächere Expression in den DDS-Glomeruli, diese Befunde konnten durch die Expressionsanalyse nicht bestätigt werden. Dies dürfte unter anderem an der geringen Probenzahl liegen, eine größere Probenzahl dürfte die Standardabweichung verringern.

### 5.6.5 Gene, die in der Nierendatenbank beschrieben wurden

In Tab. 5.12 sind die Gene samt der ermittelten Expressionswerte aufgeführt, von denen aus einer Nierendatenbank (Kidney Development Database, Internet: <http://golgi.ana.ed.ac.uk/kidhome.html>) bekannt ist, dass sie zu bestimmten Zeitpunkten in der Niere, speziell im Glomerulus, exprimiert werden. Die Proteine sind dabei je nach Funktion verschiedenen Gruppen zugeordnet.

Es fällt auf, dass das Integrin  $\alpha L$ , das vor allem von Leukozyten exprimiert wird und eine zentrale Rolle bei der interzellulären Adhäsion von Leukozyten durch Interaktionen mit den Liganden ICAM 1-3 (Interzelluläre Adhäsions-Moleküle) spielt (Datenbank NCBI-LocusLink, Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>, 2002), eine hohe Expression bei den mittels SMART-Amplifizierung erstellten Expressionsprofilen aufweist. Offensichtlich wurde durch die SMART-Amplifikation diese cDNA besonders stark amplifiziert, da die gemessenen Expressionswerte der nicht amplifizierten Expressionsprofile bedeutend niedriger sind.

Zusätzlich fallen die bereits erwähnten und besprochenen Gene *Dystroglycan1*, *Hox b7* und *WT1* auf. Das schon im Abschnitt 5.4 besprochene Gen *IGFBP3* zeigt ein zu *Integrin  $\alpha L$*  konträres Verhalten in der SMART-Amplifikation; hohe Expressionswerte in der Zellkultur werden durch die SMART-Amplifikations-Methode abgeschwächt. Beide Beispiele führen noch einmal vor Augen, wie wichtig die Validierung der Array-Daten ist.

Tab.5. 12: Expressionswerte von Genen aus „Kidney Development Database“

Genname	NAK Kryogewebe amplifiziert											DDS Kryogewebe amplifiziert				Zellkultur amplifiziert		Zellkultur unamplifiziert	
	NAK7 Pr.1	NAK7 Pr.2	NAK1 Pr.1	NAK1 Pr.2	NAK1 Pr.3	NAK9 Pr.1	NAK9 Pr.2	NAK8 Pr.1	NAK8 Pr.2	NAK6 Pr.1	NAK6 Pr.2	DDS1 Pr.1	DDS1 Pr.2	DDS3 Pr.1	DDS3 Pr.2	DDS2 ZK	NAK11 ZK	DDS1 Zk	NAK11 ZK
<b>Signaling molecules, growth factors</b>																			
inhibin, beta A	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	4	9	2	3
inhibin, beta C	1	1	1	1	1	3	6	8	4	1	1	6	1	1	3	1	1	9	6
BMP 4	330	710	244	153	484	136	41	27	79	79	81	390	333	14	11	33	34	16	15
BMP 2	48	101	33	31	97	24	9	4	10	24	20	62	53	3	2	69	45	8	12
FGF7	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
FGF 13	1	3	1	2	3	4	7	7	1	6	1	4	1	1	2	2	1	12	12
neurotrophin 3	12	6	8	17	12	35	115	69	84	71	32	30	52	40	54	19	18	158	141
WNT1	2	2	9	10	4	2	5	4	2	4	1	10	5	5	6	1	1	16	9
protein phosphatase 1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
protein phosphatase 2	7	4	5	26	88	2	18	14	3	11	5	2	3	3	5	4	1	1	1

## 5 Ergebnisse

	NAK Kryogewebe amplifiziert											DDS Kryogewebe amplifiziert				Zellkultur amplifiziert DDS / NAK		Zellkultur unamplifiziert DDS / NAK	
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	3	4	27	33
BCL2-like 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	4	27	33	
HGF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
interleukin 6	5	6	8	13	2	15	24	2	5	6	6	9	6	3	1	186	33	168	62
IGF1	1	2	1	1	1	3	1	11	11	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
wingless-type MMTV	1	2	1	1	2	1	2	2	1	1	6	1	6	1	1	1	1	16	29
B-cell CLL/lymphoma 2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
calbindin 1	14	14	4	6	4	5	10	3	3	394	384	8	27	2	2	1	1	14	7
folliculin	1	3	2	2	3	5	2	3	6	1	1	5	8	8	7	1	1	3	5
VEGF	1	1	1	1	1	6	3	10	6	2	1	1	2	1	1	1	1	10	4
pleiotrophin	2	1	21	15	16	5	6	2	2	9	4	12	18	34	40	3	6	2	4
tyrosine 3-monooxygenase	4	1	1	2	1	16	71	22	7	12	2	1	1	3	1	31	11	38	29
TGF beta 1	176	70	125	176	77	99	197	175	200	175	162	55	105	298	247	86	65	7	9
glial cell derived neurotrophic factor	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	3
<b>Signal Receptors, second messenger mediators</b>																			
EphA2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	9	13
FGFR 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
activin A receptor, type II	8	1	5	1	2	3	13	6	6	6	7	2	6	2	3	1	2	6	5
activin A receptor, type IIB	1	3	2	1	2	2	8	6	5	3	1	3	10	7	10	1	1	8	5
neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	1	1	1	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
cellular retinoic acid-binding protein 1	1	1	1	1	1	2	9	5	3	2	4	1	13	1	2	1	1	1	4
cellular retinoic acid-binding protein 2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PDGFR, beta polypeptide	1	1	32	16	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
PDGFR, alpha polypeptide	7	2	1	1	1	3	5	3	2	26	19	3	4	1	1	1	1	1	2
RAR, alpha	1	2	1	3	3	14	44	28	28	3	2	1	3	42	53	1	1	8	25
RAR, beta	1	2	15	16	8	5	3	1	2	2	1	1	3	1	1	1	1	1	3
IGFBP 3	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7	1	166	2
IGFBP 5	6	2	3	2	5	3	3	7	4	1	1	9	5	1	1	1	1	10	12
IGFBP 2	57	89	6	3	22	203	109	180	150	30	32	118	133	3	3	19	18	5	8
FGFR 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
KGFR	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	5	1	1	1	1	1	2
FGFR1	143	527	14	11	21	233	119	27	100	27	33	318	131	11	11	21	22	24	14
NGFR	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
EGFR	1	1	1	1	1	1	2	2	1	4	3	1	1	1	1	3	7	4	8
Notch (Drosophila) homolog 3	1	1	1	2	1	8	8	16	9	6	7	1	1	2	4	1	1	5	2
transferrin receptor (p90, CD71)	12	90	7	9	16	2	1	1	1	2	3	1	1	1	1	13	6	3	5
RBP1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	1
v-ros avian	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	3
melatonin receptor 1A	1	1	4	9	3	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	5	4	1	3

## 5 Ergebnisse

	NAK Kryogewebe amplifiziert											DDS Kryogewebe amplifiziert				Zellkultur amplifiziert DDS / NAK		Zellkultur unamplifiziert DDS / NAK	
Transcription factors & other nuclear proteins																			
homeo box A5	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	2	9	4
homeo box B7	1	1	1	1	1	1	1	3	2	1	1	2	2	10	13	2	3	7	14
homeo box B5	3	6	13	14	25	7	1	2	2	2	1	9	2	2	2	1	2	2	3
homeo box A1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	6
homeo box homolog 1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
homeo box 11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
homeo box D3	4	7	16	15	25	30	13	6	8	1	2	11	7	6	6	11	12	11	6
homeo box D4	1	1	1	1	2	4	6	2	6	1	1	12	3	1	5	2	1	3	5
homeo box A4	3	2	1	2	2	3	7	13	2	4	5	5	8	2	1	4	4	15	9
homeo box A5	1	2	1	2	1	5	14	3	2	4	2	6	2	5	6	1	1	4	5
homeo box B6	7	1	1	2	2	6	12	6	9	23	16	6	10	13	13	4	1	7	5
hematopoietically expressed homeobox	1	1	2	1	1	2	6	8	3	2	1	3	2	1	1	1	1	1	12
homeo box A9	1	1	1	2	5	8	10	22	16	4	5	13	7	2	2	5	5	16	3
homeo box A13	1	1	1	1	2	4	7	4	2	1	2	7	3	9	8	1	1	17	5
homeo box B1	21	43	18	25	17	33	40	22	16	19	16	45	34	32	35	10	7	15	14
homeo box B13	2	1	1	1	4	3	4	5	3	2	2	6	4	1	1	1	1	7	4
homeo box C11	1	1	1	1	2	7	4	7	2	2	1	2	4	1	2	1	1	7	3
homeo box D10	1	2	4	4	4	3	4	6	5	2	1	1	1	2	2	1	1	9	4
mesenchyme homeo box 2	1	1	1	1	1	1	2	2	4	1	1	4	9	1	1	1	1	2	9
KIAA0293 protein	1	2	1	1	2	2	8	5	1	1	1	1	1	1	2	1	1	4	6
2 (SOX2)	1	5	1	2	1	1	5	7	27	2	3	1	1	1	1	1	1	4	8
SRY box 3	1	3	1	1	2	6	5	5	3	1	3	3	1	1	2	1	1	1	4
SRY box 11	1	2	1	1	2	1	3	1	1	1	3	3	3	1	4	1	1	2	5
paired box gene 2	1	1	1	2	1	2	4	8	1	1	1	1	6	2	1	1	1	6	10
POU domain, class 4	1	3	1	1	5	2	3	3	1	1	3	1	2	2	1	1	1	7	9
POU domain, class 4	8	6	5	5	10	8	7	9	2	2	2	12	1	6	7	2	1	2	5
POU domain, class 3	2	1	2	1	1	4	7	6	1	1	3	4	1	1	3	1	1	5	2
POU domain, class 6	20	11	32	31	23	49	61	20	36	77	13	7	9	30	28	5	5	68	45
transcription factor 7	1	2	2	2	5	2	6	8	2	5	2	9	4	3	2	1	2	22	10
pre-B-cell leukemia transcription factor 1	1	1	11	6	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
forkhead box G1B	2	2	2	1	3	7	4	2	2	1	1	2	9	1	2	2	1	5	1
LIM homeobox transcription factor 1, beta	1	6	1	1	2	4	4	2	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
LIM homeobox protein 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
paired box gene 2	1	1	1	2	1	2	4	8	1	1	1	1	6	2	1	1	1	6	10
hepatic nuclear factor (HNF1)	1	1	1	3	2	3	2	6	1	2	2	1	10	2	2	1	1	18	5
mesenchyme homeo box 1	12	6	35	44	36	6	11	8	12	5	9	6	15	12	11	2	1	19	16
ecotropic viral integration site 2B	2	4	2	2	2	8	6	5	4	10	3	2	5	10	9	1	1	14	8
Wilms tumor 1	14	1	4	6	1	16	18	18	15	10	12	3	4	1	1	1	1	2	1



## 5 Ergebnisse

	NAK Kryogewebe amplifiziert											DDS Kryogewebe amplifiziert				Zellkultur amplifiziert DDS / NAK		Zellkultur unamplifiziert DDS / NAK	
	1	1	2	4	2	3	5	2	5	1	1	1	3	1	1	2	1	2	2
T brachyury (mouse) homolog	1	1	2	4	2	3	5	2	5	1	1	1	3	1	1	2	1	2	2
GATA-binding protein 3	10	3	3	5	3	4	5	6	5	16	20	6	12	2	2	1	1	2	4
N-myc (and STAT) interactor	21	13	9	4	5	5	26	28	18	96	90	26	25	5	6	7	14	9	7
c-myc promoter-binding protein	3	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	4	3	1	1	1	1	1	2
v-myc	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
v-myc avian	9	51	42	17	67	33	9	7	10	4	4	12	8	2	3	21	21	109	163
v-myc avian	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
p53	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
P-cadherin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1
cadherin 11	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
ECM & receptors, Proteoglycans																			
laminin, alpha 1	1	4	1	1	1	4	9	7	4	1	1	2	6	1	2	1	1	2	2
laminin, alpha 2	2	1	1	2	2	9	9	17	12	1	3	7	1	1	1	1	1	2	3
laminin, alpha 3	1	8	1	1	2	9	15	20	4	1	1	7	10	9	9	22	12	17	6
laminin, beta 3	1	2	2	1	1	3	4	6	7	2	1	4	1	1	1	1	1	7	1
integrin, alpha 6	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
integrin, alpha 10	1	2	3	3	17	1	1	1	1	1	1	2	4	1	1	1	1	2	2
integrin, beta 5	5	12	37	22	79	8	4	3	5	2	3	14	11	1	1	4	6	1	1
integrin, alpha 4	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	2	1	4	3	2	2	7	7
integrin, beta 2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	3	8	8	1	1	1	1
integrin, alpha 2b	1	1	9	6	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
integrin, beta 6	1	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2	2	1
integrin, alpha 3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	80	84
integrin, alpha X	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
integrin, alpha E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1
integrin, beta 8	4	1	2	2	1	3	4	4	3	7	5	5	5	2	2	5	4	16	10
integrin, alpha 6	1	1	1	1	2	3	4	3	3	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1
integrin beta 4 (ITGB4)	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	21	40
integrin, alpha V	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	2	33	22
integrin, beta 3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26	10
integrin, alpha M	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
integrin, alpha L	2795	1537	2485	2485	1040	1751	2614	2863	2965	3294	3754	2804	3209	2057	1714	1800	1512	133	344
matrix metalloproteinase 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
sparc/osteonectin	9	2	1	3	3	12	21	8	13	16	21	61	24	9	10	17	16	2	2
syndecan 1	1	1	11	4	6	2	2	4	11	1	2	3	2	2	4	1	1	2	1
syndecan 2	3	3	1	2	1	17	15	8	11	2	2	6	3	6	6	2	1	3	5
nidogen 2	1	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	3	2	1	1	1	1	2	2
dystroglycan 1	5	7	19	19	6	11	22	19	13	5	7	6	8	7	8	1	2	38	43
galectin 3	8	2	1	1	2	26	44	36	33	6	8	1	5	164	139	37	20	14	5
sorting nexin 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	2	2
Cell adhesion molecules, cytoskeletal proteins																			

## 5 Ergebnisse

	NAK Kryogewebe amplifiziert											DDS Kryogewebe amplifiziert				Zellkultur amplifiziert		Zellkultur unamplifiziert	
												DDS / NAK				DDS / NAK		DDS / NAK	
gap junction protein, beta 1	1	4	24	43	23	2	5	1	3	1	4	4	5	1	1	1	1	4	2
gap junction protein, beta 2	1	2	1	1	2	3	3	2	1	1	2	6	4	3	1	1	1	15	1
ZO1 tight junction protein 1	1	1	1	1	1	2	7	4	4	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1
neural cell adhesion molecule 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
aminopeptidase puromycin sensitive	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1
FAT tumor suppressor	1	1	3	5	12	7	5	3	2	1	1	3	1	1	1	3	2	2	4
junction plakoglobin	4	1	1	2	2	3	3	1	2	9	9	1	3	1	1	3	4	35	43
desmoglein 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1
E-cadherin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
synaptopodin	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	7	1	1	1	1	1	18	23
neurofilament	2	2	4	3	2	2	7	6	9	2	1	8	3	1	2	4	1	2	5
GCDNF	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	2	3
protein phosphatase 2	7	4	5	26	88	2	18	14	3	11	5	2	3	3	5	4	1	1	1
CFTCR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
matrix metalloproteinase 2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
kallikrein 7	7	13	8	14	11	11	14	12	9	10	11	9	9	9	7	1	1	1	1
kallikrein 8	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
clusterin	5	1	2	4	2	2	4	1	1	4	2	7	2	7	8	1	1	2	3
acid phosphatase 2	6	1	1	1	1	2	9	9	3	7	7	2	6	4	8	4	2	22	2
polycystic kidney disease 1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	4	4
prion protein (p27-30)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	21	46
galactosidase, beta 1	6	1	3	3	1	17	17	6	10	9	21	19	16	12	13	16	12	8	3
galactosidase, alpha	2	1	1	1	1	22	39	21	17	1	1	6	1	40	42	5	8	25	2
ATPase, Na+/K+ transporting	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6	4	2	3
ATPase alpha 1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3
glutathione S-transferase pi	2	2	3	6	3	66	42	50	38	13	7	6	7	148	196	645	554	1109	875
glutathione S-transferase theta 1	1	3	11	14	29	29	23	10	11	3	3	5	2	4	4	7	10	13	26
glutathione S-transferase M4	2	1	1	1	2	19	14	12	11	8	4	3	2	7	8	7	5	22	9
trehalase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1
uromodulin	2	1	1	1	1	169	400	35	47	321	171	1	1	1	1	1	1	7	1
<b>Carbohydrate marker</b>																			
sialyltransferase 8	34	6	8	10	11	6	16	4	4	14	2	12	21	8	7	1	1	5	6
sialyltransferase 8	1	2	2	1	1	1	7	5	5	1	1	7	4	2	1	1	1	2	4
fucosyltransferase 1	2	2	1	1	2	3	13	8	4	3	3	4	4	3	2	2	2	6	10
phosphatidylinositol glycan	2	1	1	1	1	12	7	2	5	1	1	2	2	1	1	4	1	9	1

## 5.7 Validierung der Expression bei differentiell exprimierten Genen

Zur Validierung differentieller Genexpressionsergebnisse, die anhand von cDNA-Arrays gewonnen wurden, standen drei Methoden zur Auswahl. Die semiquantitative RT-PCR-Methode sollte die Expression auf der Ebene des Transkriptoms untersuchen. Die immunhistochemische-Analyse wie auch die Western-Blot-Analyse sollten eventuelle Expressionsunterschiede auf der Ebene des Proteoms darstellen. Aus zeitlichen Gründen konnte eine Validierung nur exemplarisch an vier Genen erfolgen. Wichtig war es hierbei zu untersuchen, wie verlässlich die SMART-Daten sind.

### 5.7.1 Auswahl der zu verifizierenden exprimierten Gene

Erst wenn die Expressionsdaten von mikrodisezierten Glomeruli und die Podozytenkulturen stark übereinstimmende Expressionsveränderungen nahe legten, kamen die Gene für eine spätere Validierung der Ergebnisse in die nähere Auswahl. Dies führte dazu, dass vor allem podozytenspezifische Gene angesehen wurden.

Exemplarisch verifiziert wurden die vier Gene: die *Matrix-Metalloproteinase7*, *POD1*, *Synaptopodin* und *WT1*.

Die cDNA-Expressionstendenzen der vier Gene aus den Array-Analysen sind in Tab. 5.13 dargestellt.

Tab.5.13: Tendenzen differentieller Genexpressionen

Gene	Expression in DDS im Vergleich zu NAK bei Glomeruli SMART	Expression in DDS-Podozyten im Vergleich zu NAK-Zellen SMART	Expression in DDS-Podozyten im Vergleich zu NAK-Zellen unamplifiziert
MMP7	↑	↑	↑
Synaptopodin	≈	≈	≈
POD1	↓	≈	↓
WT1	↓	≈	≈

↑: stärkere Expression; ↓: schwächere Expression; ≈ gleichstarke Expression

Die Expression der betroffenen Gene sollten auf cDNA- und Protein-Ebene über eine semiquantitative RT-PCR sowie über immunohistochemische- und Western-Blot-Analysen untersucht werden.

Weil bei den Array-Analysen von *Synaptopodin* keine differentielle Expression zwischen Glomeruli erkrankter und gesunder Personen zu sehen war, jedoch bei den IHC-Untersuchungen, sollte auch die Expression von *Synaptopodin* verifiziert werden.

Bei WT1 konnte in der IHC kein Unterschied zwischen DDS und Normal-Gewebe beobachtet werden. Der Vergleich der Expressionsanalysen zeigte hingegen eine differentielle Expression.

### 5.7.2 Bestätigung veränderter Genexpressionen mittels semiquantitativer RT-PCR-Methode

Die semiquantitative RT-PCR-Methode wurde an den RNA-Extrakten der Podozyten (Zellkultur DDS1 und NAK11) sowie an den RNA-Extrakten von lasermikrodissektierten kompletten Glomeruli durchgeführt. Zusätzlich zu den bereits für die Array-Analysen verwendeten Normalkontrollen NAK1, 6-9 und den Patienten DDS1 und 3 wurde noch der Patient DDS9 untersucht. Es wurde für die cDNA-Synthese jeweils die RNA von circa 600 Glomeruli bei Normalkontrollen und von 1500 Glomeruli bei DDS-Patienten verwendet. Bei Zellkultur-Podozyten wurde für die cDNA-Synthese je 50ng total RNA eingesetzt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden direkt die verschiedenen PCRs durchgeführt. Dazu wurde jeweils ein Achtel des cDNA-Ansatzes auf die PCR-Reaktionen verteilt. Die RT-PCR-Reaktionen wurden, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt.

Es wurde zusätzlich zu den Genen *WT1*, *MMP7*, *POD1* und *Synaptopodin* auch die Expression von *GAPDH* untersucht, um jeder Probe einen eigenen Standard zuweisen zu können. Für die Normalisierung der cDNA-Expressionswerte wurde die GAPDH-Expression gleich 100% und die anderen Werte dazu ins Verhältnis gesetzt. Die Auswertung der Ethidiumbromid-Agarosegele (Abb. 5.23) erfolgte mit einem Phosphorimager; die Quantifizierung der PCR-Produkte wurde mit der AIDA-Biopackage-Software durchgeführt.

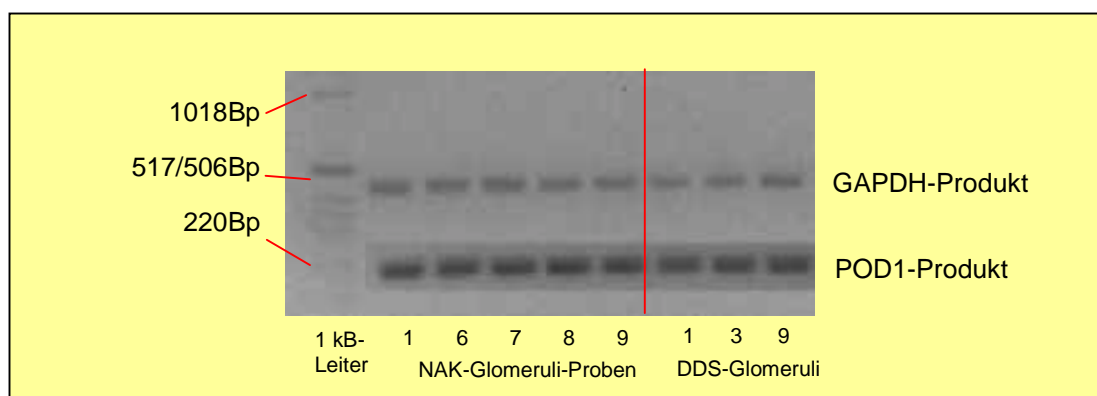


Abb. 5.23: Mittels 1%igem Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) wurden die RT-PCR-Produkte von GAPDH (je 3 $\mu$ l) und POD1 (je 10 $\mu$ l), das durch digitale Bildbearbeitung nachträglich eingefügt wurde, aufgetrennt. Aufgetragen wurde ganz links der Größenmarker (5 $\mu$ l), es folgen dann die fünf Proben aus den NAK-Kryogewebe und die drei Proben aus den DDS-Kryogewebe.

In der Abbildung 5.24 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der durchgeführten semiquantitativen RT-PCR-Analysen für NAK-Kryogewebe, DDS-Kryogewebe und die beiden

Zellkulturen dargestellt. Standardabweichungen konnten nur für die Proben aus den Kryogeweben berechnet werden.

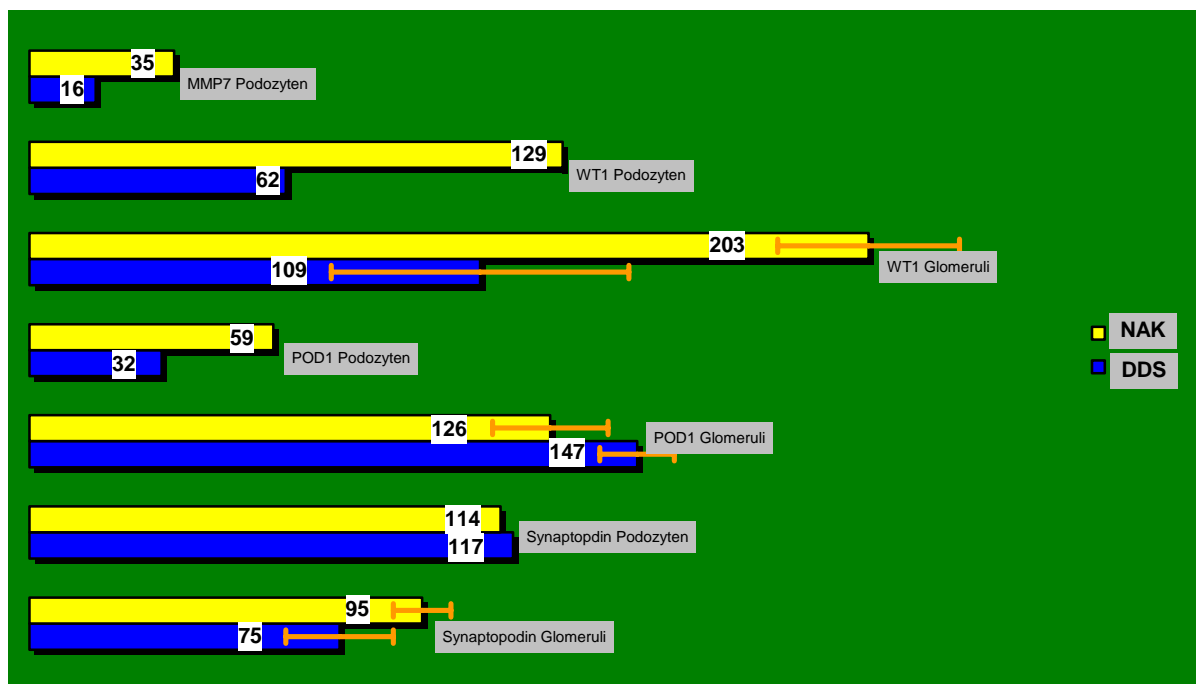


Abb. 5.24: In dem Balken-Diagramm sind die verschiedenen untersuchten Probengruppen dargestellt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und, falls möglich, die dazugehörige Standardabweichung eingezeichnet.

Beim *Synaptopodin*-Gen ist trotz der hohen Expression in den Glomeruli der Normalkontrollen (gelb), die Standardabweichung so groß, dass die zwei Gruppen nicht voneinander abgrenzbar sind. In den Podozyten ist die Expression der *Synaptopodin* cDNA gleich stark. Dies bestätigt die Ergebnisse der Array-Analyse, dass keine differentielle cDNA-Expression messbar ist.

Uneinheitlich stellt sich die gemessene cDNA Expression von *POD1* dar. In den Glomeruli ist eine ungefähr gleichstarke Expression nachweisbar. In den DDS-Podozyten ist die Expression dagegen deutlich schwächer als in den normalen Podozyten. Der Grund für die ungleiche Quantifizierung von *POD1* könnte darin liegen, dass auch Parietalzellen *POD1* exprimieren. Diese Durchmischung verschiedener Zelltypen bei den Glomeruli könnte zu den gemessenen Expressionsunterschieden zwischen den Podozyten und den Glomeruli geführt haben. Diese Vermutung wird dadurch bestärkt, dass *POD1* in den Zellkultur-Proben schwächer exprimiert wird.

Sowohl bei den Glomeruli als auch bei den Podozyten ist die *WT1*-Expression in den DDS-Proben um circa die Hälfte reduziert. Zwar ist die Standardabweichung bei den Proben aus Kryogewebe hoch, aber beide Gruppen sind klar abgrenzbar. Die Ergebnisse unterstützen die gemessenen Expressionsveränderungen in den Array-Analysen bei den Proben der SMART-amplifizierten Glomeruli.

Die cDNA-Expression konnte für das *MMP7*-Gen nur bei den Podozyten in Zellkultur gemessen werden. Die Daten der beiden Proben aus der Zellkultur zeigen bei den DDS-Podozyten eine um die Hälfte reduzierte Expression und stehen somit im Widerspruch zu den Array-Analysen

### 5.7.3 Bestätigung veränderter Genexpressionen mittels immunhistochemischer Analysen an Kryo- und Paraffinschnitten

Mittels der Immunhistochemie kann die Expression und Lokalisation von Proteinen nachgewiesen werden. Es ließen sich jedoch nur größere Expressionsunterschiede erkennen, da keine Verfahren zur Quantifizierung zur Verfügung standen und die Unterschiede optisch abgeschätzt werden mussten.

Die immunhistochemischen Analysen konnten mit Antikörpern gegen *MMP7*, *WT1* und Synaptopodin an DDS- und NAK-Paraffinschnitten durchgeführt werden. Gegen das *POD1*-Antigen stand kein geeigneter Antikörper zur Verfügung. Das Ziel dieser IHC-Analysen war festzustellen, ob bei den untersuchten Genen mit Expressionsveränderungen auf cDNA-Ebene diese auch auf Protein-Ebene detektiert werden können. Es ist bekannt, dass es sehr häufig zu Unterschieden in der Höhe der cDNA- und der Protein-Expressionen im selben Gewebe kommt (Spirin et al., 1999).

Augenscheinlich werden diese Unterschiede bei der Betrachtung der Synaptopodin-Expression in den Paraffin- und Kryogeweben (Abb. 5.8). Während bei den cDNA-Analysen keine differentielle Expression festgestellt werden konnte, war in den NAK-Glomeruli immunhistochemisch eine bedeutend stärkere Synaptopodin-Expression zu detektieren als bei den DDS-Glomeruli.

Auch das *WT1*-Protein wurde schon bei der Charakterisierung der Glomeruli immunhistochemisch analysiert (Abb. 5.6). Beim Vergleich der NAK- und DDS-Glomeruli konnte jedoch der gemessene cDNA-Expressionsunterschied nicht bei den IHC-Analysen nachgewiesen werden, da er wohl unter der wahrnehmbaren Nachweisgrenze lag.

In Abb. 5.25 sind die IHC-Analysen für das *MMP7*-Protein bei NAK- und DDS-Glomeruli dargestellt. Die Untersuchungen zeigen eine intensivere Braunfärbung in den Zellkernen als auch in der extrazellulären Matrix der Normalgewebe. In den Zellen wird die inaktive Form des Enzyms, das Zymogen und außerhalb der Zellen das aktivierte Enzym nachgewiesen; beide Formen werden vom Antikörper erkannt.

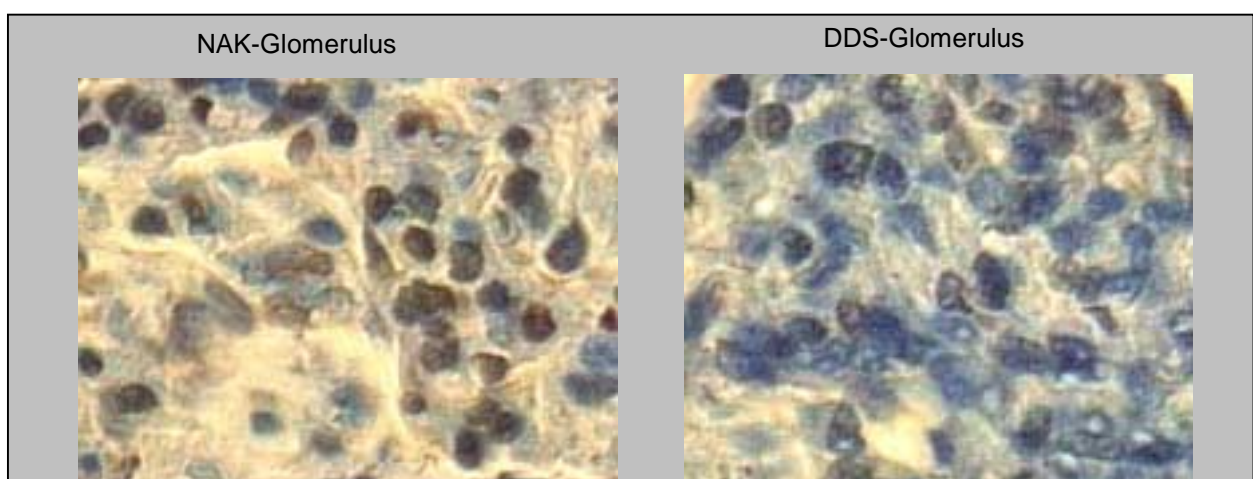


Abb. 5.25: Immunhistochemische Untersuchung des MMP7-Antigens bei NAK- und DDS-Glomeruli. Die Fotos wurden mit 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Hämatoxylin-Blaufärbung zeigt die Zellkerne, die Braunfärbung weist die untersuchten Proteine nach.

#### **5.7.4 Bestätigung veränderter Genexpressionen mittels Western-Blot-Analyse**

Die Western-Blot-Analyse ermöglicht eine Quantifizierung der Proteinexpression im Verhältnis zu einem Standard. Als Standard wurde das Housekeeping-Gen  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Für die Western-Blot-Analyse wurde ein Protein-Extrakt hergestellt und mittels Poly-Acrylamid-Gelelektrophorese dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Durch die Blotting-Technik wurden die Proteine auf einer Membran immobilisiert und anschließend durch spezifische Antikörper detektiert. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des SuperSignal-West-Femto-Kits (Pierce). Die Detektion der Chemolumineszenz-Signale geschah über Röntgenfilme. Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch die Biopackage-Software der Fa. Raytest.

Es wurden je 30 $\mu$ g Proteinextrakt aus den Zellkulturen DDS1 und NAK11 verwendet. Durch die Laser-Capture-Microdissektions-Technik wurden weiterhin aus Kryoschnitten der Gewebe NAK7 und NAK8 1200 Glomeruli und aus den Geweben DDS1 und DDS2 3000 Glomeruli isoliert und Proteinextrakte erstellt. Die Gesamt-Proteinmenge der mittels LCM extrahierten Glomeruli lag bei allen Proben um 5 $\mu$ g.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Quantifizierung von WT1 mit verschiedenen WT1-Antikörpern, WT1 (C-19) und WT1 (N-180) und  $\alpha$ -Tubulin, durchgeführt. Die WT1-Antikörper erkennen verschiedene Epitope des WT1-Proteins; der N-180 Antikörper erkennt eine Aminosäure-Sequenz am aminoterminalen-Ende, der C-19 Antikörper erkennt eine AS-Sequenz am carboxyterminalen-Ende des WT1-Proteins. Das vorhandene Probenmaterial reichte jedoch nicht für weitere Untersuchungen an MMP7 und Synaptopodin aus.

Lediglich bei den Proteinextrakten aus den Zellkultur-Podozyten waren Signale zu detektieren. Die mittels LCM extrahierten Proteinmengen aus den Kryogeweben lagen offensichtlich unter der Nachweisgrenze. In Abb. 5.26 ist das Ergebnis des Tubulin- und der WT1-Nachweise erkennbar. Unter Einbeziehung des mitgeführten Größenmarkers, konnten die Signale Tubulin (50kDa) und

WT1 (46 und 49kDa) zugewiesen werden. Es lässt sich erkennen, dass die Tubulin-Proteinmenge in der Probe DDS1 höher war als in der Probe NAK11.



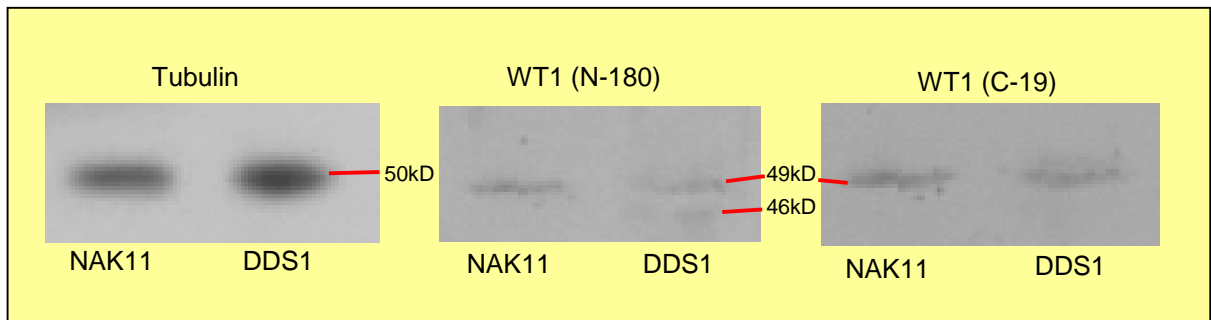


Abb. 5.26: Nachweis von Proteinen mittels spezieller Antikörper in western blot-Analyse. Es handelt sich bei allen Untersuchungen um dieselbe Nitrocellulose-Membran, die mehrfach verwendet wurde. Aufgetragen wurde bei beiden Proben je 30µg Protein-Extrakt aus der Zellkultur. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte über Röntgenfilm.

Mittels beider WT1-Antikörper konnten in den Proben Signale in der Größenordnung von 49kDa detektiert werden. Der Nachweis des WT1-Proteins zeigte vor allem die 49kDa-Bande. Die 46kDa-Bande der alternativen Isoform war nur schwach in der DDS-Probe mit dem Antikörper WT1 (N-180) nachzuweisen. Beim Nachweis des WT1-Proteins zeigte sich jeweils in der Probe NAK11 ein stärkeres Signal, obwohl das Tubulin-Signal schwächer war, das heißt, es wurde verhältnismäßig mehr WT1 exprimiert.

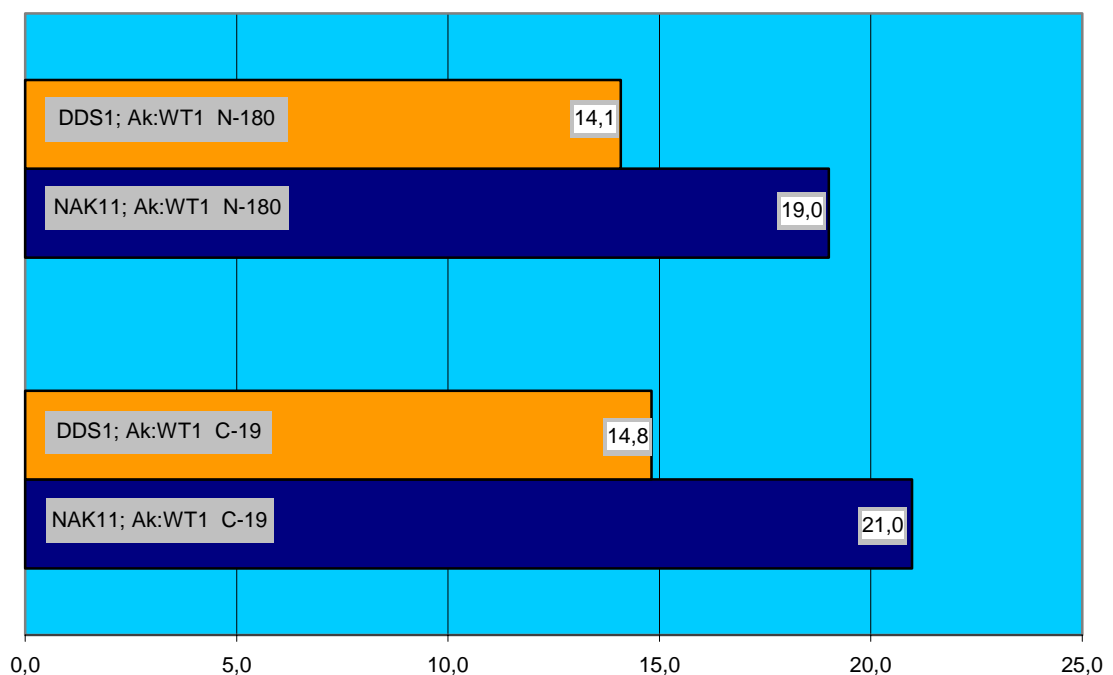


Abb. 5.27: In dem Balken-Diagramm dargestellt sind die im Verhältnis zur gemessenen Tubulin-Expression quantifizierten Werte der WT1-Proteinexpression in den Podozytenkulturen.

Die genaue Quantifizierung (Abb. 5.27) der WT1-Signale unter Einbeziehung der Tubulin-Expression ergab, dass das WT1-Protein in den DDS-Podozyten um den Faktor 0,7 schwächer exprimiert wurde.

## Synopsis

Die gemessenen Expressionsunterschiede der vier unterschiedlichen Untersuchungsmethoden sind in Tab. 5.14 für die exemplarisch ausgewählten Gene bzw. Proteine WT1, MMP7, Synaptopodin und POD1 zusammen dargestellt.

Tab. 5.14: Differentielle Expression bei DDS-Podozyten in Kultur und DDS-LCM-Glomeruli im Vergleich zu Normal-Podozyten und -Glomeruli

	cDNA Array-Analysen		Semiquantitative RT-PCR		Immunhistochemie	Western-Blot-Analyse	
	Podozyten	Glomeruli	Podozyten	Glomeruli	Glomeruli	Podozyten	Glomeruli
<b>WT1</b>	≈	↓	0,5	0,5	≈	0,7	
<b>MMP7</b>	↑	↑	0,5	-	↓		
<b>Synapto- podin</b>	≈	≈	1	1	↓		
<b>POD1</b>	≈	↓	0,5	1 ?			

-: nicht messbar; ↑: stärkere Expression; ↓: schwächere Expression; ≈: gleichstarke Expression

Für **WT1** zeigt sich sowohl auf der Ebene des Transkriptoms als auch auf der Ebene des Proteoms eine geringere Expression in DDS-Podozyten bzw. DDS-Glomeruli. Eine verminderte Expression konnte bei den Array-Analysen der Glomeruli nachgewiesen werden und in der semiquantitativen RT-PCR mit einem Faktor von 0,5 sowohl bei den DDS-Podozyten als auch bei den DDS-Glomeruli quantifiziert werden. In einer ähnlichen Größenordnung liegt das Ergebnis der Quantifizierung der Proteinmenge anhand der Western-Blot-Methode. Gemessen wurde bei den DDS-Podozyten in Zellkultur eine um den Faktor 0,7 geringere WT1-Expression. Dieser Unterschied konnte optisch nicht in der IHC-Analyse bei den Paraffin- und Kryoschnitten wahrgenommen werden. Bei einer Gesamtbetrachtung zeigt sich jedoch, dass WT1 in DDS-Podozyten schwächer exprimiert zu werden scheint.

Die cDNA Array-Analysen des **MMP7-Gens** postulierten eine erhöhte Expression bei den DDS-Glomeruli in-vivo und bei den DDS-Podozyten in Kultur. Im Gegensatz dazu zeigten die Auswertungen der semiquantitativen RT-PCR-Analyse bei den DDS-Podozyten in Kultur eine um den Faktor zwei niedrigere MMP7-Expression als bei den NAK-Podozyten. Dieses Ergebnis wurde durch die IHC-Untersuchungen bestätigt; bei den DDS-Glomeruli schien eine schwächere Expression als bei den Normalgeweben vorhanden zu sein. Überwiegend zeigten die durchgeführten Untersuchungen zu MMP7 eine verringerte Expression in DDS-Geweben. Das Ergebnis sollte durch eine Western-Blot-Untersuchung bestätigt werden.

Bei **Synaptopodin** konnte mit beiden Methoden der cDNA-Quantifizierung keine Expressionsveränderung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Immunhistochemie an Paraffin- und Kryoschnitten zeigten hingegen eine deutlich verminderte Synaptopodin-Expression in den DDS-Glomeruli.

Eine geringere **POD1**-Expression ergab sich mittels der Array-Analysen bei den Glomeruli der Kryogewebe und mittels der semiquantitativen PCR bei den Podozyten in Zellkultur. Die Ergebnisse zu POD1 deuten auf eine geringere Expression in DDS-Podozyten hin. Bisher noch nicht durchgeführte Untersuchungen zur Protein-Expression könnten die vorhandenen Ergebnisse klarer werden lassen.

## 6 Diskussion

In zahlreichen Veröffentlichungen vor Beginn der Arbeit wurde beschrieben, dass eine heterozygote Missensmutation im *Wilms-Tumor1*-Gen verantwortlich für die diffuse mesangiale Sklerose assoziiert mit dem Denys-Drash-Syndrom (DDS) ist (Pelletier et al., 1991, Smeets et al., 1996, Schumacher et al., 1998, Yang et al., 1999). Unklar war jedoch, wie diese den dramatischen Phänotyp verursacht. Es war weiterhin bereits bekannt, dass das *WT1*-Gen ein Transkriptionsfaktor ist, der verschiedene Gene in-vitro reguliert: *Bcl2*, *c-myc*, *EGR1*, *EGFR*, *IGF2*, *IGFR*, *NovH*, *PDGF $\alpha$*  und *Podocalyxin* (Palmer et al., 2001, Menke et al., 1998, Mrowka et al., 2000; Scharnhorst et al., 2001). Ob es sich dabei auch um physiologische „Targets“ handelt ist nicht bekannt. Eine Fehlregulation dieser Gene kann jedoch nicht alleine für die Ausprägung des DDS verantwortlich sein. Für einige dieser Gene vermutet man, dass sie eher an einem weiteren Charakteristikum der Erkrankung, der Wilms-Tumorentstehung beteiligt sind, aber nicht unbedingt Einfluss auf die gestörte Ausbildung der glomerulären Filtrationsbarriere in den Nieren haben.

Ein Problem ist bis heute, dass die meisten dieser Ergebnisse bei in-vitro Untersuchungen gewonnen wurden und diese aufgrund der teilweise artifiziellen Versuchsbedingungen nur begrenzt auf die humane Niere übertragen werden können.

Es wird vermutet, dass es beim DDS nicht bloß zu einem Gen-Dosis-Effekt durch den Ausfall eines der beiden *WT1*-Allele kommt - dies ist beim WAGR-Syndrom mit der Deletion eines Allels der Fall - sondern es wird angenommen, dass das Produkt des mutierten *WT1*-Gens in noch unbekannter Art und Weise Einfluss auf die Transkriptionskontrolle anderer Gene nimmt. In Frage kommen dafür zwei Mechanismen, die jedoch grundsätzlich davon ausgehen, dass ein Protein von dem mutierten *WT1*-Allel gebildet wird, was jedoch noch nicht bewiesen wurde. Dies ist aber wahrscheinlich, da eine 50% *WT1*-Dosis zum WAGR-Syndrom führt, das sich vom DDS unterscheidet.

- Das mutierte *WT1*-Protein schaltet bei der Dimerisierung mit einem Wildtyp *WT1*-Protein dessen Funktion aus, dies würde dazu führen, dass nahezu überhaupt kein Wildtyp *WT1*-Protein zur Verfügung stünde. *WT*-Knock-Out-Mäuse bilden jedoch erst gar keine Nieren (Kreidberg et al., 1993).

- Das mutierte *WT1*-Gen bildet ein Produkt, das aufgrund einer Missensmutation im Zinkfinger-Bereich nicht mehr die übliche *WT1*-Bindestelle erkennt, sondern in einem „Gain of Function“- Mechanismus eine andere Regulationssequenz bei verschiedenen, sonst nicht durch *WT1* kontrollierten Genen erfasst und nun diese steuert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Mechanismen bei der Pathogenese der *WT1*-assoziierten mesangialen Sklerose erforscht werden. Hauptziel war es deshalb Expressionsprofile von DDS-Patienten und Normalkontrollen zu erstellen und zu untersuchen, welche Gene in den Podozyten bzw. in ganzen Glomeruli bei DDS-Patienten im Vergleich zu Normalkontrollen differentiell exprimiert werden. Hierfür sollten zum einen Expressionsprofile von reinen Podozyten in Zellkultur - die nicht mit anderen Zelltypen durchmischt sind - und zum anderen Expressionsprofile aus den Glomeruli von Kryogeweben erstellt werden. Zusätzlich erfolgte mit immunhistochemischen Methoden eine Charakterisierung der Glomeruli in Kryogeweben und der Podozyten in Zellkultur.

### **6.1 Podozyten in Zellkultur**

Dem statistischen Mittel entsprechend, bestand während des dreijährigen Zeitraums dieser Arbeit nur zweimal die Möglichkeit, frisches Nierengewebe von DDS-Patienten zu erlangen. In beiden Fällen konnten, mit der freundlichen Hilfe von Prof. H. Pavenstädt, die Podozyten erfolgreich in Kultur genommen werden. Aufgrund der Proliferationsrate wurde jedoch nur mit einer DDS-Podozytenkultur gearbeitet und diese bei Versuchen verwendet. Podozyten in Kultur von Normalkontrollen (NAK) wurden von Herrn Prof. H. Pavenstädt aus Freiburg zur Verfügung gestellt.

Es zeigte sich, dass die untersuchten DDS- als auch die NAK-Zellen in Kultur podozytenspezifische Marker exprimierten. Es konnten die Proteine *WT1*, Vimentin, Vinculin und *Nephrin* nachgewiesen werden, jedoch waren keine Unterschiede in der Expressionsstärke feststellbar. Dass es sich bei den Nachweisen nicht um Fixierungsartefakte der Immunfluoreszenz-Methode handelte, konnte mit der RT-PCR-Methode für *WT1* und *Nephrin* bestätigt werden. Zusätzlich wurde die mRNA von *Synaptopodin* und *POD1*, ebenfalls zwei Podozytenmarker, detektiert. Es kann

also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen um Podozyten handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich humane DDS-Podozyten, obwohl es sich um terminal ausdifferenzierte Zellen handelt, als primäre Kulturen anlegen lassen, jedoch in Kultur sehr unterschiedliche Proliferationsbereitschaft zeigen. Es wäre also sinnvoll, zu testen, ob die Bedingungen, unter denen die Podozyten bisher in Kultur gezüchtet wurden optimal für die Proliferation sind oder ob nicht andere Kulturbedingungen für das Wachstum der Podozyten vorteilhafter wären.

Weiterhin wäre es sinnvoll, in den nächsten Jahren weitere DDS-, aber auch normale Podozyten in Kultur zu nehmen, um in-vitro Experimente bzgl. Glomeruli-spezifischer Fragestellungen nicht wie vielfach exerziert an NIH3T3-, NEK-293- oder Hela-Zellen durchführen zu müssen.

Eine Alternative um ausreichend Podozyten für in-vitro Analysen zur Verfügung zu haben wäre es die Podozyten zu immortalisieren oder zumindest die Häufigkeit der Populationsverdopplungen (PD) zu steigern. Um dies zu erreichen sollten die Podozyten mit dem *Telomerase*-Gen transfiziert werden.

### **Immortalisierung der Podozyten**

Durch Transfektion sollte das *Telomerase*-Gen stabil in das Genom der Podozyten eingebaut werden. In der Literatur ist eine wesentliche Erhöhung der PD beschrieben, da normalerweise die Zellen durch die Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden seneszent werden und sich nicht mehr teilen können (Vaziri et al., 1998; Weinrich et al., 1997; Bodnar et al., 1998). Es wird vermutet, dass es sich bei der Verkürzung der Telomerenden um eine Art mitotische Uhr handelt, die nach Ablauf keine weiteren Zellteilungen zulässt.

Nachdem eindeutig der Charakter der Zellen als Podozyten bestätigt worden war, konnten die Transfektionsexperimente an den Podozyten durchgeführt werden. Zwei Gründe führten letztendlich dazu, dass die Transfektion mit handelsüblichen Transfektionsreagenzien nicht funktionierte.

- Wie sich mit einem EGFP-WT1-Fusionsprotein-Konstrukt zeigte, lag die Transfektionseffizienz nur bei 1-2%, so dass während der Selektionsphase sehr viele Zellen starben. Da sich die Podozyten nur recht langsam teilen, kam es zu einer starken Ausdünnung in den Zellkulturschalen. Es zeigte sich jedoch, dass die Podozyten eine gewisse Nähe zueinander brauchen, um sich

zu vermehren. Wenn die Podozyten nur vereinzelt in den Zellkulturschalen vorliegen, führt dies zu einer „Ruhigstellung“ und zum Erliegen der Zellteilung, so dass auch eventuell erfolgreich transfizierte Zellen keine Klone bilden konnten.

- Der zweite Grund könnte bei dem mit knapp 14kBp recht großen Vektor zu finden sein, der eine effiziente Aufnahme durch die Podozyten erschwert haben dürfte und so wahrscheinlich zu einer noch geringeren Transfektionseffizienz geführt haben könnte.

Erfolgreich war jedoch die Transfektion mittels retroviralen Gentransfers (Saalem et al., 2002) in NAK-Podozyten, die von PD Dr. T. Benzing (Freiburg) durchgeführt wurde. Die nun vorliegenden mit dem *Telomerase*-Gen transfizierten Podozyten konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

Es wäre nun in weiteren Analysen zu überprüfen, ob es bei den Zellen durch die Transfektion zu einer Expressionsveränderung oder zu einem veränderten Phänotyp gekommen ist. Wenn sich bestätigen lassen sollte, dass sich die Podozyten weiterhin unverändert verhalten, ließen sich an diesen Zellen - mit nur geringen individuellen Schwankungen – unterschiedlichste Untersuchungen durchführen, die gut vergleichbar sind.

## **6.2 Immunhistochemische Charakterisierung von Denys-Drash-Glomeruli**

Für die Untersuchung zur Protein-Expression scheinen die in-vivo Bedingungen der Kryogewebe besser geeignet als die in-vitro Bedingungen der Podozytenkulturen, da die Zellen den „Expressionsstand des Transkriptoms und Proteoms abgespeichert“ haben, der zuletzt in dem lebenden Gewebe vorgelegen hat. Außerdem lassen sich bei der immunhistochemischen Charakterisierung der Glomeruli auch Veränderungen feststellen, die nicht nur die Podozyten betreffen.

Immunhistochemische Analysen zum Nachweis spezifischer Proteine und morphologische Analysen wurden an den Nierengeweben von acht DDS-Patienten, sieben adulten Normalkontrollen und für einen Antikörper an einer embryonalen Normalkontrolle durchgeführt.

Bei den morphologischen Untersuchungen zeigte sich, dass ein Teil der Glomeruli nur rudimentär ausgebildet war. So waren die Glomeruli im superfiziellen Cortextbereich bedeutend stärker sklerotisiert und kleiner, die weiter innen liegenden Glomeruli wiesen hingegen nur geringere Symptome auf. Es zeigte sich in aller Regel aber auch eine Verdickung der GBM und der Bowmanschen Kapsel, sowie häufig eine geringere Anzahl von Podozyten als bei den Normalkontrollen. Typisch für die Glomeruli mit diffuser mesangialer Sklerose (DMS) ist die massive Vermehrung der mesangialen Matrix bei wenig veränderter Mesangiumzellzahl, die insgesamt zu einer Oberflächenvergrößerung des Schlingenkonvoluts führt. Kriz und Mitarbeiter entwickelten 1994 (Kriz et al., 1994a) ein Konzept zur Entstehung der fokal-segmentalen-Glomerulosklerose (FSGS), was bei Anwendung auf die DMS postuliert, dass die Podozyten durch Hypertrophie versuchen die oben beschriebene Oberflächenvergrößerung auszugleichen. Bei zu großer Matrixvermehrung reicht dies jedoch nicht mehr aus. Die Podozytenfußfortsätze werden geschädigt und führen zu einer Durchlässigkeit des Schlitzdiaphragmas für Proteine.

### **Veränderungen in Podozyten und der glomerulären Basalmembran**

Einige der immunhistochemisch untersuchten Proteine (Abb. 6.1) konnten mit verschiedenen Erkrankungen der Nieren in Verbindung gebracht werden. So führen Mutationen des *Collagen IV*-Gens zum Alport-Syndrom, einer Nephropathie mit langsam fortschreitender Proteinurie bis hin zur Niereninsuffizienz im dritten Lebensjahrzehnt (Smeets et al., 1996); *Laminin*  $\beta$ 2- (Bestandteil von Laminin 11) und  *$\alpha$ -Actinin 4*-Knock-out-Mäuse entwickeln ein nephrotisches Syndrom (Groffen et al., 1999, Jalanka et al., 2001) und Mutationen im *Nephrin*-Gen (*NPHS1*) führen zum nephrotischen Syndrom des finnischen Typs (CNF) (Holthöfer et al., 1999).

Auch bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Glomeruli mit DMS konnte eine abnorme Zusammensetzung der GBM und der kontraktilen Apparate der Podozyten-Fußfortsätze nachgewiesen werden. Nachfolgend soll versucht werden, die detektierten Veränderungen in einen Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der diffusen mesangialen Sklerose zu stellen.

Die deutlich reduzierte Expression des Heparan-Sulfat-Proteoglycans (HSPG) Tenascin könnte neben weiteren HSPGs zur Reduktion der negativen Ladung der GBM führen und so die Filtrationsbarriere für Proteine durchlässig machen. Eine



ähnliche Wirkung könnte auch die generelle Verminderung von Laminin in der GBM haben. Laminine üben jedoch eher eine Art Siebfunktion in der GBM aus und haben keine Auswirkungen auf den Ladungszustand der GBM (Tryggvason et al., 2001). Proteine wie Tenascin und Laminin 11 sind in der GBM in das Netzwerk aus Collagen IV-Fasern integriert. Die bei den DDS-Glomeruli nachweisbare, nicht mehr typische dünne strichartige Anfärbung der GBM normaler Nieren durch Collagen IV (Yang et al., 2001) sondern die starke Zunahme von Collagen IV in der GBM stellt einen weiteren Anhaltspunkt für die gestörte Struktur der GBM dar. Neben dem Aufbau des Netzwerks der GBM dient Collagen IV auch den Podozyten zur Befestigung an die GBM. Die Verankerung der Podozyten an die GBM erfolgt – soweit man bisher weiß - über Integrin  $\alpha 3\beta 1$  und Dystroglycan an Collagen IV, Agrin und Laminin. Die nachgewiesene Verminderung von Integrin  $\alpha 3\beta 1$  könnte vielfältige Wirkungen auf die Podozyten haben (Abb. 6.2). Es könnte zum Ablösen der Podozyten von der GBM kommen, da die Podozyten aufgrund der reduzierten Verankerungsmöglichkeiten an die GBM dem Blutdruck nicht mehr standhalten können. Integrin  $\alpha 3\beta 1$  scheint jedoch auch die Struktur des Zytoskellets in den Fußfortsätzen mitzubestimmen. So führt wahrscheinlich die Integrin  $\alpha 3\beta 1$ -Verminderung zur Verschmelzung der Fußfortsätze der DDS-Podozyten (Smoyer et al., 1997), die bereits Habib und Mitarbeiter (Habib et al., 1993) beschrieben haben. Die Verschmelzung der Fußfortsätze könnte als Folge eine Nephtrin-Verminderung, die in der IHC detektiert wurde, haben, da Nephtrin die Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen bildet. Anhand von WT1-Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine verminderte WT1-Expression, wie sie offensichtlich bei DDS-Patienten vorliegt, zu einer Herunterregulierung des *Nephtrin*-Gens führt (Guo et al., 2002). Folglich wäre es auch möglich, dass die verminderte WT1-Expression in den DDS-Podozyten zu einer Verminderung von Nephtrin und damit den Schlitzmembranen zwischen den Fußfortsätzen führt.

Bisher wurde vermutet, dass es sich bei der Verschmelzung bzw. der nicht-Ausbildung der Fußfortsätze ausschließlich um einen sekundären Effekt infolge der Loslösung der Fußfortsätze von der GBM handelt wie es von Kriz und Mitarbeitern (Kriz et al., 1994a) für die fokal-segmentale Glomerulosklerose postuliert wurde. Die Verminderung von Integrin  $\alpha 3\beta 1$  und Nephtrin mit den beschriebenen Folgen spräche jedoch dafür, dass dieser Effekt beim DDS auch primär stattfinden könnte.

Zusätzlich zu den Schlitzdiaphragmen für die Filtration des Primärharns besitzen die Fußfortsätze kontraktile Apparate, die es ihnen erlauben, dem Blutdruck in den Kapillaren der Glomeruli standzuhalten. Eine verminderte Detektion von  $\alpha$ -Actinin, das der Quervernetzung der Aktinfilamente dient, aber auch zusammen mit den ebenfalls verringert nachgewiesenen Utrophin und Talin am Aufbau des kontraktilen Apparates beteiligt ist, wurde in der IHC festgestellt. Die infolge der Funktionsverminderung der kontraktilen Apparate nachlassende Fähigkeit des Podozyten, dem Blutdruck standzuhalten, wäre eine weitere Möglichkeit, wie es zum Ablösen des Podozyten von der GBM kommen könnte. Dies würde jedoch nicht die reduzierte Nachweisbarkeit von Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  erklären. Möglich wäre jedoch, dass verschiedene Mechanismen ineinander greifen.

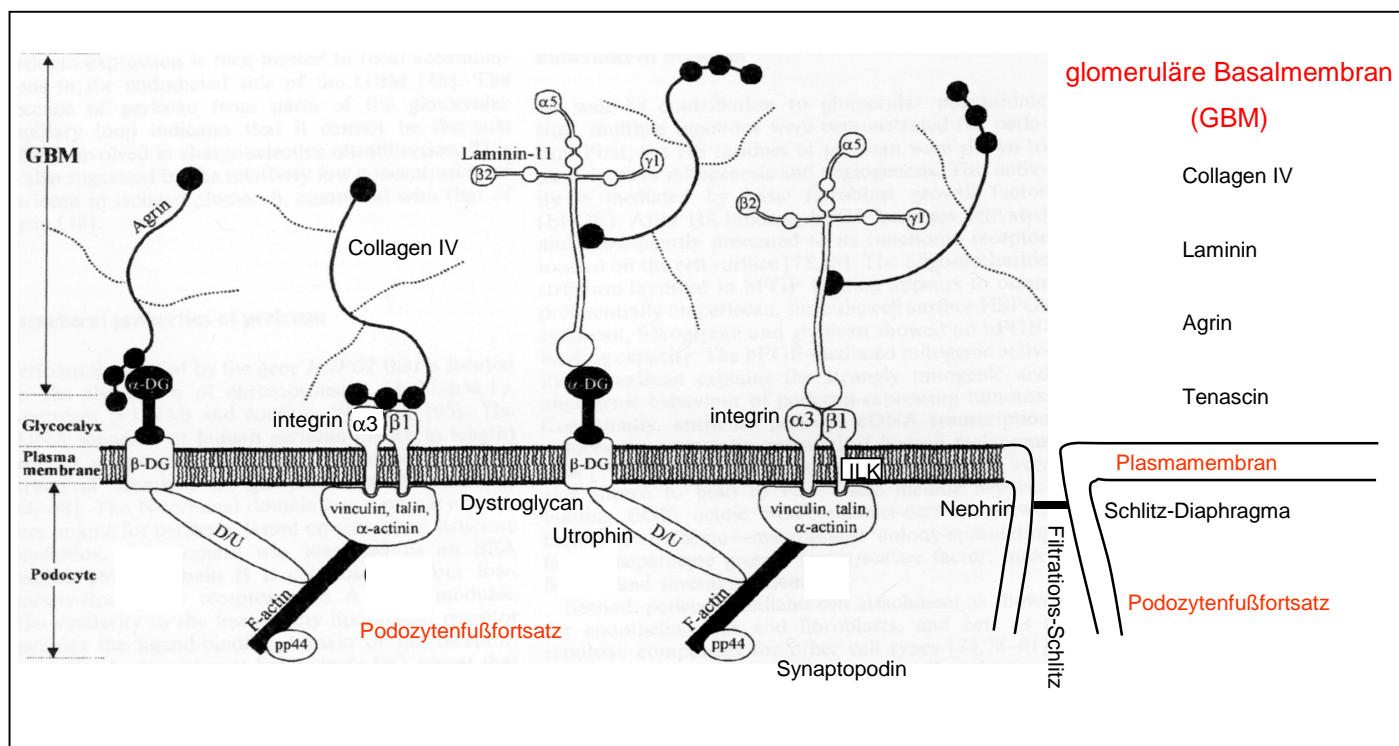


Abb. 6.1: Schematische Darstellung der GBM an den Fußfortsätzen eines Podozyten. Die Grundstruktur des linken Teils der Abbildung wurde übernommen aus: Groffen et al., 1999. Ergänzt wurde das Schaubild durch Ergebnisse, die in der Diskussion aufgeführt sind.

Für die Regulierung der Integrin  $\alpha 3 \beta 1$ -Bindung an Collagen IV ist auch die Integrin-linked-Kinase (ILK) wichtig, die im aktiven Zustand ein Ablösen der Fußfortsätze initiieren kann (Kretzler et al., 2001a). Die Aktivierung der ILK kann durch Phosphatidylinositol (PI) 3,4,5-Triphosphat erfolgen (Wu et al., 2001). Die Konzentration von PI 3,4,5-triphosphat wurde zwar nicht bestimmt, in den Array-

Analysen fiel allerdings eine Expressionsverminderung der Inositol-Polyphosphat-1-Phosphatase in den DDS-Glomeruli auf, die Teil des Phosphoinositidweges ist, der PI 3,4,5-Triphosphat bildet und abbaut. Es könnte folglich sein, dass eine verminderte Expression der Inositol-Polyphosphat-1-Phosphatase zu einem verlangsamten Abbau von PI 3,4,5-triphosphat führt und es somit zu einer reduzierten Bindung der Fußfortsätze über Integrin  $\alpha3\beta1$  an die GBM kommt.

Die beschriebene Verschmelzung der Fußfortsätze könnte mit einem Rearrangement des Zytoskeletts einhergehen, um sich den veränderten Strukturen der Podozyten anzupassen. Bestätigt wird dies dadurch, dass immunhistochemisch in DDS-Glomeruli eine verringerte Synaptopodinexpression (Abb. 5.8) detektiert wurde. Mundel und Mitarbeiter (Mundel et al., 1997) beobachteten bei Mauspodozyten, dass eine Umstrukturierung des Zytoskeletts in den Fußfortsätzen mit einer verringerten Synaptopodin-Expression einhergeht.

Bei Vimentin einem Intermediärfilamentprotein, das vor allem in den primären Fortsätzen der Podozyten lokalisiert sein sollte (Kobayashi et al., 2001) war jedoch immunhistochemisch keine Veränderung in den DDS-Glomeruli festzustellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Umstrukturierung des Zytoskeletts vor allem die Fußfortsätze und nicht die primären Fortsätze der Podozyten betrifft. Die Ursache der Veränderungen des Zytoskeletts könnte in der suprimierten *Integrin  $\alpha3\beta1$* -Expression liegen. Wang und Mitarbeiter (Wang et al., 1999) beschrieben, dass bei Versuchen an epithelialen Zellen in Kultur *Integrin  $\alpha3\beta1$* -defiziente Zellen eine abnormale Zytoskelett-Struktur aufwiesen. Auch die Podozyten von *Integrin  $\alpha3\beta1$* -Knock-Out-Mäusen waren nicht in der Lage Fußfortsätze zu bilden. Kreidberg und Mitarbeiter (Kreidberg et al., 1996b) beschrieben eine Desorganisation der GBM. Übertragen auf die Podozyten könnte dies bedeuten, dass die verminderte *Integrin  $\alpha3\beta1$* -Expression eine entscheidende Rolle an der Ausbildung des Krankheitsbildes der DMS haben könnte. Sowohl die Veränderung des Zytoskeletts mit der gestörten Ausbildung der Fußfortsätze und den fehlenden Schlitzmembranen, als auch das abnormale Erscheinungsbild der GBM könnten mit der verminderten *Integrin  $\alpha3\beta1$* -Expression in Zusammenhang gebracht werden. Möglich wäre eine direkte oder indirekte Regulation der *Integrin  $\alpha3$* - und  *$\beta1$* -Gene durch WT1, dies wurde jedoch - soweit mir bekannt - noch nicht beschrieben.

Um diese theoretischen Zusammenhänge, die in Abb. 6.2 zusammengefaßt sind, experimentell zu betrachten, wären weitergehende Untersuchungen zur Regulation und Expression von *Integrin  $\alpha3$*  und *Integrin  $\beta1$*  äußerst sinnvoll.

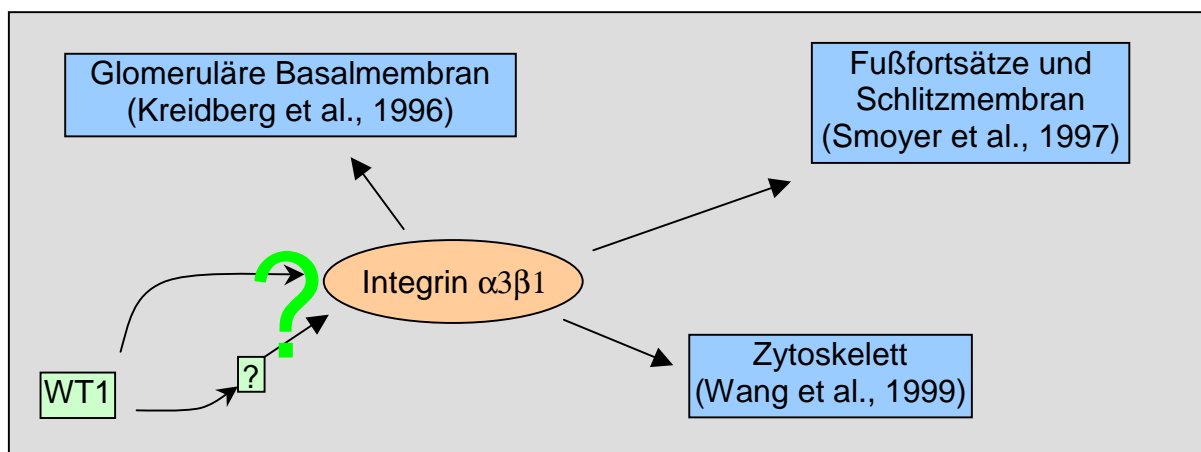


Abb. 6.2: Wirkungen von Integrin  $\alpha3\beta1$

Auch die immunhistochemische Untersuchung weiterer, das Zytoskelett bildender Intermediärfilamentproteine wie z.B. Ezrin könnte die Funktion von Integrin  $\alpha3\beta1$  deutlicher werden lassen. Ezrin spielt eine Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts der primären Fortsätze und des Hauptkörpers der Podozyten (Hugo et al., 1998).

### WT1-Zielgene

Im Gegensatz zu *Integrin  $\alpha3\beta1$*  ist für einige andere Gene mittlerweile bekannt, dass ihre Promotoren von WT1 reguliert werden (Menke et al., 1998; Scharnhorst et al., 2001). Eine veränderte Expression von *WT1* in Form eines mutierten Proteins und der verminderte Expression des Wildtyp-Allels könnte zu veränderten Expressionsleveln dieser Zielgene führen.

Zur Aufklärung der Veränderungen bei DMS wurde die Expression der WT1-Target-Gene *Bcl2* (positiv reguliert), *IGF2*, *NovH* und *EGFR* (negativ reguliert) mit immunhistochemischen Analysen untersucht.

- *IGF2* stimuliert normalerweise die Expression von mesangialer Matrix. Bei Beckwith-Wiedeman-Syndrom-Patienten führt die Überexpression von *IGF2* zu renalen Abnormitäten wie persistierenden nephrogenen Resten, unreifen Glomeruli, teilweise sklerotisierten Glomeruli und hypoplastischen Tubuli (Morison et al., 1996). Für *IGF2* ist zudem eine anti-apoptotische Wirkung beschrieben worden (Dao et al., 1999, John et al., 2001).

- EGFR ist ein Transmembranprotein, das als Tyrosinkinase bei der Bindung des Epidermalen-Wachstumsfaktors (EGF) den Ras-Pathway aktivieren kann. EGFR ist auch bei der Anordnung des Zytoskeletts involviert (Boonstra et al., 1995) und reguliert bei der Nephrogenese die Differenzierung und Proliferation der Zellen (Voldborg et al., 1997).
- NovH reguliert während der Nephrogenese die Differenzierung und Proliferation der Podozyten. Veränderungen der NovH-Expression konnten bei Wilms-Tumoren beobachtet werden (Martinerie et al., 1996, Chevalier et al., 1998)
- Bcl2 ist in kondensiertem Mesenchym exprimiert, so dass eine anhaltende Expression möglicherweise zu persistierenden Blastemzellnestern und einer unvollkommenen Nephrogenese führen könnte. Auch die Hemmung von Apoptose konnte bei Wilms-Tumoren in Zusammenhang mit Bcl2 gebracht werden (Nitta et al., 1999, Mayo et al., 1999).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung sollten aufgrund der verminderten WT1-Expression die WT1-Zielgene *IGF2*, *NovH* und *EGFR* eine erhöhte und *Bcl2* eine verringerte Expression aufweisen. Tatsächlich wurde jedoch eine reduzierte Expression von IGF2, NovH (in stark sklerotisierten Glomeruli) und EGFR detektiert. Für Bcl2 konnte bei zwei DDS-Geweben eine geringe Erhöhung der Expression, wahrscheinlich jedoch in den Parietalzellen, festgestellt werden, die aber noch der weiteren Bestätigung bedarf.

Die tatsächlichen Ergebnisse, die konträr zu den erwarteten Befunden stehen, könnten darauf hindeuten, dass die Missensmutation im *WT1*-Gen nicht dominant negativ wirkt oder dass es sich nicht um physiologische Targets von WT1 handelt. Möglich wäre ein „Gain of Function“-Mechanismus, bei dem das DDS-Protein eine zum Wildtyp-WT1-Protein andere Wirkung hätte. Eine zu WT1 konträre Funktion ist für das Early-Growth-Response-1-Protein (EGR1) bei der Transkriptionskontrolle von *IGF2* und *TGFβ* beschrieben. Interessant dabei ist, dass das Gen eine 64%-ige Homologie im Zink-Finger-Bereich zu WT1 hat und an die gleichen Konsensus-Sequenzen bindet und auch Heterodimere mit WT1 bilden kann (Lee et al., 1996, Dey et al., 1994, Wang et al., 1993b).

Eine verminderte WT1-Expression wurde auch bereits von Yang und Mitarbeitern (Yang et al., 1999) beschrieben. Die Gruppe um Yang meinte sogar, in stark sklerotisierten Glomeruli überhaupt kein WT1 mehr in Podozyten detektieren zu können. Dies deckt sich jedoch nicht mit meinen Untersuchungen; so konnten auch in den meisten stark sklerotisierten Glomeruli WT1-positive Podozyten nachgewiesen werden (Abb. 5.6). Lediglich in einigen wenigen Glomeruli fanden sich keine WT1-positiven Zellen. Möglicherweise deutet dies eher auf ein Verschwinden der Podozyten als ganzes und nicht nur der WT1-Expression hin, wie Yang meint.

Die geringere WT1-Expression könnte in den Podozyten zu einer Aufhebung der Proliferationssperre und Rückdifferenzierung in proliferative Zellen führen. Dies würde aber nur für glomeruläre Anfangsstadien gelten, da in späteren glomerulären Stadien Podozyten aufgrund ihrer fußfortsatzbildenden Struktur sich kaum noch teilen können und festgestellt wurde, dass die Podozytenzahl abnimmt. Es wäre deshalb wichtig in zukünftigen Untersuchungen die Proliferationsaktivität von DDS-Podozyten in frühen glomerulären Stadien mittels Proliferations-Marker wie Topoisomerase II und Ki67 zu bestimmen.

In weiteren Analysen z.B. an Podozyten, die nur das mutierte WT1 exprimieren, könnte die Wirkung des mutierten WT1-Proteins untersucht werden und Expressionsunterschiede detektiert werden.

### **Mesangium-Zellen**

Neben den geschilderten Veränderungen, die die Podozyten betreffen, sind aber auch andere Zellen des Glomerulus von der diffusen mesangialen Sklerose betroffen. Ein Mesangialzell-spezifischer Marker ist Thy1, das den mesangialen Ursprung auch von Stammzellen und T-Lymphozyten markiert. Thy1 ist ein Zelloberflächen-Antigen, das zur Transmembran-Signalübermittlung dient (Krocze et al., 1986). Während der Nephrogenese spielt Thy1 eine Rolle bei Differenzierungsprozessen und gilt, da es bei ausgereiften MC kaum noch gebildet wird, als Reife-Marker (Ito et al., 2001). Bei ausgereiften Mesangialzellen scheint Thy1 an der Auslösung der terminalen Complement-Komplex-Bildung involviert zu sein (Roos et al., 2001). Nauta und Mitarbeiter (Nauta et al., 2000) demonstrierten, dass diese Complement-Aktivierung zu einem massiven Auftreten von Apoptose in renalen Zellen führt. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Rattenmodell der Anti-Thy1-Nephritis. Bereits 1h nach Verabreichung eines Thy1-Antikörpers kommt

es zu einer experimentell verursachten Glomerulonephritis, verbunden mit einem massiven Absterben der mesangialen Zellen (Paul et al., 1984).

Immunhistochemisch war Thy1 bei NAK-Glomeruli kaum detektierbar; je stärker sklerotisiert hingegen die DDS-Glomeruli waren, desto intensiver war die Expression von Thy1. In der IHC konnte bei den frühen Glomerulientwicklungsstadien der embryonalen Niere gezeigt werden, dass während der Nephrogenese die Thy-1-Expression zunimmt. Im weiteren Verlauf hin zu den ausgereiften Glomeruli nimmt die Thy1-Expression wieder ab und verschwindet schließlich fast ganz. Die andauernde oder erneute Expression von Thy1 in den DDS-Glomeruli deutet darauf hin, dass insbesondere die stark sklerotisierten DDS-Glomeruli nicht vollständig ausgereift sind, weil sie sich wieder zurückentwickelt haben.

Abschließend lässt sich zu den immunhistochemischen Analysen sagen, dass bei einigen Proteinen verschiedene Unterschiede zwischen NAK- und DDS-Glomeruli bei den stark sklerotisierten DDS-Glomeruli noch verstärkt vorzufinden waren.

Die Proteine NovH, Nephrin und Synaptopodin konnten in den äußeren rudimentären Glomeruli kaum nachgewiesen werden. Verstärkt nachweisbar waren dagegen Collagen IV und Thy1. Der beobachtete Anstieg von Thy1 mit zunehmendem Sklerotisierungsgrad der DDS-Glomeruli könnte zu einer gesteigerten Sensitivität der Mesangialzellen bezüglich der Complement induzierten Apoptose durch Apoptose-auslösende Faktoren führen.

### **Apoptose bei DDS-Glomeruli**

Neben den beschriebenen Veränderungen bei den Mesangialzellen ist auch bei DDS-Podozyten das Auftreten von Apoptose möglich. Denkbar wäre, dass der Verlust an Podozyten bei späteren Stadien der diffusen mesangialen Sklerose nicht nur auf die Verschmelzung der Fußfortsätze und die Ablösung der Podozyten von der GBM zurückzuführen ist, sondern auch auf apoptotische Prozesse.

Besonders beachtenswert ist, dass die Zahl der verbliebenen Podozyten in den Fällen, in denen die Ursache, wie z.B. toxische Stoffe oder Bluthochdruck, wieder verschwunden ist, nicht mehr zunimmt. Denkbar sind drei Erklärungen:

- Podozyten sind terminal differenzierte Zellen, die nicht mehr proliferieren können. Im Gegensatz zu seneszenten Zellen könnten terminal differenzierte Zellen rein theoretisch wieder in den Zellzyklus der Proliferation eintreten. Eine bedeutende Rolle bei der Proliferation spielen jedoch Cyclin-abhängige

---

Kinasen (CDK). Gegenspieler zu den Cyclin-abhängige Kinasen sind CDK-Inhibitoren. Kim und Mitarbeiter konnten (Kim et al., 1999.) nachweisen, dass die CDK-Inhibitoren p21 und p27 in Podozyten bei immunvermittelten Erkrankungen des Glomerulus erhöht sind, so dass die Podozyten in ihrer terminalen Differenzierung festgehalten würden und nicht in den Proliferationszyklus treten könnten.

- Durch eine Erkrankung kommt es im Podozyten zu einer verstärkten Expression von Zytokinen wie TGF $\beta$  und SPARC (Shankland et al., 1997). Diese Zytokine könnten in Podozyten einen antiproliferativen Effekt haben, so dass die Proliferationsfähigkeit von Podozyten als Folge einer Erkrankung reduziert sein könnte.
- Eine dritte Erklärung könnte die generelle Unfähigkeit der Podozytenpopulation sein sich zu vermehren als Folge dessen, dass eine gesteigerte Proliferation mit einer gesteigerten Apoptose einhergeht. Eine gesteigerte Apoptoserate von Podozyten konnte bei einer Form der Nephritis in Ratten nachgewiesen werden (Shankland et al., 1997)

Weiterhin wurde bei in-vitro Untersuchungen in Zellkultur bei initialer Wildtyp-WT1-Expression eine verringerte EGFR-Expression beobachtet, die zum programmierten Zelltod von Osteosarcoma-Zellen führte (Haber et al., 1996). Eine verringerte EGFR-Expression in DDS-Podozyten konnte auch bei den eigenen immunhistochemischen Analysen beobachtet werden. Nicht ausgeschlossen ist, dass das mutierte WT1-Protein eine ähnliche Wirkung in den DDS-Podozyten ausüben könnte.

Es sollte untersucht werden, ob Apoptose in DDS-Glomeruli bei Podozyten und Mesangiumzellen auftritt. In späten Stadien der Apoptose kommt es in den Zellkernen zu Strangbrüchen der DNA und folglich zu einer Fragmentierung. Mittels des TUNEL-Assays können die DNA-Bruchstücke nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen an Kryoschnitten konnten weder in den DDS- noch in den NAK-Glomeruli apoptotische Zellkerne von Podozyten oder Mesangium-Zellen gefunden werden.

Welchen Stellenwert diese Ergebnisse für die Podozyten haben, bleibt unklar. Es könnte natürlich sein, dass bei Podozyten keine Apoptose stattfindet. In dem Fall wäre die Erklärung darin zu suchen, dass die Podozyten in ihrer terminalen



Differenzierung festgehalten werden, wobei untersucht werden müsste, welche der beiden erstgenannten Theorien richtig ist. Es könnte jedoch auch sein, dass Apoptose bei den Podozyten vorkommt; diese Zellen jedoch über die Fußfortsätze ihr Haftung an die GBM verlieren und die Podozyten mit dem Primärharn ausgeschwemmt werden und nicht mehr nachweisbar sind.

Um Apoptose bei den Podozyten auszuschließen, wäre es von Interesse, weitere Untersuchungen mit Apoptosemarkern durchzuführen, die nicht eines der letzten apoptotischen Stadien - wie die DNA-Strangbrüche - nachweisen, sondern frühere mit Apoptose verbundene Veränderungen. In Frage dafür kommt z.B. Annexin V, dessen Expression als ein frühes apoptotisches Zeichen gilt (Nauta et al., 2000).

Für die Mesangiumzellen ergibt sich daraus, dass die erhöhte Thy1-Expression bei ihnen nicht mit einer gesteigerten Apoptoserate einher geht. Welche Funktion Thy1 in den Mesangiumzellen ausübt, bleibt somit unklar. Eine Erklärung dafür, dass die Mesangium-Zellen doch nicht den programmierten Zelltod erleiden, könnte sein, dass die mesangiale Matrix viel Collagen IV enthält. Die Arbeitsgruppe um Savill (Mooney et al., 1999) konnte an einem in-vitro-Zellkulturmodell zeigen, dass Collagen IV und Laminin als Komponenten der extrazellulären Matrix, mesangiale Rattenzellen vor Apoptose, die durch Hunger und DNA-Schäden induziert wurde, schützen. Unwahrscheinlich, aber nicht unmöglich ist, dass die Bildung von Collagen IV durch glomeruläre Zellen ein Apoptose-Schutzmechanismus ist. Schließlich ist in besonders stark sklerotisierten Glomeruli, mit den dramatischsten Veränderungen, Collagen IV am stärksten nachzuweisen.

### **6.3 cDNA-Expressionsprofile**

Um Antworten auf die vielen Fragen zum Entstehungsmechanismus der diffusen mesangialen Sklerose beim Denys-Drash-Syndrom zu finden, wurden cDNA-Analysen mittels des Atlas-Array-Sets 3.6 (Clontech) durchgeführt. Der Vorteil der Array-Technologie ist, dass große Teile des Transkriptoms gleichzeitig in einem Experiment untersucht werden können und die differentielle Expression einzelner Gene nachgewiesen werden kann, ohne dass konkrete Anhaltspunkte auf die Beteiligung dieser Gene an den Erkrankungen vorliegen. Durch die Array-Technologie ist es zudem möglich, ganze Stoffwechselwege und

Signalübermittlungswege in relativ kurzer Zeit zu untersuchen, um so eventuell die Ursache einer Krankheit schneller zu entdecken.

Beim DDS ist die Ursache – die Missense-Mutationen in einem *WT1*-Allel – bekannt; doch kennt man vermutlich nur einen Teil der Gene, die von *WT1*-reguliert werden. Inwieweit sie für die Entwicklung der verschiedenen Krankheitsausprägungen beim DDS verantwortlich sind ist zudem unklar. Zwar haben die immunhistochemischen Analysen einige Anhaltspunkte zur Entstehung der DMS gebracht, doch konnte z.B. die Frage, ob die verringerte Integrin  $\alpha\beta 1$ -Expression wirklich eine Ursache oder nur eine Auswirkung ist damit nicht beantwortet werden.

Zur Erstellung der Expressionsprofile waren mehrere Arbeitsschritte notwendig. Bei den Kryogeweben mussten die Glomeruli mittels der LCM-Technik isoliert und aus diesen Gewebeproben die RNA extrahiert werden. Da durch die LCM-Methode nicht ausreichend mRNA isoliert werden konnte, musste die cDNA amplifiziert werden, bevor sie - radioaktiv markiert - auf die Arrays hybridisiert werden konnte.

Für die Erstellung der Expressionsprofile wurden je eine DDS- und eine NAK-Podozyten-Zellkultur, sowie die Glomeruli von fünf Normal- und zwei DDS-Kryogeweben verwendet. Problematisch ist der Begriff Normalgewebe. Einige Unterschiede liegen direkt auf der Hand: die Normalkontrollen waren über 60 Jahre alt, während die DDS-Gewebe von Patienten, die circa 1 Jahr alt waren, stammten. Weiterhin wiesen einige der Normalkontrollen Tumore wie Harnwegs- und Blasenkarzinome, aber auch Nierenzellkarzinome auf und waren deshalb zuvor chemotherapiert worden. Weitere Unterschiede sind in der individuellen Beschaffenheit jeder einzelnen Person zu finden. Diese Gründe demonstrieren, warum es keine wirklichen Normalkontrollen gibt. Es besteht lediglich die Möglichkeit, möglichst viele dieser Normalkontrollen zu untersuchen und die individuellen Effekte zu vernachlässigen.

Bei den DDS-Geweben wurden nur die großen, kaum sklerotisierten Glomeruli mikrodisektiert, um eine einheitliche Gruppe vorliegen zu haben. Außerdem sollten die Anfangsstadien der Erkrankung und so möglichst primäre Effekte der *WT1*-Mutation und nicht das Endstadium mit sekundären Effekten, wie sie bei den stark sklerotisierten Glomeruli vorliegen, analysiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit lagen in der Arbeitsgruppe kaum Erfahrungen mit der Erstellung von Expressionsprofilen vor, so dass einige Methoden neu etabliert und andere optimiert werden mussten.

### **Methodik**

Einige der ausgetesteten Methoden erwiesen sich als nicht praktikabel. Die RNA-Isolation mittels der Ethanol-Fällung wies den Nachteil auf, dass eine sehr geringe Ausbeute erzielt wurde und dass die Qualität der extrahierten RNA recht schlecht war (Abb. 5.16). Bei der RNA-Amplifikation mittels der T7-Polymerase konnte weder eine befriedigende Amplifikationseffizienz noch eine Reproduzierbarkeit erzielt werden. Die PCR-Amplifikation nach Brady & Iscove (Kap. 5.5), war zwar reproduzierbar, lieferte jedoch zu kurze Transkripte und musste bei jeder Probe immer wieder neu und aufwendig optimiert werden.

Die Methoden, die sich letztendlich als optimal herausstellten vereinigten einige Charakteristika in sich:

- Wenige Arbeitsschritte, da keine Reinstraumbedingungen gegeben waren und durch viele aufeinanderfolgende Schritte das Kontaminationsrisiko zunahm.
- Zügige Durchführbarkeit, weil dadurch gewährleistet wurde, dass die RNA nur kurze Zeit in wässriger Lösung bei Raumtemperatur vorlag, um eine Degradierung der mRNA zu verhindern.
- Bestmögliche Reproduzierbarkeit, da bereits geringe Veränderungen die Ergebnisse der Expressionsanalysen drastisch veränderten.
- Hohe Zuverlässigkeit, um zeit- und kostenintensive Experimente erfolgreich abschließen zu können.

Die RNA aus den mikrodisezierten Geweben wurde mit dem Microprep-Kit von Stratagene extrahiert, bevor sie mittels der SMART-Methode amplifiziert wurde. Das amplifizierte Produkt wurde, nachdem es radioaktiv markiert war, auf die Membranen des Atlas-Array-Sets 3.6 (Clontech) hybridisiert.

Im Vergleich zu den Zellkulturproben, bei denen große Mengen an mRNA problemlos isoliert werden konnten, erwies sich die Amplifikation der RNA aus Gefriergeweben, als entscheidender Punkt für die Aussagekraft der Expressionsprofile, würde doch eine ungleiche Amplifikation der cDNA verfälschte und damit unbrauchbare Expressionsprofile liefern.

---

Um eigene Daten zur Güte der SMART-Methode zu haben, wurde die Zuverlässigkeit der SMART-Methode im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Zu diesem Zweck wurde die RNA aus zwei unterschiedlichen Zellkulturen isoliert und jeweils Expressionsprofile mit und ohne SMART-Amplifikation erstellt. Die Zuverlässigkeit (Reliabilität) ergab sich aus dem Verhältnis der Varianzen der gemessenen differentiellen Expressionen beider Methoden.

Legte man für die Berechnung der Reliabilität alle exprimierten Gene zugrunde, so ergab sich nur eine geringe Reliabilität der SMART-Methode ( $\rho$ : 0,41). Wenn jedoch die knapp 1500 Gene erfasst wurden, deren differentielle Expression lediglich um den Wert 0,67 nach unten oder 1,5 nach oben voneinander abwich, so war die ermittelte Zuverlässigkeit von  $\rho=0,85$  relativ hoch (Stöber et al., 1999).

Eine gute Reproduzierbarkeit der SMART-Methode wurde von Vernon und Mitarbeitern (Vernon et al., 2000) beschrieben. Endege und Mitarbeiter (Endege et al., 1999) konnten nachweisen, dass die SMART-Methode starke-, mittel- und schwach-exprimierte Gene repräsentativ und reproduzierbar amplifiziert. Bei beiden Untersuchungen wurden jedoch so große Ausgangsmengen an RNA verwendet, dass eigentlich keine Amplifikation notwendig gewesen wäre. Ob die Ergebnisse von Vernon und Endege auch auf sehr kleine RNA-Mengen übertragen werden können, ist nicht eindeutig zu klären, da schließlich fast die Hälfte der differentiellen Expressionswerte durch die SMART-Amplifikation der LCM-Proben verfälscht wurde. Beim Reliabilitätstest der SMART-Methode muss jedoch beachtet werden, dass die Expressionsprofile jeweils nur zweimal erstellt wurden und die Mittelwerte für die statistische Betrachtung der Zuverlässigkeit der Methode verwendet wurden. Bei einer höheren Zahl von durchgeführten Experimenten ist davon auszugehen, dass die Reliabilität zunimmt, da einzelne Ausreißer nicht mehr so stark ins Gewicht fallen, wie dies bei nur zweifach durchgeführten Untersuchungen der Fall ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die SMART-Methode geeignet scheint, einen Überblick zu geben, ob Gene differentiell exprimiert werden. Diese detektierten Expressionsunterschiede bedürfen in jedem Fall einer Bestätigung durch eine unabhängige Methode wie z.B. die RT-PCR.

Eine Alternative zur SMART-Amplifikation könnte auch in naher Zukunft die RNA-Amplifikation durch die T7-Polymerase werden, da von der Fa. Ambion mittlerweile ein Kit entwickelt wurde, der weniger Arbeitsschritte bedarf und eine höhere

Zuverlässigkeit haben soll. Interessant wäre es, die Reliabilität der linearen Amplifikation mittels T7-Polymerase zu bestimmen. Es wäre dann möglich, beide Methoden miteinander zu vergleichen, da hierzu - soweit mir bekannt ist – noch keine veröffentlichten Untersuchungen vorliegen. Theoretisch sollten die Abweichungen bei der Amplifikation der RNA durch die T7-Polymerase geringer sein, so dass eine höhere Zuverlässigkeit der experimentell bestimmten differentiellen Expression gegeben sein könnte.

### **Verifizierung der differentiellen Genexpression**

Der Vergleich der Expressionsprofile brachte die vermeintlich differentielle Expression einiger Gene ans Licht, bei denen es zuvor keine Indizien auf eine Beteiligung an der DMS gab. Bei knapp 30 Genen zeigten sich zwischen den Gruppen der DDS- und NAK-Gewebe voneinander abgrenzbare Unterschiede in der Expressionsstärke.

Exemplarisch wurden vier Gene, darunter zwei (*POD1* und *MMP7*) aus der oben erwähnten auffälligen Gruppe und die Podozytenmarker *WT1* und *Synaptopodin* mittels semiquantitativer RT-PCR auf ihre Expression überprüft. Bei *WT1*, *Synaptopodin* und *POD1* stimmten die Tendenzen der in der Array-Analyse ermittelten Genexpression mit der semiquantitativ (RT-PCR) bestimmten Expression überein. Lediglich bei *MMP7* ergab sich ein entgegengesetztes Bild. Um Klarheit zu erlangen, wurde bei *MMP7* eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Das Ergebnis bestätigte die mit der semiquantitativen RT-PCR ermittelte reduzierte Expression bei DDS-Gewebe.

Am Beispiel des Synaptopodins konnte gezeigt werden, dass die cDNA-Expression nicht unbedingt mit der Proteinexpression korreliert. Sowohl die cDNA-Array-Analyse, als auch die RT-PCR konnten übereinstimmend keine Unterschiede zwischen NAK- und DDS-Glomeruli bzw. Podozyten erkennen lassen. Bei der IHC konnte dagegen bei den DDS-Glomeruli – auch bei den kaum sklerotisierten - deutlich weniger Synaptopodin nachgewiesen werden als bei den NAK-Glomeruli. Dieses Beispiel zeigt, dass sich die Expressionsunterschiede auf Ebene des Transkriptoms nicht unbedingt auf Proteomebene übertragen lassen und sich somit auch nicht generell z.B. mittels IHC bestätigen lassen. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Fink und Mitarbeiter (Fink et al., 2002).

Aus der Validierung dieser vier Gene lässt sich erkennen, dass die Array-Analyse eine Tendenz der Expressionsveränderung anzeigen kann, diese aber nicht immer stimmen muss. Die Ergebnisse unterstützten die Schlussfolgerung, die aus dem Reliabilitätstest gezogen werden konnte: In jedem Fall müssen die mit den cDNA-Arrays ermittelten Expressionsunterschiede durch unabhängige Methoden verifiziert werden.

### Differentielle Expression bei DDS-Geweben

Im Rahmen der Arbeit konnten die im folgenden besprochenen Gene nicht mehr auf ihre differentielle Expression hin validiert werden; trotzdem bieten sie interessante, neue Aspekte zur Fehlregulation und zu den Ursachen der DMS bei DDS-Nieren.

Von den bereits erwähnten 26 Genen, die beim Vergleich der Expressionsprofile auffällig waren, ließen sich viele Gene zwei Gruppen mit eindeutigen Funktionen zuordnen:

- Gene, die Differenzierungsprozesse während der Nephrogenese oder die Organogenese der Niere direkt steuern. Dieser Gruppe konnten sieben Gene zugeordnet werden. In DDS-Geweben schwächer exprimiert waren: *aFGF1*, *Interleukin1-Rezeptor (IL1R)* und *POD1*. Eine erhöhte Expression in DDS-Geweben war bei *TGFβ2*, *EMX2*, *Hox7b* und *Pleiotrophin* zu finden. Die persistierende Expression dieser vier Gene - sie sollten nur während der Embryonalentwicklung aktiv sein – könnte, wie auch die erhöhte Expression von *Thy1*, auf eine unvollständige Ausreifung und eine nicht abgeschlossene Differenzierung der DDS-Glomeruli hindeuten.
- Gene, die über ein tumorigenes Potential, da sie Zellzyklus regulierend sind, verfügen. Dieser Gruppe konnten vier Gene zugeordnet werden: Schwächer exprimiert war der *Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor N (PTPRN)*. Stärker exprimiert waren der *Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor C (CD45)*, der *Elongation Faktor 1D* und das *putative c-Myc responsive-Gen*. Die Fehlregulation dieser Gene könnte ein Indiz für erste tumorigene Stufen des sich später ausbildenden Wilms-Tumors bei DDS-Patienten sein. Über die Funktion dieser Gene im Hinblick auf die Nephrogenese ist bisher nichts bekannt.

Möglicherweise werden die Gene, die die Nephrogenese und die Gene, die den Zellzyklus regulieren, normalerweise von WT1 direkt oder indirekt reguliert.

Unter den Genen, die sich keiner größeren Gruppe zuordnen lassen, befindet sich Tropomyosin. Tropomyosin ist ein Zytoskelett-bildendes Protein, das bei Erkrankungen das Zytoskelett zu reorganisieren und Aktin-Mikrofilamente zu stabilisieren vermag (Shah et al., 2001). Zur Erinnerung: Synaptopodin und  $\alpha$ -Actinin, wichtige Bestandteile des Zytoskeletts sind in den DDS-Podozyten deutlich reduziert. Tropomyosin könnte hier eingreifen und das Zytoskelett neu organisieren. Zudem könnte es eine Rolle bei der Neustrukturierung des Zytoskeletts infolge der Podozyten-Fußverschmelzung spielen. Bei in-vitro Versuchen in Zellkultur wurde außerdem demonstriert, dass Tropomyosin die maligne Transformation von Zellen suprimieren kann. Die erhöhte Expression könnte ein Schutzmechanismus der DDS-Zellen vor den Auswirkungen der deregulierten Gene mit onkogenem Potential sein. Neben dem Intermediärfilamentprotein Tropomyosin weist auch das Anker-Protein Dystroglycan1 (alpha) eine veränderte Expression auf. In den Podozyten dient Dystroglycan1 (Abb. 6.1) der Verankerung an die GBM, da es ein Rezeptor für Agrin und Laminin ist. Die Dystroglycan1-Verminderung könnte ebenso wie bei Integrin  $\alpha 3 \beta 1$  zur Ablösung der Podozytenfußfortsätze von der GBM führen.

Ein weiteres differentiell stärker in DDS-Gewebe exprimiertes Gen ist *Glypican3*. *Glypican3* ist ein außergewöhnliches HSPG, denn es vermag die Wirkung einiger Wachstumsfaktoren zu modulieren. Darunter sind bekannte Proteine wie FGF1 und IGF2, das als putatives WT1-Targetgen gilt. *Glypican3* könnte deshalb auf einer anderen Ebene als WT1 die Wirkung von Transkriptionsfaktoren zusätzlich verändern.

Zur Verdickung der GBM könnte Elastin beitragen, das die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix bei Arterien ist und von Endothelzellen gebildet wird. Zusammen mit den Podozyten produzieren Endothelzellen auch die Bestandteile der GBM. Die Überexpression von Elastin könnte eine Reaktion der Endothelzellen sein, um den gestörten Aufbau der GBM durch die Podozyten auszugleichen.

Die Matrix-Metalloproteinase7 (MMP7) vermag extrazelluläre Matrixproteine zu degradieren. Überwiegend zeigen die durchgeführten Untersuchungen zu *MMP7* eine verringerte Expression in DDS-Gewebe, die jedoch noch bestätigt werden müssen. Die Wichtigkeit einer intakten Matrix-Degradierung konnte bei in-vitro-

Studien gezeigt werden. Die Blockierung der *MMP9*, einem zu *MMP7* verwandten Gen mit ähnlicher Funktion, durch Inhibitoren führte während der Nierenentwicklung zu einer verringerten Verzweigung der Ureterknospe (Review: Kuure et al., 2000, Udayakumar et al., 2002). Die Verminderung von *MMP7* könnte so während der Nephrogenese zur geringeren Bildung von Glomerulanlagen und letztlich zu weniger Glomeruli bei DDS-Nieren führen.

Um die Expressionsverminderung von *MMP7* eindeutig zu belegen, wäre es wichtig, auch bei den Glomeruli der Kryogewebe eine semiquantitative PCR-durchzuführen.

Die Inositol-Polyphosphat-1-Phosphatase könnte wie bereits diskutiert in der veränderten Signalübermittlung an der ILK involviert sein.

Bei einigen weiteren Genen (*GDF7*, Lymphocyte-6-Antigen, Janus-Kinase-3, RAR-related Orphan-Receptor C, Lysosomal-associated Membran-Protein1, Cholinergic Receptor, Signal-Sequence-Receptor D) sind, soweit mir bekannt, ihre Funktionen unentdeckt oder es lassen sich noch keine Rückschlüsse auf ihre Funktion in der Niere ziehen. Trotzdem sollten sie bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden, da der Schlüssel zum genaueren Verständnis der DMS auch bei ihnen liegen könnte.

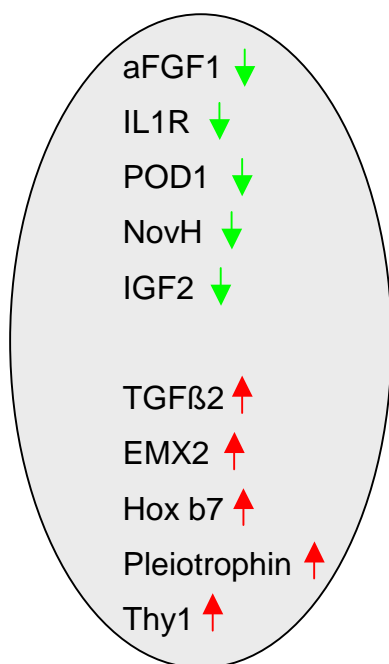
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Array-Analyse einige neue Anhaltspunkte zur Entstehung der DMS und den komplizierten Wechselwirkungen gegeben hat. Natürlich müssen die Tendenzen der Expressionsveränderungen erst verifiziert werden, doch passen viele neu ins Spiel gebrachte Gene gut ins bestehende Konzept, um die Entstehung der glomerulären Veränderungen bei DDS-Patienten zu erklären. Noch aufschlussreicher könnte der Vergleich der Expressionsprofile werden, wenn zusätzliche Expressionanalysen von weiteren DDS- und NAK-Nierengeweben durchgeführt würden und individuelle Schwankungen besser als solche identifiziert werden könnten.



## 6.4 Schlußfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit, konnten auf molekularer Ebene neue Einblicke in den Pathomechanismus der diffusen mesangialen Sklerose bei DDS-Patienten gewonnen werden (Abb. 6.3).

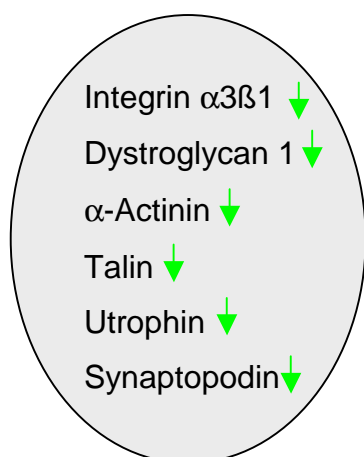
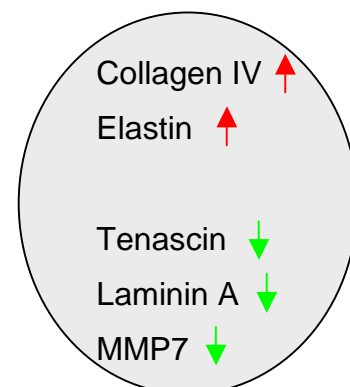
### Differenzierung der Glomeruli unvollständig



mut WT1

?

### Deregulierung der GBM



Nephrin ↓

### Verminderung der Schlitzmembrane

### Ablösen der Podozytenfußfortsätze von der GBM

Abb. 6.3: Noch unvollständige Darstellung des Pathomechanismus der DMS. Dargestellt sind die im Rahmen der Arbeit nachgewiesenen Veränderungen bei DDS-Glomeruli. Unklar sind vor allem die Regulationen auf molekularer Ebene. rote Pfeile bedeuten eine erhöhte Expression und grüne Pfeile eine reduzierte Expression in DDS-Geweben.

---

Die DMS wird genetisch durch eine Missensmutation des *WT1*-Gens verursacht und ist das Resultat vieler Fehlregulierungen.

Durch unterschiedliche Methoden zur Analyse der Expressionen auf den Ebenen des Transkriptoms und Proteoms konnte gezeigt werden, dass viele Gene, die eine Rolle bei der Nephrogenese spielen, bei DDS-Glomeruli dereguliert sind. Eine Fehlregulation dieser Gene könnte die Ursache für die unvollständige Differenzierung der Denys-Drash-Glomeruli sein. Einige von Ihnen wurden schon früher als putative *WT1*-Targetgene identifiziert: *NovH*, *IGF2* und *TGF $\beta$ 2*. Bei anderen sind die Regulationsmechanismen noch unklar, möglich wäre eine direkte Steuerung durch *WT1* aber auch eine indirekte Steuerung über einen durch *WT1* in der Expression veränderten Mediator. Die molekularen Befunde ergänzen gut die histologische Beobachtung einer unvollständigen Differenzierung der DDS-Glomeruli (Habib et al., 1993).

Dass die veränderten Bedingungen Auswirkungen auch auf andere Zelltypen des Glomerulus haben, zeigt sich an der erhöhten Expression von *Thy1*, das ein Mesangialzellmarker ist. Die *Thy1*-Expression steigt mit zunehmendem Sklerotisierungsgrad der DDS-Glomeruli.

Die Sklerotisierung der GBM geht einher mit einer starken Verdickung der GBM. Auf molekularer Ebene beobachtet man die Zunahme von Collagen IV und Elastin. Die detektierte Abnahme von Laminin und dem HSPG Tenascin könnte zum Funktionsverlust der GBM führen, da Laminin eine Siebfunktion ausübt und Tenascin zur negativen Ladung beiträgt. Es zeigt sich insgesamt ein dereguliertes Erscheinungsbild der GBM. Die Verminderung von Laminin könnte zusätzlich mit der Ablösung der Podozyten-Fußfortsätze in Verbindung stehen.

Die Fußfortsätze sind über Laminin-Dystroglycan- und Integrin  $\alpha3\beta1$ -Collagen IV-Brücken mit der GBM verknüpft. Sowohl Dystroglycan1 als auch Integrin  $\alpha3\beta1$  wurden deutlich vermindert im DDS-Podozyten vorgefunden. Innerhalb der Podozyten-Fußfortsätze ist Integrin  $\alpha3\beta1$  mit den kontraktilen Apparaten verbunden. Talin,  $\alpha$ -Actinin und Utrophin, die am Aufbau der kontraktilen Apparate beteiligt sind, waren in DDS-Podozyten deutlich schwächer exprimiert. Daraus, sowie aus der Verminderung von Synaptopodin, lässt sich eine Strukturveränderung des Zytoskeletts in den Fußfortsätzen der Podozyten herleiten, die im Zusammenhang mit der veränderten Integrin  $\alpha3\beta1$ -Expression stehen könnte.

Die Veränderung des Zytoskeletts bedingt höchstwahrscheinlich die Ablösung der Podozytenfußfortsätze von der GBM. Die sich anschließende Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze könnte zum Verlust der Schlitzmembran zwischen den Fußfortsätzen führen, dokumentiert durch eine Nephrin-Verminderung. Die Schlitzmembran ist ein weiteres wichtiges Element der Filtrationsbarriere und dient in gesunden Glomeruli der Ultrafiltration von kleinen Serumproteinen wie Albumin.

Es konnte durch den Nachweis differentiell exprimierter Gene gezeigt werden, dass die diffuse mesangiale Sklerose durch das Zusammenwirken vieler Fehlregulierungen auf molekularer Ebene entsteht und wie möglicherweise die Proteinurie bei DDS-Patienten verursacht wird.

**Ausblick:**

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen können jetzt weitere Untersuchungen durchgeführt werden:

- Verifizierung weiterer differentiell exprimierter Gene
- Untersuchungen zur Regulation der nephrogenetisch aktiven Gene
- Analysen zum Regulationsmechanismus von Integrin  $\alpha3\beta1$

Für zukünftige Analysen geeignet wären zum Beispiel die erfolgreich in Kultur genommenen DDS-Podozyten. Es wäre jedoch wünschenswert, noch weitere DDS- und NAK-Podozyten in Kultur zu nehmen.

## 7 Zusammenfassung

Die genetische Ursache des Denys-Drash Syndroms sind Missensmutationen in der Zinkfingerregion des *WT1*-Gens, die vermutlich dazu führen, dass das veränderte Protein seine physiologischen Zielgene nicht mehr regulieren kann. Das Denys-Drash-Syndrom ist eine Kombination aus Urogenitalfehlbildungen, nephrotischem Syndrom und Wilms Tumor. Alle Patienten entwickeln sehr früh ein nephrotisches Syndrom, das meistens vor dem 3. Lebensjahr zum terminalem Nierenversagen führt. Es manifestiert sich histologisch als diffuse mesangiale Sklerose und führt zu einem Funktionsverlust der Filtrationsbarriere, die u.a. aus der glomerulären Basalmembran und der Schlitzmembran gebildet wird. Die Erkrankung ist charakterisiert durch eine Verdickung der glomerulären Basalmembran, Hypertrophie der Podozyten mit Verschmelzung der sekundären Fußfortsätze und Ablösung von der glomerulären Basalmembran sowie dem Vorhandensein unreifer Glomeruli. Das *WT1*-Gen kodiert für einen gewebsspezifischen Transkriptionsfaktor, der während der Nephrogenese und bei der normalen Podozytenfunktion eine wichtige Rolle spielt.

Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die verantwortlich dafür sind, dass Mutationen im *WT1*-Gen zur diffusen mesangialen Sklerose der Glomeruli führen.

Die diffuse mesangiale Sklerose ist vermutlich das Resultat vieler Fehlregulierungen auf molekularer Stufe. Durch unterschiedliche Methoden wurde die Genexpression auf der Ebene des Transkriptoms und Proteoms analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass viele Gene, die eine Rolle bei der Nephrogenese spielen (z.B. *POD1* und *NovH*) in Denys-Drash-Glomeruli dereguliert sind und so die unvollständige Differenzierung verursachen könnten.

Mit immunhistochemischen Analysen wurden die glomeruläre Basalmembran und die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen als Komponenten der glomerulären Filtrationsbarriere untersucht. Die nachgewiesene Expressionsveränderung einzelner Proteine der glomerulären Basalmembran könnte zu deren Funktionsverlust führen. Die Verbindung der Fußfortsätze an die glomeruläre Basalmembran wird vor allem durch Integrin  $\alpha3\beta1$  und Zytoskelett-Proteine wie Aktin, Talin, Vinculin, Utrophin und  $\alpha$ -Actinin vermittelt. Bei der überwiegenden

Anzahl dieser Proteine zeigte sich bei den Untersuchungen eine verminderte Expression, die vermutlich zur Ablösung der Fußfortsätze und einer Veränderung des Zytoskeletts führt. Die daraus resultierende Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze geht einher mit dem Verlust der Schlitzmembran (Nephrin) zwischen den Fußfortsätzen.

Es konnte durch den Nachweis differentiell exprimierter Gene gezeigt werden, dass die diffuse mesangiale Sklerose durch das Zusammenwirken vieler Fehlregulationen auf molekularer Ebene entsteht und so möglicherweise eine Störung der glomerulären Filtrationsbarriere und damit verbunden eine Proteinurie bei DDS-Patienten verursacht.

Für die Durchführung weiterer Analysen, aufbauend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, bieten sich die erfolgreich primär angelegten Podozyten von DDS-Patienten an.

## 8 Literaturverzeichnis

Barbosa, A.S., Hadjiathanasiou, C.G., Theodoridis, C., Papathanasiou, A., Tar, A., Merksz, M., Gyorvari, B., Sultan, C., Dumas, R., Jaubert, F., Niaudet, P., Moreira-Filho, C.A., Cotinot, C. and Fellous, M., The same mutation affecting the splicing of WT1 gene is present on Frasier syndrome patients with or without Wilms' tumor. *Hum Mutat*, **13**, 146-53 (1999).

Benninghoff, *Anatomie*, p. 865, Urban&Schwarzenberg, München (1993).

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E., Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-52. (1998).

Boonstra, J., Rijken, P., Humbel, B., Cremers, F., Verkleij, A. and van Bergen en Henegouwen, P., The epidermal growth factor. *Cell Biol Int*, **19**, 413-30. (1995).

Brady, G. and Iscove, N.N., Construction of cDNA libraries from single cells. *Methods Enzymol*, **225**, 611-23 (1993).

Call, K.M., Glaser, T., Ito, C.Y., Buckler, A.J., Pelletier, J., Haber, D.A., Rose, E.A., Kral, A., Yeger, H., Lewis, W.H. and et al., Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*, **60**, 509-20. (1990).

Caricasole, A., Duarte, A., Larsson, S.H., Hastie, N.D., Little, M., Holmes, G., Todorov, I. and Ward, A., RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7562-6. (1996).

Chevalier, G., Yeger, H., Martinerie, C., Laurent, M., Alami, J., Schofield, P.N. and Perbal, B., novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. *Am J Pathol*, **152**, 1563-75. (1998).

Coppes, M.J. and Pritchard-Jones, K., Principles of Wilms' tumor biology. *Urol Clin North Am*, **27**, 423-33, viii. (2000).

Dao, D., Walsh, C.P., Yuan, L., Gorelov, D., Feng, L., Hensle, T., Nisen, P., Yamashiro, D.J., Bestor, T.H. and Tycko, B., Multipoint analysis of human chromosome 11p15/mouse distal chromosome 7: inclusion of H19/IGF2 in the minimal WT2 region, gene specificity of H19 silencing in Wilms' tumorigenesis and methylation hyper-dependence of H19 imprinting. *Hum Mol Genet*, **8**, 1337-52. (1999).

de Graaff, E., Srinivas, S., Kilkenny, C., D'Agati, V., Mankoo, B.S., Costantini, F. and Pachnis, V., Differential activities of the RET tyrosine kinase receptor isoforms during mammalian embryogenesis. *Genes Dev*, **15**, 2433-44. (2001).

- Denys, P., Malvaux, P., Van Den Berghe, H., Tanghe, W. and Proesmans, W., [Association of an anato-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism]. *Arch Fr Pediatr*, **24**, 729-39. (1967).
- Dey, B.R., Sukhatme, V.P., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Rauscher, F.J., 3rd and Kim, S.J., Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol Endocrinol*, **8**, 595-602. (1994).
- Drash, A., Sherman, F., Hartmann, W.H. and Blizzard, R.M., A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr*, **76**, 585-93. (1970).
- Dressler, G.R., Wilkinson, J.E., Rothenpieler, U.W., Patterson, L.T., Williams-Simons, L. and Westphal, H., Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature*, **362**, 65-7. (1993).
- Drummond, I.A., Madden, S.L., Rohwer-Nutter, P., Bell, G.I., Sukhatme, V.P. and Rauscher, F.J., 3rd, Repression of the insulin-like growth factor II gene by the Wilms tumor suppressor WT1. *Science*, **257**, 674-8. (1992).
- Doublier, S., Seurin, D., Fouqueray, B., Verpont, M.C., Callard, P., Striker, L.J., Striker, G.E., Binoux, M. and Baud, L., Glomerulosclerosis in mice transgenic for human insulin-like growth factor-binding protein-1. *Kidney Int*, **57**, 2299-307. (2000).
- Eberwine, J., Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques*, **20**, 584-91. (1996).
- Eddy, A.A. and Mauer, S.M., Pseudohermaphroditism, glomerulopathy, and Wilms tumor (Drash syndrome): frequency in end-stage renal failure. *J Pediatr*, **106**, 584-7. (1985).
- Eisen, M.B.S., P.T.; Brown, P.O.; Botstein, D., Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, **95**, 14863-68 (1998).
- Endege, W.O., Steinmann, K.E., Boardman, L.A., Thibodeau, S.N. and Schlegel, R., Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. *Biotechniques*, **26**, 542-8, 550. (1999).
- Englert, C., Vidal, M., Maheswaran, S., Ge, Y., Ezzell, R.M., Isselbacher, K.J. and Haber, D.A., Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 11960-4. (1995).
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G.G., Garvin, A.J., Rosner, M.R. and Haber, D.A., WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *Embo J*, **14**, 4662-75. (1995).

- Fink, L., Kohlhoff, S., Stein, M.M., Hanze, J., Weissmann, N., Rose, F., Akkayagil, E., Manz, D., Grimminger, F., Seeger, W. and Bohle, R.M., cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am J Pathol*, **160**, 81-90. (2002).
- Gessler, M., Hameister, H., Henry, I., Junien, C., Braun, T. and Arnold, H.H., The human MyoD1 (MYF3) gene maps on the short arm of chromosome 11 but is not associated with the WAGR locus or the region for the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet*, **86**, 135-8. (1990).
- Goldman, S.M., Garfinkel, D.J., Oh, K.S. and Dorst, J.P., The Drash syndrome: male pseudohermaphroditism, nephritis, and Wilms tumor. *Radiology*, **141**, 87-91. (1981).
- Groffen, A.J., Veerkamp, J.H., Monnens, L.A. and van den Heuvel, L.P., Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant*, **14**, 2119-29. (1999).
- Guo, J.K., Menke, A.L., Gubler, M.C., Clarke, A.R., Harrison, D., Hammes, A., Hastie, N.D. and Schedl, A., WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum Mol Genet*, **11**, 651-9. (2002).
- Haber, D.A., Englert, C. and Maheswaran, S., Functional properties of WT1. *Med Pediatr Oncol*, **27**, 453-5. (1996).
- Habib, R., Loirat, C., Gubler, M.C., Niaudet, P., Bensman, A., Levy, M. and Broyer, M., The nephropathy associated with male pseudohermaphroditism and Wilms' tumor (Drash syndrome): a distinctive glomerular lesion--report of 10 cases. *Clin Nephrol*, **24**, 269-78. (1985).
- Habib, R., Nephrotic syndrome in the 1st year of life. *Pediatr Nephrol*, **7**, 347-53. (1993).
- Hampson, R.B., Y.F. Hulgus, W.R. Beavers, Comparisons of self-report measures of the Beavers System Models and Olson's Circumplex Model. *Journal of Family Psychology*, **4**, 326-40 (1991).
- Hanahan, D., Techniques for Transformation of E.coli. In DNA cloning: A practical approach, p. 109, IRL Press (1985).
- Hara, M., Yanagihara, T. and Kihara, I., Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron*, **89**, 342-7. (2001).
- Hewitt, S.M., Hamada, S., McDonnell, T.J., Rauscher, F.J., 3rd and Saunders, G.F., Regulation of the proto-oncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res*, **55**, 5386-9. (1995).



- Hofmann, W., Royer, H.D., Drechsler, M., Schneider, S. and Royer-Pokora, B., Characterization of the transcriptional regulatory region of the human WT1 gene. *Oncogene*, **8**, 3123-32. (1993).
- Holthofer, H., Sainio, K. and Miettinen, A., The glomerular mesangium: studies of its developmental origin and markers in vivo and in vitro. *Apmis*, **103**, 354-66. (1995).
- Holthofer, H., Ahola, H., Solin, M.L., Wang, S., Palmén, T., Luimula, P., Miettinen, A. and Kerjaschki, D., Nephritin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am J Pathol*, **155**, 1681-7. (1999).
- Holthöfer, , *The Podocyte*, Heidelberg (2001).
- Holzman, L.B., St John, P.L., Kovari, I.A., Verma, R., Holthofer, H. and Abrahamson, D.R., Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cell. *Kidney Int*, **56**, 1481-91. (1999).
- Howe, C.L., Granger, B.L., Hull, M., Green, S.A., Gabel, C.A., Helenius, A. and Mellman, I., Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 7577-81. (1988).
- Hugo, C., Nangaku, M., Shankland, S.J., Pichler, R., Gordon, K., Amieva, M.R., Couser, W.G., Furthmayr, H. and Johnson, R.J., The plasma membrane-actin linking protein, ezrin, is a glomerular epithelial cell marker in glomerulogenesis, in the adult kidney and in glomerular injury. *Kidney Int*, **54**, 1934-44. (1998).
- Issarachai, S., Priestley, G.V., Nakamoto, B. and Papayannopoulou, T., Cells with hemopoietic potential residing in muscle are itinerant bone marrow-derived cells. *Exp Hematol*, **30**, 366-73. (2002).
- Ito, T., Suzuki, A., Imai, E., Okabe, M. and Hori, M., Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 2625-35. (2001).
- Jadresic, D., Medical, psychological and social aspects of torture: prevention and treatment. *Med War*, **6**, 197-203. (1990).
- Jalanko, H., Patrakka, J., Tryggvason, K. and Holmberg, C., Genetic kidney diseases disclose the pathogenesis of proteinuria. *Ann Med*, **33**, 526-33. (2001).
- John, R.M., Ainscough, J.F., Barton, S.C. and Surani, M.A., Distant cis-elements regulate imprinted expression of the mouse p57( Kip2) (Cdkn1c) gene: implications for the human disorder, Beckwith--Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*, **10**, 1601-9. (2001).

Joseph, P., Lei, Y.X., Whong, W.Z. and Ong, T.M., Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene. *J Biol Chem*, **277**, 6131-6. (2002).

Justement, L.B., The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of B lymphocyte activation. *Int Rev Immunol*, **20**, 713-38 (2001).

Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A. and Tryggvason, K., Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*, **1**, 575-82. (1998).

Kidney Developmental Database, The Kidney Developmental Database, UK Medical Research Council, Swiss National Science Foundation, Internet: <http://golgi.ana.ed.ac.uk/kidhome.html>, (2001).

Kim, Y.G., Alpers, C.E., Brugarolas, J., Johnson, R.J., Couser, W.G. and Shankland, S.J., The cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 limits glomerular epithelial cell proliferation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int*, **55**, 2349-61. (1999).

Kim, Y.H., Goyal, M., Wharram, B., Wiggins, J., Kershaw, D. and Wiggins, R., GLEPP1 Receptor Tyrosine Phosphatase (Ptpro) in Rat PAN Nephrosis. a marker of acute podocyte injury. *Nephron*, **90**, 471-6. (2002).

Kobayashi, N., Reiser, J., Schwarz, K., Sakai, T., Kriz, W. and Mundel, P., Process formation of podocytes: morphogenetic activity of microtubules and regulation by protein serine/threonine phosphatase PP2A. *Histochem Cell Biol*, **115**, 255-66. (2001).

Kolettas, E., Lymboura, M., Khazaie, K. and Luqmani, Y., Modulation of elongation factor-1 delta (EF-1 delta) expression by oncogenes in human epithelial cells. *Anticancer Res*, **18**, 385-92. (1998).

Kreidberg, J.A., Gene targeting in kidney development. *Med Pediatr Oncol*, **27**, 445-52. (1996a).

Kreidberg, J.A., Donovan, M.J., Goldstein, S.L., Rennke, H., Shepherd, K., Jones, R.C. and Jaenisch, R., Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development*, **122**, 3537-47. (1996b).

Kreidberg, J.A., Sariola, H., Loring, J.M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. and Jaenisch, R., WT-1 is required for early kidney development. *Cell*, **74**, 679-91. (1993).

Kretzler, M., Teixeira, V.P., Unschuld, P.G., Cohen, C.D., Wanke, R., Edenhofer, I., Mundel, P., Schlondorff, D. and Holthofer, H., Integrin-linked kinase as a candidate downstream effector in proteinuria. *Faseb J*, **15**, 1843-5. (2001a).

- Kretzler, M., Teixeira, V.P., Berger, T., Blattner, S.M., Unschuld, P.G., Cohen, C.D. and Schlondorff, D., Altering glomerular epithelial function in vitro using transient and stable transfection. *J Nephrol*, **14**, 211-9. (2001b).
- Kriz, W., Elger, M., Lemley, K. and Sakai, T., Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation. *Kidney Int Suppl*, **30**, S2-9. (1990).
- Kriz, W., Elger, M., Nagata, M., Kretzler, M., Uiker, S., Koeppen-Hageman, I., Tenschert, S. and Lemley, K.V., The role of podocytes in the development of glomerular sclerosis. *Kidney Int Suppl*, **45**, S64-72. (1994a).
- Kriz, W., Mundel, P. and Elger, M., The contractile apparatus of podocytes is arranged to counteract GBM expansion. *Contrib Nephrol*, **107**, 1-9 (1994b).
- Kroczek, R.A., Gunter, K.C., Seligmann, B. and Shevach, E.M., Induction of T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies. *J Immunol*, **136**, 4379-84. (1986).
- Kuure, S., Vuolteenaho, R. and Vainio, S., Kidney morphogenesis: cellular and molecular regulation. *Mech Dev*, **92**, 31-45. (2000).
- Lee, Y.I. and Kim, S.J., Transcriptional repression of human insulin-like growth factor-II P4 promoter by Wilms' tumor suppressor WT1. *DNA Cell Biol*, **15**, 99-104. (1996).
- Li, D.Y., Brooke, B., Davis, E.C., Mecham, R.P., Sorensen, L.K., Boak, B.B., Eichwald, E. and Keating, M.T., Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*, **393**, 276-80. (1998).
- Little, M. and Wells, C., A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum Mutat*, **9**, 209-25 (1997).
- Luo, L., Salunga, R.C., Guo, H., Bittner, A., Joy, K.C., Galindo, J.E., Xiao, H., Rogers, K.E., Wan, J.S., Jackson, M.R. and Erlander, M.G., Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. *Nat Med*, **5**, 117-22. (1999).
- Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M.G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A.G., Johnston, J.A., Candotti, F., O'Shea, J.J. and et al., Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature*, **377**, 65-8. (1995).
- Martinerie, C., Chevalier, G., Rauscher, F.J., 3rd and Perbal, B., Regulation of nov by WT1: a potential role for nov in nephrogenesis. *Oncogene*, **12**, 1479-92. (1996).
- Mayo, M.W., Wang, C.Y., Drouin, S.S., Madrid, L.V., Marshall, A.F., Reed, J.C., Weissman, B.E. and Baldwin, A.S., WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *Embo J*, **18**, 3990-4003. (1999).
- Med-World AG, Nierenerkrankungen, Internet: [http://www.m-ww.de/krankheiten/nephrologie/anatomie\\_funktion.html](http://www.m-ww.de/krankheiten/nephrologie/anatomie_funktion.html), Berlin (2001).

- Menke, A., McInnes, L., Hastie, N.D. and Schedl, A., The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. *Kidney Int*, **53**, 1512-8. (1998).
- Miner, J.H., Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **7**, 13-9. (1998).
- Miyamoto, N., Yoshida, M., Kuratani, S., Matsuo, I. and Aizawa, S., Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development*, **124**, 1653-64. (1997).
- Monuki, E.S., Porter, F.D. and Walsh, C.A., Patterning of the dorsal telencephalon and cerebral cortex by a roof plate-Lhx2 pathway. *Neuron*, **32**, 591-604. (2001).
- Mooney, A., Jackson, K., Bacon, R., Streuli, C., Edwards, G., Bassuk, J. and Savill, J., Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol*, **155**, 599-606. (1999).
- Morison, I.M., Becroft, D.M., Taniguchi, T., Woods, C.G. and Reeve, A.E., Somatic overgrowth associated with overexpression of insulin-like growth factor II. *Nat Med*, **2**, 311-6. (1996).
- Mrowka, C. and Schedl, A., Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *J Am Soc Nephrol*, **11 Suppl 16**, S106-15. (2000).
- Muirhead, E.E., The renomedullary system of blood pressure control. *Am J Med Sci*, **295**, 231-3. (1988).
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-50 (1987).
- Mundel, P. and Kriz, W., Structure and function of podocytes: an update. *Anat Embryol (Berl)*, **192**, 385-97. (1995).
- Mundel, P., Heid, H.W., Mundel, T.M., Kruger, M., Reiser, J. and Kriz, W., Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol*, **139**, 193-204. (1997).
- Mundel, P. and Shankland, S.J., Glomerular podocytes and adhesive interaction with glomerular basement membrane. *Exp Nephrol*, **7**, 160-6. (1999).
- Mundel, P., Schwarz, K. and Reiser, J., Podocyte biology: a footstep further. *Adv Nephrol Necker Hosp*, **31**, 235-41 (2001).
- Nagata, M. and Watanabe, T., Podocytes in metanephric organ culture express characteristic in vivo phenotypes. *Histochem Cell Biol*, **108**, 17-25. (1997).
- Nauta, A.J., Daha M.R., Roos A., Induction of Apoptosis by the terminal sequence of complement, Department of Nephrology, Leiden, the Netherlands (2000).

- NCBI-LocusLink, NCBI LocusLink-Datenbank, U.S.Government (2002).
- O'Hare, M.J., Bond, J., Clarke, C., Takeuchi, Y., Atherton, A.J., Berry, C., Moody, J., Silver, A.R., Davies, D.C., Alsop, A.E., Neville, A.M. and Jat, P.S., Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 646-51. (2001).
- Obermuller, N., Morente, N., Kranzlin, B., Gretz, N. and Witzgall, R., A possible role for metalloproteinases in renal cyst development. *Am J Physiol Renal Physiol*, **280**, F540-50. (2001).
- Ogata, T., Muroya, K., Sasagawa, I., Kosho, T., Wakui, K., Sakazume, S., Ito, K., Matsuo, N., Ohashi, H. and Nagai, T., Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int*, **58**, 2281-90. (2000).
- Palmer, R.E., Kotsianti, A., Cadman, B., Boyd, T., Gerald, W. and Haber, D.A., WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol*, **11**, 1805-9. (2001).
- Paul, L.C., Rennke, H.G., Milford, E.L. and Carpenter, C.B., Thy-1.1 in glomeruli of rat kidneys. *Kidney Int*, **25**, 771-7. (1984).
- Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C.E., Mauer, S.M., Manivel, J.C., Striegel, J.E., Houghton, D.C., Junien, C., Habib, R., Fouser, L. and et al., Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell*, **67**, 437-47. (1991).
- Perbal, B., Nuclear localisation of NOVH protein: a potential role for NOV in the regulation of gene expression. *Mol Pathol*, **52**, 84-91. (1999).
- Pilia, G., Hughes-Benzie, R.M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A. and Schlessinger, D., Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet*, **12**, 241-7. (1996).
- Pricci, F., Pugliese, G., Romano, G., Romeo, G., Locuratolo, N., Pugliese, F., Mene, P., Galli, G., Casini, A., Rotella, C.M. and Di Mario, U., Insulin-like growth factors I and II stimulate extracellular matrix production in human glomerular mesangial cells. Comparison with transforming growth factor-beta. *Endocrinology*, **137**, 879-85. (1996).
- Rameshwar, P., Poddar, A., Zhu, G. and Gascon, P., Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts. *J Immunol*, **158**, 3417-24. (1997).
- Ramm, B.H., G., *Biomathematik*, 3 ed., p. 219, Enke, Stuttgart (1987).
- Rauscher, F.J., 3rd, Morris, J.F., Tournay, O.E., Cook, D.M. and Curran, T., Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science*, **250**, 1259-62. (1990).

- Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. and Mundel, P., The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 1-8. (2000).
- Rodewald, R. and Karnovsky, M.J., Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol*, **60**, 423-33. (1974).
- Roos, A., Sato, T., Maier, H., van Kooten, C. and Daha, M.R., Induction of renal cell apoptosis by antibodies and complement. *Exp Nephrol*, **9**, 65-70. (2001).
- Royer-Pokora, B., Ragg, S., Heckl-Ostreicher, B., Held, M., Loos, U., Call, K., Glaser, T., Housman, D., Saunders, G., Zabel, B. and et al., Direct pulsed field gel electrophoresis of Wilms' tumors shows that DNA deletions in 11p13 are rare. *Genes Chromosomes Cancer*, **3**, 89-100. (1991).
- Royer-Pokora, B., Loos, U. and Ludwig, W.D., TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11). *Oncogene*, **6**, 1887-93. (1991).
- Royer-Pokora, B., Schumacher, V., Wilms-Tumor. In: D. Ganten, Ruckpaul, K. (ed.), *Hereditäre Tumorerkrankungen*, Springer, Berlin (2001).
- Rupprecht, H.D., Drummond, I.A., Madden, S.L., Rauscher, F.J., 3rd and Sukhatme, V.P., The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J Biol Chem*, **269**, 6198-206. (1994).
- Sakurai, H., Bush, K.T. and Nigam, S.K., Identification of pleiotrophin as a mesenchymal factor involved in ureteric bud branching morphogenesis. *Development*, **128**, 3283-93. (2001).
- Saleem, M.A., O'Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W. and Mundel, P., A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*, **13**, 630-8. (2002).
- Scharnhorst, V., van der Eb, A.J. and Jochemsen, A.G., WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*, **273**, 141-61. (2001).
- Schlessinger, J. and Ullrich, A., Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron*, **9**, 383-91. (1992).
- Schmidt, T., *Physiologie des Menschen*, 26 ed., Springer, Heidelberg (1995).
- Schumacher, V., Scharer, K., Wuhl, E., Altrogge, H., Bonzel, K.E., Guschmann, M., Neuhaus, T.J., Pollastro, R.M., Kuwertz-Broking, E., Bulla, M., Tondera, A.M., Mundel, P., Helmchen, U., Waldherr, R., Weirich, A. and Royer-Pokora, B., Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations. *Kidney Int*, **53**, 1594-600. (1998).
- Schuster, N. and Krieglstein, K., Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res*, **307**, 1-14. (2002).

- Selleck, S.B., Proteoglycans and pattern formation: sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet*, **16**, 206-12. (2000).
- Settle, S., Marker, P., Gurley, K., Sinha, A., Thacker, A., Wang, Y., Higgins, K., Cunha, G. and Kingsley, D.M., The BMP family member Gdf7 is required for seminal vesicle growth, branching morphogenesis, and cytodifferentiation. *Dev Biol*, **234**, 138-50. (2001).
- Shah, V., Bharadwaj, S., Kaibuchi, K. and Prasad, G.L., Cytoskeletal organization in tropomyosin-mediated reversion of ras-transformation: Evidence for Rho kinase pathway. *Oncogene*, **20**, 2112-21. (2001).
- Shankland, S.J., Hamel, P. and Scholey, J.W., Cyclin and cyclin-dependent kinase expression in the remnant glomerulus. *J Am Soc Nephrol*, **8**, 368-75. (1997).
- Shiozawa, S., Participation of macrophages in glomerular sclerosis through the expression and activation of matrix metalloproteinases. *Pathol Int*, **50**, 441-57. (2000).
- Smeets, H.J., Knoers, V.V., van de Heuvel, L.P., Lemmink, H.H., Schroder, C.H. and Monnens, L.A., Hereditary disorders of the glomerular basement membrane. *Pediatr Nephrol*, **10**, 779-88. (1996).
- Smoyer, W.E., Mundel, P., Gupta, A. and Welsh, M.J., Podocyte alpha-actinin induction precedes foot process effacement in experimental nephrotic syndrome. *Am J Physiol*, **273**, F150-7. (1997).
- Smoyer, W.E. and Mundel, P., Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med*, **76**, 172-83. (1998).
- Sorokin, L. and Ekblom, P., Development of tubular and glomerular cells of the kidney. *Kidney Int*, **41**, 657-64. (1992).
- Spirin, K.S., Ljubimov, A.V., Castellon, R., Wiedoeft, O., Marano, M., Sheppard, D., Kenney, M.C. and Brown, D.J., Analysis of gene expression in human bullous keratopathy corneas containing limiting amounts of RNA. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 3108-15. (1999).
- Srinivas, S., Goldberg, M.R., Watanabe, T., D'Agati, V., al-Awqati, Q. and Costantini, F., Expression of green fluorescent protein in the ureteric bud of transgenic mice: a new tool for the analysis of ureteric bud morphogenesis. *Dev Genet*, **24**, 241-51 (1999).
- Steinhausen, M., Snoei, H., Parekh, N., Baker, R. and Johnson, P.C., Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int*, **23**, 794-806. (1983).
- Stöber, J., Entwicklung und erste Befunde zur Reliabilität und Validität. *Diagnostica*, **45**, 173-77 (1999).

- Stuart, R.O., Bush, K.T. and Nigam, S.K., Changes in global gene expression patterns during development and maturation of the rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5649-54. (2001).
- Suzuki, K. and Takahashi, K., Actin filament assembly and actin-myosin contractility are necessary for anchorage- and EGF-dependent activation of phospholipase Cgamma. *J Cell Physiol*, **189**, 64-71. (2001).
- Takemura, T., Murakami, K., Miyazato, H., Yagi, K. and Yoshioka, K., Expression of Fas antigen and Bcl-2 in human glomerulonephritis. *Kidney Int*, **48**, 1886-92. (1995).
- Tryggvason, K. and Wartiovaara, J., Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **10**, 543-9. (2001).
- Udayakumar, T.S., Stratton, M.S., Nagle, R.B. and Bowden, G.T., Fibroblast growth factor-1 induced promatrilysin expression through the activation of extracellular-regulated kinases and STAT3. *Neoplasia*, **4**, 60-7. (2002).
- van Damme, H., Brok, H., Schuurin-Scholtes, E. and Schuurin, E., The redistribution of cortactin into cell-matrix contact sites in human carcinoma cells with 11q13 amplification is associated with both overexpression and post-translational modification. *J Biol Chem*, **272**, 7374-80. (1997).
- van den Berg, J., The Podocyte, Berg, Jose v. d., Amsterdam (2001).
- Van Gelder, R.N., von Zastrow, M.E., Yool, A., Dement, W.C., Barchas, J.D. and Eberwine, J.H., Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1663-7. (1990).
- Vaziri, H. and Benchimol, S., Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol*, **8**, 279-82. (1998).
- Venkateshan, V.S. and Marquet, E., Heat shock protein 72/73 in normal and diseased kidneys. *Nephron*, **73**, 442-9 (1996).
- Vernon, S.D., Unger, E.R., Rajeevan, M., Dimulescu, I.M., Nisenbaum, R. and Campbell, C.E., Reproducibility of alternative probe synthesis approaches for gene expression profiling with arrays. *J Mol Diagn*, **2**, 124-7. (2000).
- Voldborg, B.R., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M. and Poulsen, H.S., Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann Oncol*, **8**, 1197-206. (1997).
- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q. and Deuel, T.F., The Wilms' tumor gene product WT1 activates or suppresses transcription through separate functional domains. *J Biol Chem*, **268**, 9172-5. (1993a).



- Wang, Z.Y., Qiu, Q.Q., Enger, K.T. and Deuel, T.F., A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8896-900. (1993b).
- Wang, Z., Symons, J.M., Goldstein, S.L., McDonald, A., Miner, J.H. and Kreidberg, J.A., (Alpha)3(beta)1 integrin regulates epithelial cytoskeletal organization. *J Cell Sci*, **112**, 2925-35. (1999a).
- Wang, L. and Dobberstein, B., Oligomeric complexes involved in translocation of proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett*, **457**, 316-22. (1999b).
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. and Morin, G.B., Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, **17**, 498-502. (1997).
- Welsch, T., Endlich, N., Kriz, W. and Endlich, K., CD2AP and p130Cas localize to different F-actin structures in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, **281**, F769-77. (2001).
- Wiegand, P.D., J.; Brinkmann, B., DNA-Degradation in formalinfixierten Geweben. *Pathologe*, **17**, 451-54 (1996).
- Wu, C. and Dedhar, S., Integrin-linked kinase (ILK) and its interactors: a new paradigm for the coupling of extracellular matrix to actin cytoskeleton and signaling complexes. *J Cell Biol*, **155**, 505-10. (2001).
- Yamada, H., Denzer, A.J., Hori, H., Tanaka, T., Anderson, L.V., Fujita, S., Fukuta-Ohi, H., Shimizu, T., Ruegg, M.A. and Matsumura, K., Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane. *J Biol Chem*, **271**, 23418-23. (1996).
- Yang, Y., Jeanpierre, C., Dressler, G.R., Lacoste, M., Niaudet, P. and Gubler, M.C., WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am J Pathol*, **154**, 181-92. (1999).
- Yang, Y., Zhang, S.Y., Sich, M., Beziau, A., van den Heuvel, L.P. and Gubler, M.C., Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr Nephrol*, **16**, 429-38. (2001).
- York, J.D., Veile, R.A., Donis-Keller, H. and Majerus, P.W., Cloning, heterologous expression, and chromosomal localization of human inositol polyphosphate 1-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5833-7. (1993).

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

---

Gerald Pitschke  
geboren am 15.04.1972 in Wuppertal  
unverheiratet, ortsungebunden

## Schulbildung

---

07/1978 – 06/1982                      Grundschule in Velbert  
07/1982 – 06/1991                      Gymnasium mit Abitur in Velbert

## Zivildienst

---

10/1991 – 09/1992                      Zivildienst im Zentrallabor des Alfried Krupp Krankenhauses in Essen

## Hochschulbildung

---

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

10/1992 – 03/1999                      Biologie mit Abschluß Diplom  
Thema der Diplomarbeit: Molekulargenetische und in vivo  
Untersuchungen zur Galaktosämie

## Promotion

---

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

04/1999 – 0/2002                      Institut für Humangenetik und Anthropologie, Thema der Promotion:  
Molekulare Charakterisierung des Wilms-Tumor 1-Gens bei der  
Pathogenese des kongenitalen, infantilen nephrotischen Syndroms  
Förderung der Promotion durch die Fritz-Thyssen-Stiftung

## Berufstätigkeit

---

02/1995 – 02/1999                      Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik und Anthropologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
04/1999 – 04/2002                      Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Humangenetik und  
Anthropologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, 10. Juli 2002

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Valérie Schumacher für die freundliche Überlassung des Themas, ihre Betreuung, ihre engagierte Unterstützung, viele wichtige Anregungen, ihr zur Verfügung gestelltes Wissen, ihre tatkräftige Hilfe und ständige Gesprächsbereitschaft. Außerdem danke ich Ihr für die konstruktive Kritik und die Korrekturen bei der Anfertigung der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt außerdem meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Royer-Pokora für die Möglichkeit die Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Ihre zahlreichen Ideen, ihre Betreuung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihr für das Gutachten und die Abnahme der Prüfung.

Herrn Prof. Dr. Wagner möchte ich herzlich für das Gutachten und für seine Unterstützung danken. Sein Mitwirken bei den organisatorischen Belangen der Dissertation war sehr hilfreich. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für das Gutachten und die Bereitschaft zur Abnahme der Prüfung.

Frau Prof. Dr. Bickel und den Herren Prof. Dr. Heinlein, Prof. Dr. Martin und Prof. Dr. Rüter danke ich für die Bereitschaft zur Abnahme der Prüfung.

Ich möchte mich auch bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung und ihre Hilfe zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt deshalb Herrn Prof. H. Pavenstädt von der Universitäts-Klinik Freiburg, der mich in das Anlagen primärer Podozytenkulturen eingewiesen hat und normale Podozyten zur Verfügung gestellt hat, PD Dr. T. Benzing von der Universitäts-Klinik Freiburg für die Transfektion der Podozyten und Prof. H. Holthöfer (Finnland) sowie PD Dr. P. Mundel (USA) für die Überlassung von Antikörpern.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Kollegen im Institut für Humangenetik und Anthropologie, für ihre angenehme Zusammenarbeit und viele Hilfestellungen; besonders bedanken möchte ich mich bei Dipl. Biol. I. Gerasimovski, Dr. S. Sonner, Steffi Schuhen, Petra Krensel und Marlies Jacobi.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Freundin, die mit liebevoller Unterstützung und immenser Geduld einen maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die durch kleinere und größere Hilfestellungen wie Korrekturlesen und konstruktiver Kritik zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Förderung meiner Promotion durch die Fritz-Thyssen-Stiftung bedanke ich mich sehr.