

**Aufklärung molekularer Pathomechanismen
des *WT1*-assoziierten nephrotischen Syndroms**

Inaugural - Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Stefanie Jeruschke
aus Siegen
September 2007

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

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

Referentin: Prof. Dr. B. Royer-Pokora

Koreferent: Prof. Dr. W. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Dezember 2007

Für meinen Mann Kay

„Wir müssen unbedingt Raum für Zweifel lassen, sonst gibt es keinen Fortschritt, kein Dazulernen. Man kann nichts Neues herausfinden, wenn man nicht vorher eine Frage stellt. Und um zu fragen, bedarf es des Zweifelns.“

Richard P. Feynman (1918-1988), US-amerikanischer Physiker und Nobelpreisträger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Nierenentwicklung	1
1.2	Aufbau und Funktion der Glomeruli	3
1.3	Molekulare Struktur der Podozyten	5
1.4	Denys-Drash Syndrom (DDS)	7
1.4.1	Klinisches Bild und Pathologie	7
1.4.2	Molekulargenetische Grundlagen des Denys-Drash Syndroms	8
1.4.3	Therapie des Denys-Drash Syndroms	12
1.5	Das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (CNF)	13
1.6	Ziel der Arbeit	14
2	Material	16
2.1	Chemikalien	16
2.2	Radiochemikalien	16
2.3	Enzyme	16
2.4	Größenmarker	17
2.5	Zelllinien	17
2.6	Bakterien	17
2.7	Vektoren und Konstrukte	17
2.8	Kulturmedien und Antibiotika-Lösungen	18
2.9	Puffer und Lösungen	19
2.10	Oligonukleotide	21
2.11	siRNAs (Qiagen)	24
2.12	Antikörper	24
2.13	Verbrauchsmaterialien	25
2.14	Software	25
2.15	Geräte	26
3	Patienten und Normalkontrollen	27
4	Methoden	29
4.1	Zellkultur	30
4.2	Transfektion	31
4.3	DNA-Analysen	32
4.4	RNA-Analysen	35
4.5	Array-Analysen	44
4.6	Protein-Analysen	47
5	Ergebnisse	54
5.1	Untersuchung der glomerulären Differenzierung beim Denys-Drash Syndrom	54
5.1.1	Bestimmung des Differenzierungsgrades von Podozyten	54
5.1.2	Bestimmung des Differenzierungsgrades der glomerulären Basalmembran (GBM)	63
5.2	Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen	66
5.2.1	Nachweis von Podozytenmarkern mittels Immunfluoreszenz	66
5.2.2	Nachweis von Podozytenmarkern mittels semiquantitativer RT-PCR	69
5.3	Expressionsanalysen von glomerulären Nierenzellen	72
5.3.1	Clontech-Arrays	73
5.3.2	Affymetrix-Arrays	80
5.4	Auffinden putativer WT1-Zielgene	94
5.4.1	Optimierung des siRNA vermittelten WT1 Knock-downs	95

5.4.2	Erstellung der Expressionsprofile von Podozyten und HEK293-Zellen, in denen <i>WT1</i> über eine spezifische siRNA herunterreguliert wurde	97
5.5	Validierung der differenziell exprimierten Gene aus den Array-Analysen	111
5.5.1	Auswahl der zu verifizierenden Gene	111
5.5.2	Verifikation auf mRNA-Ebene	116
5.5.3	Verifikation auf Protein-Ebene	124
5.5.4	Verifikation podozytärer und mesangialer Marker	128
6	Diskussion	131
6.1	<i>WT1</i> Missense-Mutationen führen zu einer gestörten glomerulären Reifung beim Denys-Drash Syndrom	132
6.1.1	Bestimmung der Podozytenreifung bei Denys-Drash Patienten	133
6.1.2	Bestimmung der GBM-Reifung bei Denys-Drash Patienten	137
6.2	Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen	141
6.3	Expressionsprofile von Podozyten-Zellkulturen	142
6.4	<i>WT1</i> Knock-down in adulten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person und embryonalen Nierenzellen (HEK293) mittels RNAi-Technik	154
7	Zusammenfassung	160
8	Abstract	163
9	Literaturverzeichnis	165

Danksagung

Lebenslauf

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	m	milli ($\times 10^{-3}$)/Meter
%	Prozent	m ²	Quadratmeter
μ	micro ($\times 10^{-6}$)	M	Molarität/Methanol
A	Amper/Affymetrix	min	Minute
A/M	Aceton/Methanol	Mo	Monat
AA	Atlas Array	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
APS	Ammoniumpersulfat	n	nano ($\times 10^{-9}$)
AS	Aminosäure	Nr.	Nummer
B	Basen	NAK	„normale“ adulte Niere
Bp	Basenpaar	NEK	„normale“ embryonale Niere
bzw.	beziehungsweise	NN	„normale“ gesunde Niere
c	zenti	NS	nephrotisches Syndrom
C	Clontech	OD	optische Dichte
ca.	circa	p	piko ($\times 10^{-12}$)/p-Wert
cDNA	komplementäre („copy“) DNA zur mRNA	PAA	Polyacrylamid
cm ²	Quadratcentimeter	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
CNF	kongenitales nephrotisches Syndrom vom finnischen Typ	R	rechts
cRNA	komplementäre („copy“) RNA	R ²	Bestimmtheitsmaß
C _T	„threshold cycle“	RISC	RNA-induzierter Silencing Komplex
d	dezi	RNA	Ribonukleinsäure
DA	Dalton	RNAi	RNA-Interferenz
dH ₂ O	destilliertes Wasser	rpm	„rounds per minute“
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser	rRNA	ribosomale RNA
DDS	Denys-Drash Syndrom	RT	Reverse Transkription/Raumtemperatur
DMS	diffuse mesangiale Sklerose	S	Sedimentationskonstante
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SDS	Sodium Dodecylsulfat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	SDTF	Standardfehler
dsDNA	doppelsträngige DNA	sec/s	Sekunde
dsRNA	doppelsträngige RNA	siRNA	„short interfering RNA“
DTT	Dithiothreitol	SSW	Schwangerschaftswoche
et al.	et alteri (= und andere)	tRNA	Transfer-RNA
FC	„fold change“	TRS	Target Retrieval Solution
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat	U	Unit
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer	u.a.	unter anderem
FSGS	fokale segmentale Glomerulosklerose	ÜN	über Nacht
g	Gramm/Erdbeschleunigung	V	Volt
GBM	glomeruläre Basalmembran	vs.	gegen
h	Stunde	v/v	Volumenprozent
HRP	Horse-radish-peroxidase	Vol	Volumen
IF	Immunfluoreszenz	W	Watt
Ig	Immunglobulin	WAGR	<u>W</u> ilms'-Tumor, <u>A</u> niridie, <u>G</u> enitalfehlbildungen, mentale <u>R</u> etardierung
IHC	Immunhistochemie	WB	Western-Blot
IVT	<i>in vitro</i> Transkription	WT1	Wilms'-Tumor1-Gen
J	Jahr	WT1	Wilms'-Tumor1-Protein
k	kilo ($\times 10^3$)	w/v	Gewichtsprozent
KO	Knock-down	z.B.	zum Beispiel
KTS	Lysin/Threonin/Arginin	z.T.	zum Teil
l	Liter/links	ZK	Zellkultur
LCM	Laser Capture Mikrodisektion	ZF	Zinkfinger

1 Einleitung

Beim nephrotischen Syndrom handelt es sich um eine Nierenerkrankung, die sich klinisch durch eine ausgeprägte Proteinurie $> 3,5 \text{ g/Tag}/1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche, eine Hypoalbuminämie ($< 2,5 \text{ g/dl Serum}$) und eine Hyperlipidämie kennzeichnet. Ursache ist die erhöhte Permeabilität der glomerulären Kapillaren für Plasmaeiweiße mit konsekutiver Proteinurie. Das kongenitale/infantile nephrotische Syndrom ist ein heterogenes Krankheitsbild und kann u.a. in das nephrotische Syndrom vom finnischen Typ, welches durch Mutationen im *NPHS1*-Gen verursacht wird (Kestila et al., 1998), und in die diffuse mesangiale Sklerose (DMS) unterteilt werden. 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 Hauptcharakteristikum des DDS, der Glomerulopathie, kommt es zum Auftreten von urogenitalen Fehlbildungen, wie dem Pseudohermaphroditismus masculinus, und bei einem Teil der Patienten zu einer frühen, zum Teil beidseitigen Ausbildung von Wilms'-Tumoren der Nieren (Wilms, 1899). Das Risiko eines DDS-Patienten, einen Wilms'-Tumor zu entwickeln, liegt zwischen 50-90 % (Coppes et al., 1994). Die progressive Niereninsuffizienz geht der Tumormanifestation jedoch oft um Jahre voraus.

1.1 Nierenentwicklung

Es ist von Bedeutung, die Vorgänge während der Nierenentwicklung zu verstehen, um die Entstehung des kongenitalen/infantilen nephrotischen Syndroms nachvollziehen zu können.

Zu Beginn der Nierenentwicklung wächst aus dem WOLFF-Gang, kurz vor dessen Einmündung in die Kloake, eine dorsal gerichtete Ausstülpung, die Ureterknospe. Diese nimmt Verbindung mit dem kaudal verbleibenden Teil des nephrogenen Stranges, dem metanephrogenen Blastem, auf und induziert dieses zur Kondensation. Das Blastem induziert reziprok die Ureterknospe zur Verzweigung. Hieraus entsteht ein Sammelrohrsystem, dessen Zweige jeweils mit einer terminalen Ampulle enden. Das jeder Ampulle aufsitzende metanephrogene Gewebe kondensiert und entwickelt sich über Zwischenstufen („renal vesicle“, „comma-shaped“- und „s-shaped body“) zu Glomeruli und Tubuli (siehe Abbildung 1.1). Jeder Tubulus steht an einem Ende in Verbindung mit einem Sammelrohr, das in den Ureter führt, während sich auf der entgegengesetzten Seite die BOWMAN-Kapsel entwickelt, die den Glomerulus, in dem Flüssigkeit aus dem Blut filtriert wird, umschließt. Zwischen diesen beiden Endpunkten ist der Tubulus gewunden und besteht aus epithelialen Zellen, die sich auf die Rückresorption von verschiedenen Ionen aus dem Primärharn spezialisieren. Tubuli und Glomeruli bilden zusammen die funktionellen Einheiten der Niere, die Nephrone, von denen es

in der Niere etwa eine Million gibt. Da am Ende der Embryonalentwicklung die terminalen Ampullen verschwinden, können später keine weiteren Nephrone nachgebildet werden.

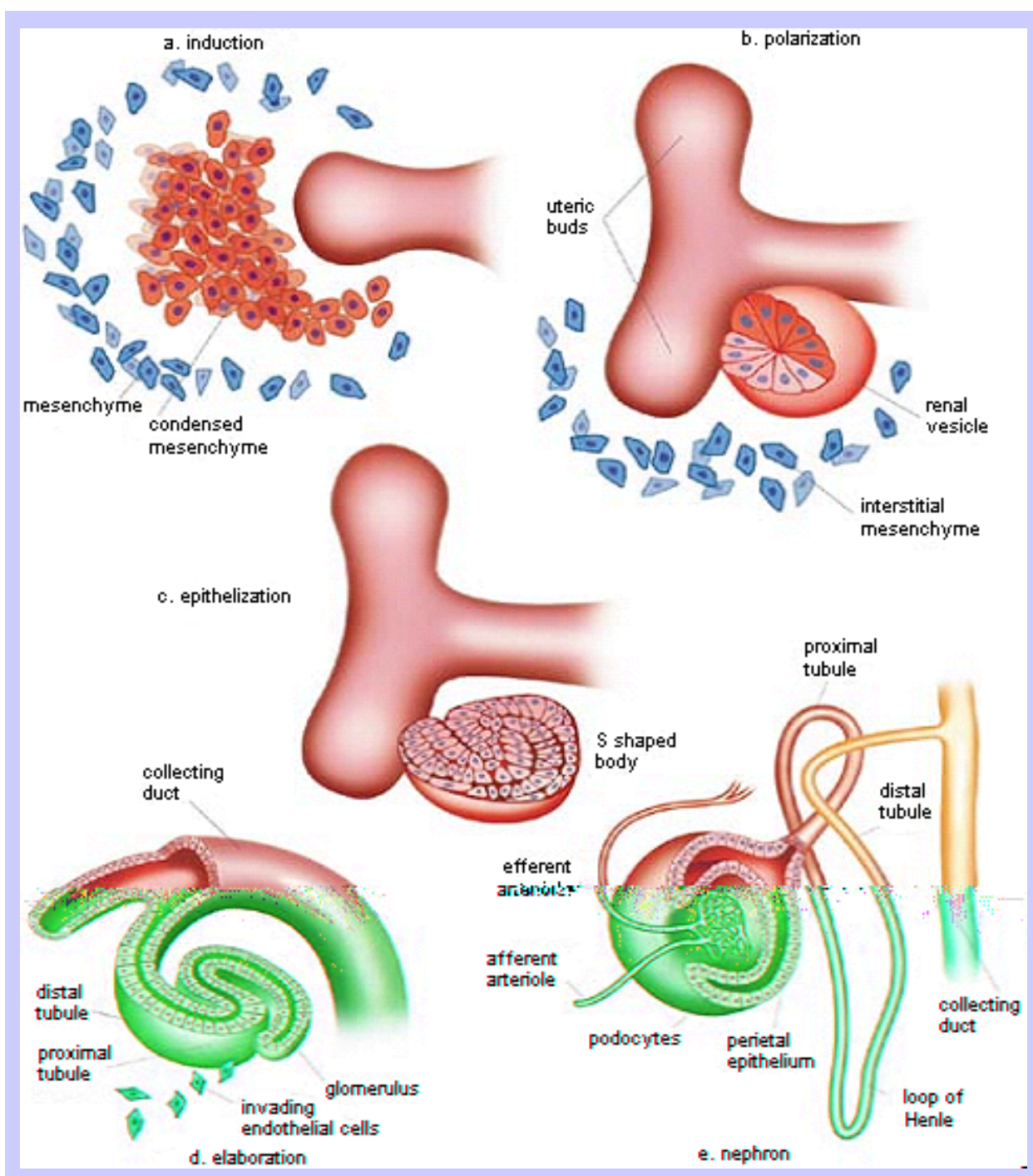


Abbildung 1.1: Entwicklung der Niere aus mesenchymalem Gewebe. (übernommen aus „The Kidney. From normal development to congenital disease“; Vize et al., 2003). Die Niere entwickelt sich aus einem lockeren Mesenchymverband, dem metanephrogenen Blastem, das von der Ureterknospe dazu angeregt wird, Tubuli zu bilden. Umgekehrt veranlasst das Mesenchym die Ureterknospe dazu auszuwachsen und sich zu verzweigen, um die mit dem Ureter verbundenen Sammelrohre der Niere hervorzubringen. Die Mesenchymzellen schließen sich zu dichteren Zellgruppen zusammen, aus denen sich epitheliale Kanälchen (Tubuli) entwickeln. Jedes von ihnen öffnet sich am einen Ende in das aus der Ureterknospe entstandene Sammelsystem und bildet am anderen Ende die BOWMAN-Kapsel, die aus dem von ihr umschlossenen Kapillarknäuel (Glomerulus) den Primärharn aufnimmt.

1.2 Aufbau und Funktion der Glomeruli

Am Gefäßpol geht das parietale Epithel der BOWMAN-Kapsel in das viszerale Epithel (Podozyten) über. Aus der parietalen Basalmembran entwickelt sich die glomeruläre Basalmembran (GBM), die gemeinsam mit den Podozyten die Kapillaren des Glomerulus vom Kapselraum her überzieht. 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) (siehe Abbildung 1.2B).

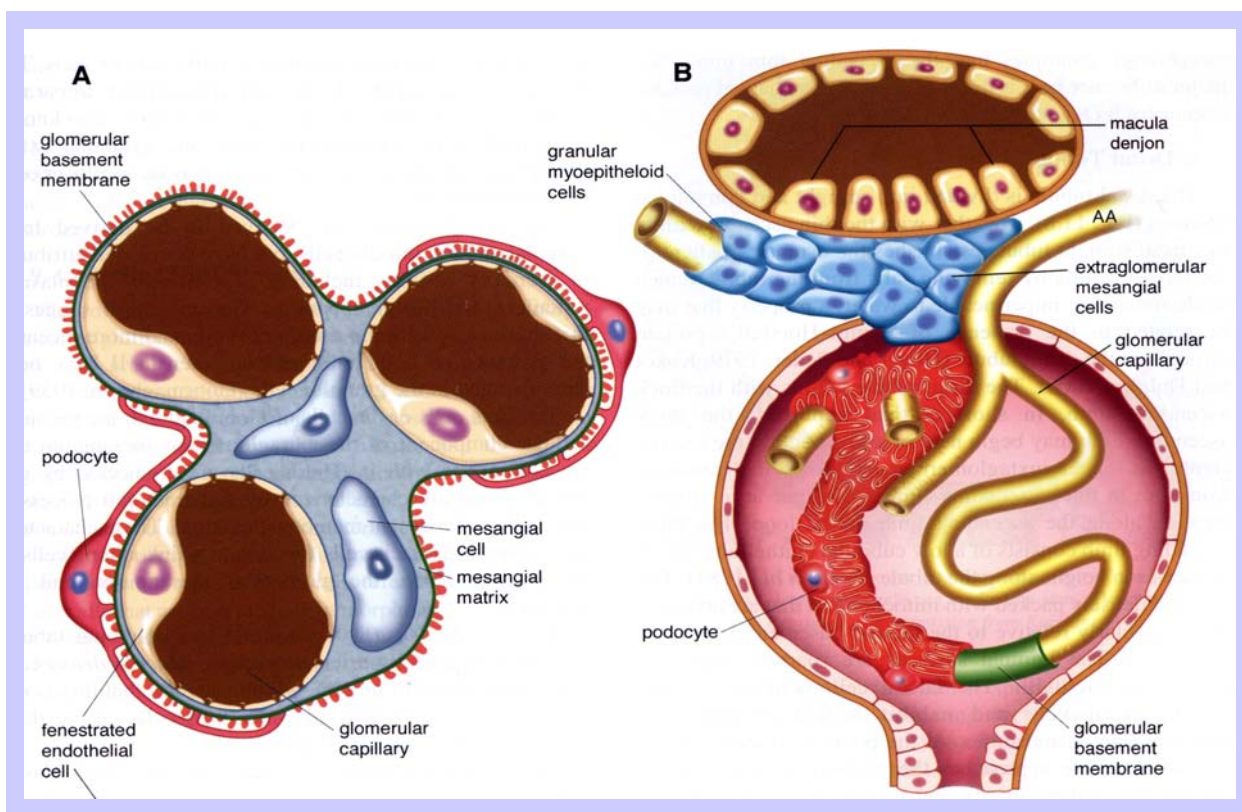
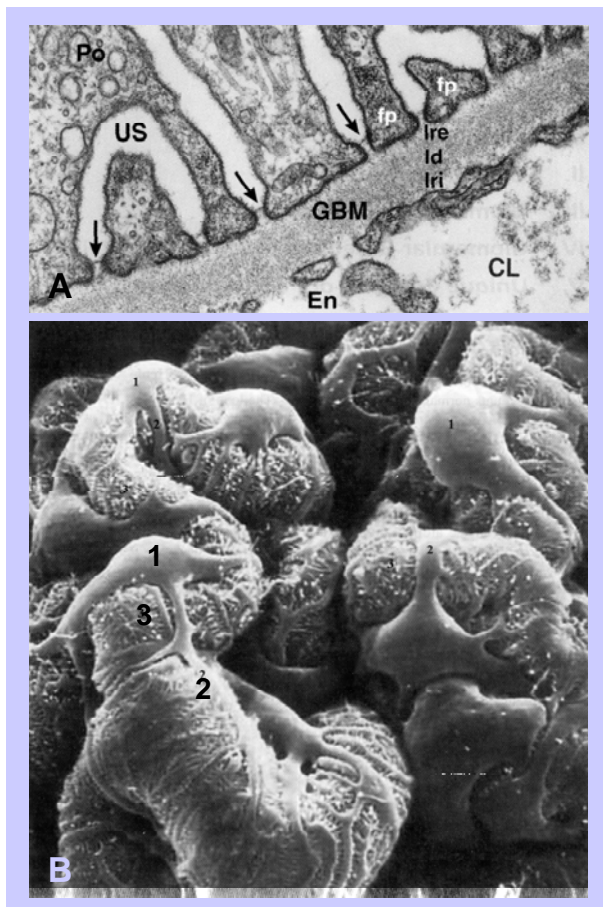


Abbildung 1.2: Glomeruläre und extraglomeruläre Zellen (übernommen aus „The Kidney. From normal development to congenital disease“; Vize et al., 2003). A) zeigt einen Querschnitt durch den Glomerulus. Die Mesangiumzellen sind in die mesangiale Matrix eingelagert und von Kapillaren umgeben, die durch gefenesterte Endothelzellen geformt werden. Die Kapillaren und Mesangiumzellen sind von der GBM (grün) umgeben, auf der die Podozytenfußfortsätze aufsitzen (rot). B) zeigt den ganzen Glomerulus. Die extraglomerulären Mesangiumzellen befinden sich zwischen der *macula densa* und dem vaskulären Pol des Glomerulus. Die afferente Arteriole (AA) ist von spezialisierter glatter Muskulatur umgeben.

Die Funktion des Glomerulus besteht in der Produktion des Primärharns, indem selektiv Komponenten des Blutes durch die Filtrationsbarriere abgepresst werden. Diese besteht aus dem Gefäßendothel, der glomerulären Basalmembran (siehe Abbildung 1.2A) und den Podozyten der BOWMAN-Kapsel (siehe Abbildung 1.2B). Das spezialisierte Gefäßendothel besitzt Poren von 70-100 nm Größe (= gefenestertes Endothel). Dadurch kann es als Barriere für

die zellulären Komponenten des Blutes und größerer Makromoleküle dienen. Die GBM besteht aus der Basallamina des Gefäßendothels und der Basallamina der Podozyten. Sie setzt sich aus einem Netzwerk von Collagen IV, Heparansulfatproteoglykanen, Lamininen und Fibronektin zusammen (Abrahamson, 1987) und ist in drei Schichten gegliedert: der *lamina rara interna*, der



lamina densa und der *lamina rara externa* (siehe Abbildung 1.3A). Die *lamina densa* besteht hauptsächlich aus Collagen IV, Laminin und Fibronektin, während sich in der *lamina rara interna* und *-externa* die Endothelzellen und die Podozyten mit der *lamina densa* verbinden.

Abbildung 1.3 (übernommen aus „The Kidney. From normal development to congenital disease“, Vize et al., 2003): A) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Filtrationsbarriere im Glomerulus. En: gefenestertes Endothel, Po: Podozyten, fp: Fußfortsatz, GBM: glomeruläre Basalmembran, Iri: *lamina rara interna*, Id: *lamina densa*, Ire: *lamina rara externa*, CL: Kapillarlumen, US: urinary space. Die Pfeile kennzeichnen die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen. B) Raster-Elektronenmikroskopische Aufnahme der Kapillaren und der Anordnung der Podozytenzellkörper (1), primären- (2) und sekundären Fußfortsätze (3).

Die äußere Schicht der Filtrationsbarriere besteht aus den hoch spezialisierten Podozyten. Diese Zellen besitzen lange Fußfortsätze, die sie um die glomerulären Kapillaren legen (siehe Abbildung 1.3B). Die primären Fußfortsätze spalten sich weiter in sekundäre Fußfortsätze auf. Diese interagieren miteinander und formen ein Netzwerk, das die Oberfläche der glomerulären Kapillaren bedeckt. Die sekundären Fußfortsätze sind voneinander durch Spalten von 30-40 nm getrennt, die den Filtrationsschlitz darstellen (Venkatachalam und Kriz, 1998). Eine dünne filamentöse Schicht, bekannt als Schlitzmembran, überbrückt den Schlitz zwischen den benachbarten sekundären Fußfortsätzen. Die Schlitzmembran besteht aus Nephrin, Podocin, ZO-1, NEPH1, NEPH2, NEPH3, FAT und CD2AP (Ransom, 2004). Die Filtrationsbarriere ist ein mechanischer Filter, der Makromoleküle zurückhält, die größer als Albumin (69 kDa) sind. Zusätzlich sind viele Komponenten der Barriere, wie z.B. die Glykokalix der sekundären Fußfortsätze, die GBM und die innere Membran des Gefäßendothels negativ geladen. Dieses verhindert den Durchtritt von negativ geladenen Molekülen (z.B. Plasma-Proteinen) durch die Filtrationsbarriere.

Die extraglomerulären Mesangiumzellen sind unregelmäßig geformt und in extrazelluläre Matrix (mesangiale Matrix) eingelagert. Diese liegt zwischen den Mesangiumzellen und dem Gefäßendothel oder der GBM. Abbildung 1.2A veranschaulicht diese Beziehung. Die mesangiale Matrix besteht aus einem Netzwerk von elastischen Fasern und Glykoproteinen, die die Mesangiumzellen mit der GBM und dem Gefäßendothel verbinden (Sterzel et al., 2000). Sowohl die Mesangiumzellen als auch die Matrix sind für die strukturelle Integrität des Glomerulus wichtig und wirken gegen den hydrostatischen Kapillardruck.

Täglich entstehen in den circa zwei Millionen Glomeruli 180 Liter Primärharn. Die größte Menge der Flüssigkeit und auch viele Elektrolyte werden jedoch in den HENLE-Schleifen resorbiert und wieder dem Blut zugeführt.

1.3 Molekulare Struktur der Podozyten

Die Podozyten bilden die äußerste Barriere im Filtrationssystem der Glomeruli. Diese Zellen bestehen aus drei strukturell und funktionell verschiedenen Einheiten: dem Zellkörper, den primären und sekundären Fußfortsätzen (Smoyer und Mundel, 1998). Die Fußfortsätze enthalten Bündel von Mikrofilamenten, wie z.B. Vimentin, Aktin, Myosin II, α -Actinin 4, Talin, Paxillin und Vinculin, die ihnen eine kontraktile Kapazität zuweisen (Mundel und Shankland, 1999). Die Aktin-Filament-Bündel verknüpfen die vielen Fußfortsätze eines jeden Podozyten. Außerdem stehen sie über den kontraktilen Apparat in Verbindung mit der GBM. Hier spielen bei der Verankerung die Transmembranproteine Integrin $\alpha 3\beta 1$ und Dystroglycan eine besondere Rolle. Sie ragen in die GBM hinein und sind dort mit Collagen IV, dem Hauptbestandteil der GBM, mit Agrin, dem häufigsten Heparansulfatproteoglykan in der GBM und mit Laminin 11 fest verbunden (siehe Abbildung 1.4).

Wie wichtig die Verankerung für die korrekte Funktion der Podozyten ist, zeigen verschiedene Knock-out Maus-Modelle (Kretzler et al., 2001). Die *Integrin $\alpha 3$* -Knock-out-Maus weist eine Rückziehung der Podozytenfüße und Veränderungen in der GBM auf (Kreidberg et al., 1996). *Laminin 11*-Knock-out-Mäuse entwickeln einen Phänotyp, der typisch für das kongenitale nephrotische Syndrom ist. Dabei kommt es vor allem zur Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze (Holthöfer et al., 1999). Die GBM von *Laminin $\beta 2$* -Knock-out-Mäusen erscheint zwar normal, aber sie ist reich an Laminin $\beta 1$ -Ketten, was auf einen unreifen Phänotyp hindeutet (Noakes et al., 1995). Die massive Proteinurie dieser Mäuse ist mit einer Rückziehung der Podozytenfüße verbunden.

Bei einer Vielzahl von glomerulären Erkrankungen (z.B. membranöse Nephropathie, diabetische Nephropathie) sind die Podozyten betroffen. Es kommt zu einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, zu einer Verschmelzung der Podozytenfußfortsätze und zu einer

massiven Proteinurie. Diese Veränderungen konnten auch bei Nullmutanten für α -Actinin 4, das bei der Verankerung der Podozyten in der GBM beteiligt ist, und für Podocin, das bei der Funktion der Schlitzmembran eine wichtige Rolle spielt, beobachtet werden. Andere Veränderungen betreffen die glomeruläre Schlitzmembran, die hauptsächlich von Nephrin gebildet wird. Mutationen im *NPHS1*-Gen (kodiert für Nephrin) verursachen das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (CNF). Sehr häufig gehen spätere Stadien glomerulärer Erkrankungen mit einer Verschmelzung der Fußfortsätze, einer Ablösung von Podozyten von der GBM und einer Podozytenhypertrophie sowie einer Vergrößerung der Mesangialzellmatrix einher.

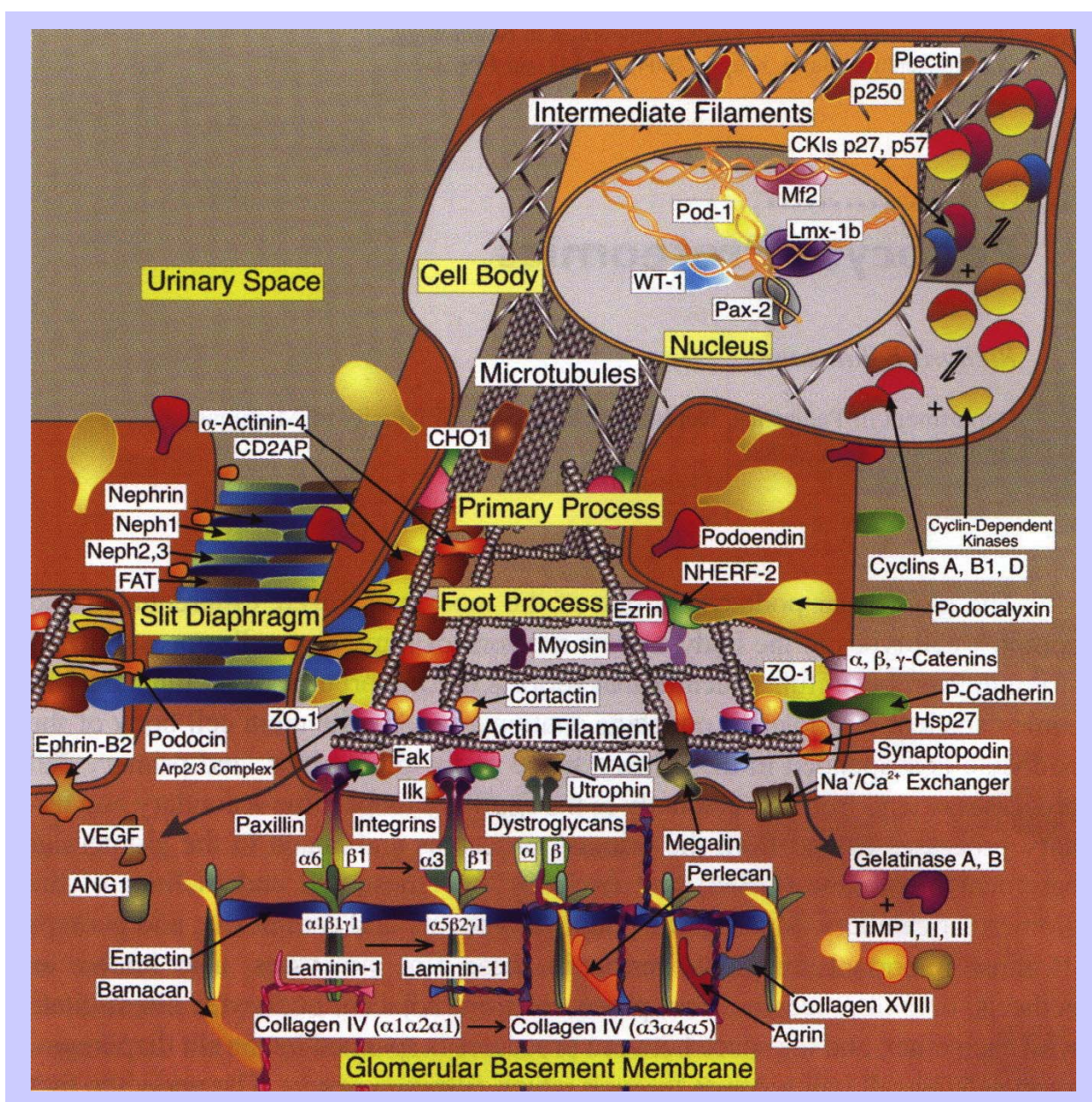


Abbildung 1.4: Proteinzusammensetzung der Podozyten (übernommen aus Ransom, 2004): Zu sehen sind viele Proteine der Podozyten in ihren verschiedenen Domänen (Kern, Zellkörper, primärer Fußfortsatz, sekundärer Fußfortsatz, Schlitzmembran) oder der extrazellulären Umgebung (GBM, Kapselraum).

1.4 Denys-Drash Syndrom (DDS)

Die genetische Ursache des Denys-Drash Syndroms ist ausschließlich in heterozygot vorliegenden Punktmutationen des *Wilms'-Tumor 1*-Gens (*WT1*) zu finden, bei denen es sich oft (90 %) um de novo Keimbahnmutationen handelt.

1.4.1 Klinisches Bild und Pathologie

Bei Neugeborenen tritt das Denys-Drash Syndrom mit einer Häufigkeit von 1:100000 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 oder inkomplette Form und wird wie folgt definiert:

- a) Komplettes DDS: Glomerulopathie und Wilms'-Tumor und intersexuelles Genitale.
- b) Inkomplettes DDS: Glomerulopathie und Wilms'-Tumor
oder Glomerulopathie und intersexuelles Genitale
oder Glomerulopathie.

Das Hauptcharakteristikum ist die Glomerulopathie. Histologisch zeigt sich hierbei in den meisten Fällen eine diffuse mesangiale Sklerose (DMS) und seltener eine fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) (Habib et al., 1985; Jadresic et al. 1990). Klinisch manifestiert sich die Glomerulopathie als rasch progressives nephrotisches Syndrom, welches meist vor dem 2. Lebensjahr zum terminalen Nierenversagen führt. 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 bei karyotypisch männlichen Personen als ein Pseudohermaphroditismus masculinus (weibliche 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. Weibliche Personen zeigen einen normalen weiblichen Phänotyp, weshalb sie oft nicht als DDS-Patienten diagnostiziert werden. 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 Uterus oder Vagina und Strukturen, die vom MÜLLER-Gang abstammen, wie Samenleiter und Nebenhodengang, gleichzeitig vor. Zusätzlich finden sich

auch funktionsunfähige Gonaden, wie Stranggonaden oder unreifes, infantiles oder rudimentäres Hoden- und Ovargewebe (Ovotestis) (Eddy und Mauer, 1985).

Die Wahrscheinlichkeit, einen Wilms'-Tumor zu entwickeln, liegt bei 50-90 %. Deshalb wird bei einem terminalen Nierenversagen eine prophylaktische bilaterale Nephrektomie in Erwägung gezogen.

1.4.2 Molekulargenetische Grundlagen des Denys-Drash Syndroms

Wilms'-Tumor 1-Gen, -mRNA und -Protein

WT1 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle während der Nierenentwicklung und -differenzierung spielt (Hastie, 1994; Englert, 1998; Little et al., 1999). 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 (siehe Abbildung 1.5) (Call et al., 1990; Gessler et al., 1990).

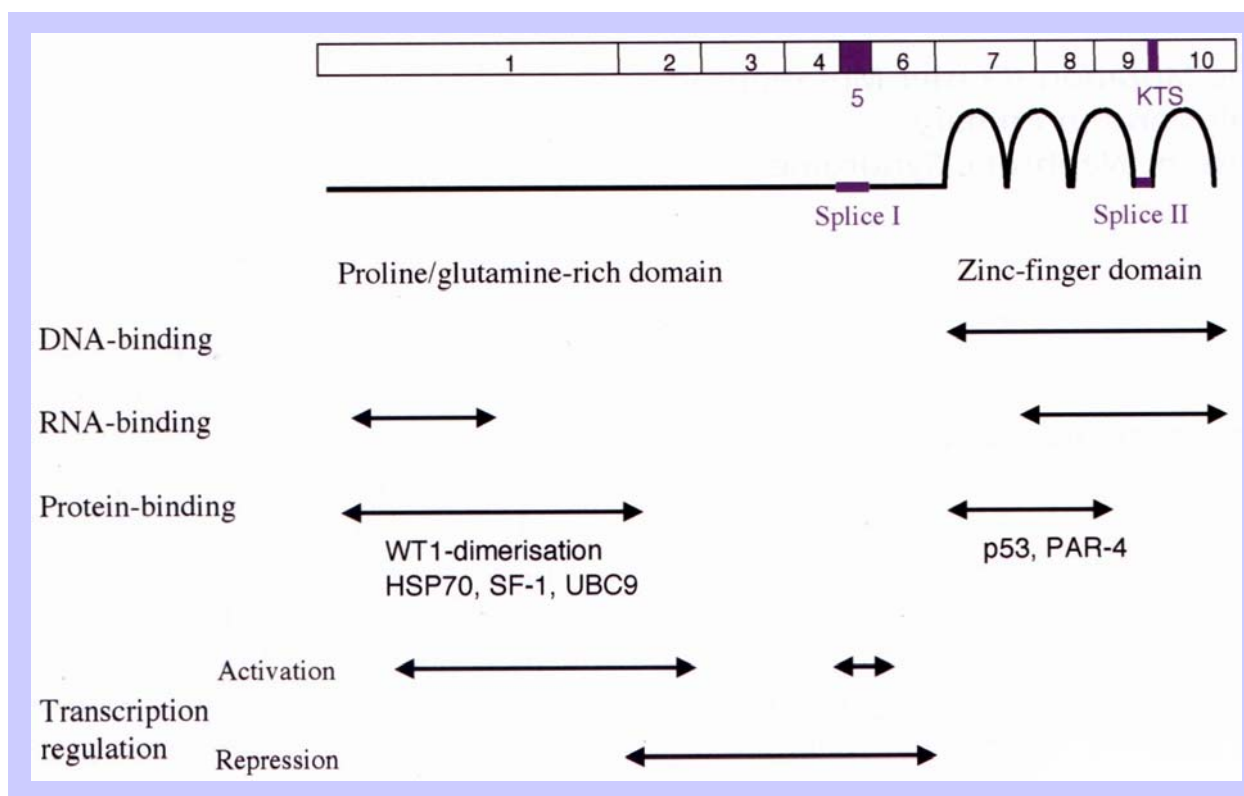


Abbildung 1.5 (übernommen aus „The Kidney. From normal development to congenital disease“; Vize et al., 2003): Struktur der *WT1*-mRNA und des -Proteins mit den zwei alternativen Spleißstellen und den verschiedenen funktionellen Domänen.

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-, Pax2- und auch WT1-Bindestellen. Diese WT1-Bindestellen sind ein Hinweis dafür, dass sich WT1 selbst regulieren kann (Rupprecht et al., 1994). WT1 besitzt viele Eigenschaften, die für einen Transkriptionsfaktor charakteristisch sind: es beinhaltet vier Zinkfinger-Motive (ZF) vom Cys2/His2-Typ im carboxyterminalen Ende (Haber et al., 1991) und eine prolin- und glutaminreiche, transkriptionell aktive Domäne im aminoterminalen Teil (Exons 1-6). Die WT1-Zinkfinger Domänen (Exon 7-10) zeigen eine starke Aminosäuresequenz-Homologie zu anderen ZF-Proteinen, wie z.B. EGR1 (Rauscher et al., 1990). Durch das Vorkommen von zwei alternativen Spleißstellen (Haber et al., 1991), drei Translationsstartstellen (Bruening et al., 1996; Scharnhorst et al., 1999) und RNA-Editing (Sharma et al., 1994) sind 24 Proteinisoformen möglich (Mrowka und Schedl, 2000). Das kodierte nukleäre Protein hat je nach Isoform ein Molekulargewicht zwischen 52 und 65 kDa. Die Rolle der alternativen Translationsstartstellen ist noch unklar.

Durch zwei alternative Spleißstellen in Exon 5 und 9 werden vier verschiedene Transkripte synthetisiert. Die Spleißstelle in Exon 5 führt zu Anwesenheit oder Fehlen des kompletten Exons im Transkript, während die Spleißstelle in Exon 9 nur einen Unterschied von neun Basenpaaren in der mRNA, also drei Aminosäuren (Lysin, Threonin und Serin) im resultierenden Protein ausmacht (+/- KTS). Die vier daraus resultierenden mRNA-Isoformen *WT1* (+Exon 5/+ KTS), *WT1* (+Exon 5/- KTS), *WT1* (-Exon 5/+ KTS) und *WT1* (-Exon 5/- KTS) liegen während der Nierenentwicklung in einem Verhältnis von 8,3 : 2,5 : 3,8 : 1 vor. Nach der Geburt hat sich dieses Verhältnis verändert und beträgt dann 4,0 : 2,2 : 2,5 : 1 (Haber et al., 1991). Die Isoformen unterscheiden sich in ihren DNA-Bindungseigenschaften, ihrem Expressionsmuster und in ihrer Funktion. Larsson und Mitarbeiter (1995) entdeckten mit Immunhistochemie, konfokaler Mikroskopie und Immunpräzipitation, dass die verschiedenen WT1-Isoformen eine unterschiedliche subnukleäre Lokalisation aufweisen, wobei (-KTS)-Formen mit Transkriptionsfaktoren und (+KTS)-Formen mit Spleißkomplexen kolokalisieren. WT1 (-KTS)-Spleißvarianten binden besonders gut an die GC-reiche EGR-1 Konsensussequenz 5'-GCGGGGCG-3' (Rauscher et al., 1990) und eine TC-reiche WT1-Erkennungssequenz (Wang et al., 1993). (+KTS)-Isoformen können zwar auch an DNA binden, scheinen aber eine geringere Spezifität zu haben. Beruhend auf diesen Beobachtungen und der Tatsache, dass WT1 (+KTS) über eine Erkennungssequenz an RNA binden kann (Caricasole et al., 1996), wird postuliert, dass WT1 neben einer transkriptionellen auch eine posttranskriptionelle Aktivität besitzt (Charlieu et al., 1995; Caricasole et al., 1996; Kennedy et al., 1996). Über die Funktion von Exon 5 ist nicht besonders viel bekannt. Es wird vermutet, dass es eine transkriptionsreprimierende Funktion hat (Wang et al., 1995). Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Funktion dieser 17 Aminosäuren-Domäne bei transkriptioneller Aktivierung von einer spezifischen Interaktion mit Par4 abhängig ist (Richard et al., 2001). Mutationen in der 17 Aminosäure-Region führen zu einer gestörten Par4-Interaktion und zu einer fehlenden Aktivierung der Transkription.

WT1-Expression

Bisher ist noch wenig über die Regulation des *WT1*-Gens bekannt. Die Expression von *WT1* lässt vermuten, dass es eine wichtige Rolle während der Nephrogenese spielt. 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 im uninduzierten metanephrischen Mesenchym, später stärker in den Podozytenvorläuferzellen, der „s-shaped bodies“, exprimiert (Armstrong et al., 1992; Pritchard-Jones et al., 1990; Mundlos, 1993). In ausgereiften Glomeruli findet man hohe *WT1*-Level nur noch in den Podozyten (Vize et al., 2003).

Eine *WT1*-Expression konnte ebenfalls in der Genitalleiste, den fötalen Gonaden, dem Mesothel, der Milz, der Dezidua, Teilen des zentralen Nervensystems und dem hämatopoetischen System nachgewiesen werden (Coppes und Pritchard-Jones, 2000). Auffällig ist, dass *WT1* in einer Reihe von Zelltypen (Niere, Gonaden, Mesothel) während der Differenzierung von Mesenchymgewebe zu Epithel exprimiert wird.

Den Beweis, dass WT1 bei der Entwicklung von Nieren und anderen Organen eine essentielle Rolle spielt, liefert die *WT1*-Knock-out-Maus (Kreidberg et al., 1993). Homozygote *WT1* (-/-) Mäuse sterben vor der Geburt an Herz-, Lungen- und Mesothelfehlbildungen. Sehr drastisch sind die Urogenitalfehlbildungen, wie das komplette Fehlen von Nieren und Gonaden. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die Ureterknospe nicht aus dem WOLFF-Gang sprosst und dadurch eine massive Apoptose des metanephritischen Blastems eingeleitet wird. Kreidberg und Mitarbeiter postulierten eine Rolle für WT1 bei der Signalübertragung zwischen Blastem und Ureterknospe. Diese führt zu einer Differenzierung des Blastems und zu Wachstum und Verzweigung der Ureterknospe. Mittlerweile hat diese Arbeitsgruppe herausgefunden, dass die Signalübertragung durch sezerniertes VEGFA geschieht (Gao et al., 2005). Patek und Mitarbeiter (1999) haben zudem gezeigt, dass Mäuse, die für eine trunkierende *WT1*-Mutation (ZF3, Codon 396) heterozygot sind, eine für das Denys-Drash Syndrom typische mesangiale Sklerose und Genitalfehlbildungen entwickeln. Bei einer Maus trat zusätzlich ein Wilms'-Tumor auf. Überraschenderweise fand man, dass das mutierte Protein dabei nur 5 % des insgesamt exprimierten WT1 ausmacht. Eine geringe Menge des mutierten Proteins reicht also für die Entwicklungsstörungen aus.

Die *WT1*-Expressionslevel werden während der Nierenentwicklung präzise reguliert, weshalb man von verschiedenen Funktionen ausgeht, abhängig von der Protein-Menge. Es ist nicht klar, ob die Isoformen in verschiedenen Zelltypen im gleichen Verhältnis exprimiert werden. Ein Shift im Verhältnis der *WT1*-Isoformen könnte Repression, Aktivierung oder auch posttranskriptionelle regulatorische Funktionen spezifizieren.

Mutationen beim Denys-Drash Syndrom

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 Exon 8 oder 9, die für Zinkfinger 2 oder 3 kodieren.

Die häufigste Mutation betrifft den Zinkfinger 3 und ist ein Austausch von Tryptophan gegen Arginin in Codon 394/Base 1180 (Exon 9) (Review: Little und Wells, 1997; Jeanpierre et al., 1998). Arginin ist als positiv geladene Aminosäure wesentlich an der Interaktion mit der DNA beteiligt (siehe Abbildung 1.6). Wird es durch das ungeladene Tryptophan ersetzt, ist die Interaktion der Zinkfingerdomäne mit den ursprünglichen Zielsequenzen gestört. Die Mutation führt folglich dazu, dass das mutierte Protein nicht mehr an seine ursprüngliche Zielsequenz binden kann (Pelletier et al., 1991).

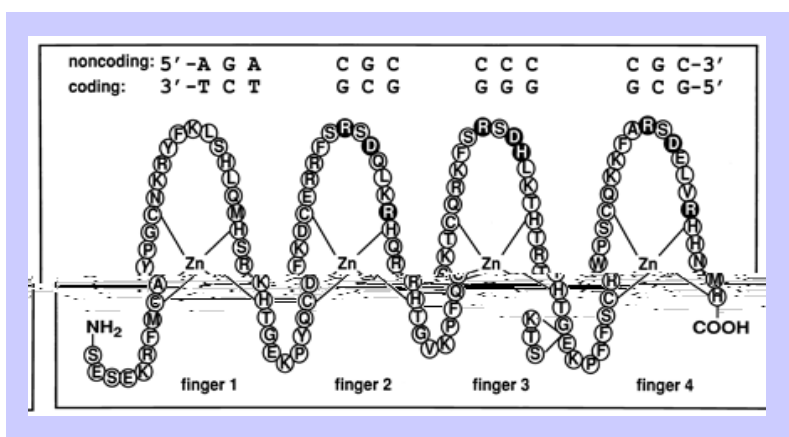


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der WT1-Zinkfingerdomänen (übernommen aus Laity et al., 2000). Oben zu sehen ist die DNA-Sequenz, an die die dargestellte Isoform des WT1-Proteins bindet. Bei der AS Arginin in Zinkfinger 3 handelt es sich um einen Hot Spot, der besonders häufig von Mutationen beim DDS betroffen ist. Die KTS-Spleißstelle zwischen Zinkfinger 3 und 4 ist angedeutet.

Andere Missense-Mutationen kommen in Exon 8 und 9 (ZF2, ZF3) des *WT1*-Gens vor und betreffen Aminosäuren, die an der Interaktion mit der DNA beteiligt sind oder eine Interaktion mit Zn^{2+} -Ionen eingehen (Histidin, Cystein). Deletionen, Insertionen und Nonsense-Mutationen resultieren in der Synthese eines verkürzten Proteins, sind aber sehr selten.

All diese Mutationen ändern die strukturelle Organisation der Zinkfingerregion, führen zum Verlust oder einer Veränderung der DNA-Bindungseigenschaften (Little et al., 1995) und beeinträchtigen damit die regulatorischen Funktionen des WT1-Proteins.

Mehrere Zielgene von WT1 wurden *in vivo* und *in vitro* untersucht, wobei man vor allem negativ aber auch positiv regulierte Gene kennt. WT1 reprimiert eine Vielzahl von Genen, u.a. Gene für Wachstumsfaktoren (*IGF-II*, *TGF- β* , *PDGFA*) (Nichols et al., 1995; Dey et al., 1994; Wang et al., 1992) und Wachstumsfaktorrezeptoren (*EGFR*, *IGFIR*) (Englert et al., 1995; Karnieli et al., 1996). Zu den positiv regulierten Genen gehören z.B. *Syndecan 1*, *Bcl-2* (Mayo et al., 1999) und *IGF-II* (Werner et al., 1995). Die teilweise konträren Ergebnisse der *in vitro*-Studien sind auf experimentell unterschiedliche Bedingungen zurückzuführen. Die Relevanz der *in vitro*-Untersuchungen muss erst noch *in vivo* bestätigt werden (Reddy und Licht., 1996;

Menke et al., 1998; Little et al., 1999).

Es wird postuliert, dass ein mutiertes WT1-Protein seine Zielgene nicht mehr in der ursprünglichen Weise regulieren kann. Dies kann maßgeblich zur Entstehung des DDS-Krankheitsbildes beitragen und würde einem „*loss of function*“ oder dominant-negativen Mechanismus entsprechen. Möglicherweise bindet das mutierte WT1-Protein aber auch an andere, bisher unbekannte Zielgene und reguliert diese fälschlicherweise („*gain of function*“).

Über den molekularen Pathomechanismus beim DDS ist noch nicht viel bekannt. Eine abnormale Expression von WT1 führt bei einigen Patienten zu einer persistierenden PAX2-Expression, die normalerweise ab dem „s-shape“ Stadium nicht mehr zu finden ist (Yang et al., 1999). Diese persistierende Expression von Pax2 führt bei transgenen Mäusen zu einem abnormalen 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 β 1 die Synthese von extrazellulären Matrix-Proteinen stimulieren, was auch bei der DMS zu finden ist. Andere Wissenschaftler demonstrierten, dass eine Überexpression von IGF-II zu renalen Abnormalitäten in Form unreifer und teilweise sklerotierter Glomeruli und hypoplastischer Tubuli führt (Morison et al., 1996).

WT1 kann Homodimere bilden und interagiert auch mit anderen Proteinen, wie z.B. p53, Par4 und Hsp70 (Rauscher, 1993), Ciao1 (Johnstone et al., 1998) und WTAP (Little et al., 2000a,b; Little et al., 1999). Diese sind an Prozessen wie Apoptose, Wachstum und Differenzierung beteiligt. Da bei einigen dieser Interaktionen die Partner über die Zinkfinger-Domäne von WT1 verbunden sind, könnte es auch auf diesem Weg zu einer Beeinflussung von Entwicklungsprozessen durch das mutierte Protein kommen.

1.4.3 Therapie des Denys-Drash Syndroms

Wenn aufgrund der fortschreitenden Niereninsuffizienz die Entgiftung des Körpers über die Nieren nicht mehr gewährleistet ist, besteht die Therapie des DDS wegen eines Nichtansprechens auf Corticosteroide im Wesentlichen in der Dialyse des Blutes gefolgt von einer unilateralen oder bilateralen Nephrektomie und Nierentransplantation. Die Nephrektomie verhindert die Entstehung von Wilms'-Tumoren. Bei Kindern, die jünger als 3 Jahre sind, werden die Nieren von Erwachsenen geteilt und nur Teile der Spenderniere transplantiert. Die Prognose für Kinder mit transplantierten Nieren ist gut. Es ist nicht mit einer erneuten Entwicklung des nephrotischen Syndroms oder eines Wilms'-Tumors zu rechnen. Das

intersexuelle Genital wird normalerweise in die Richtung des äußeren Phänotyps nach männlichem oder weiblichem Genital angepasst.

1.5 Das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ (CNF)

Das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ ist eine autosomal rezessive Krankheit und wird durch Mutationen im *NPHS1*-Gen verursacht (Ahvenainen et al., 1956). Dieses kodiert für das Zelladhäsionsprotein Nephrin. Nephrin wird von den Podozyten produziert und ist in der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen lokalisiert. Die meisten Mutationen im *NPHS1*-Gen führen schon kurz nach der Geburt zu einer massiven Proteinurie und zum nephrotischen Syndrom.

Klinisches Bild und Pathologie

Histologisch findet man eine Proliferation der mesangialen Zellen und eine Dilatation der proximalen und manchmal auch distalen Tubuli. Das tubuläre Epithel kann in fortgeschrittenen Fällen atrophisch sein. Elektronenmikroskopisch findet man eine Fusion und Rückziehung der Podozytenfußfortsätze in den Glomeruli (Huttunen et al., 1980). Diese Erscheinung ist nicht spezifisch für CNF-Patienten, sondern kann bei vielen nephrotischen Nierenerkrankungen beobachtet werden. Den CNF-Patienten fehlt häufig das Protein Nephrin wie auch die Schlitzmembran zwischen den Podozytenfußfortsätzen (Pattrakka et al., 2000).

Nephrin und seine Rolle in der Filtrationsbarriere

Nephrin besitzt eine zentrale Rolle in der Schlitzmembran. *NPHS1* Knock-out Mäusen fehlt die Schlitzmembran. Sie sterben kurz nach der Geburt an einer schweren Proteinurie (Putala et al., 2001). Studien der humanen Glomerulogenese zeigen, dass die frühe Entwicklung und Anordnung der Junction-Komplexe zwischen den sich entwickelnden Podozyten zwar normal verläuft, aber die endgültige Reifung der Schlitzmembran fehlschlägt (Ruotsalainen et al., 2000). Während der normalen Nephrogenese beginnt die Expression von Nephrin ab dem späten „s-shape“ Stadium.

Die aktuelle molekulare Struktur der Schlitzmembran ist noch nicht vollständig gelöst. Man konnte eine Assoziation von Nephrin mit dem CD2-assoziierten Protein (CD2AP) in der Maus nachweisen (Shih et al., 1999). Es ist möglich, dass dieses cytosolische Protein Nephrin in den Podozytenfußfortsätzen verankert. Li et al. (2000) entdeckten eine Koimmunopräzipitation von Nephrin mit CD2AP, was auch wieder eine Verbindung von Nephrin über CD2AP zum Podozyten-Zytoskelett vermuten lässt. Andere extra- und intrazelluläre Interaktionen von Nephrin mit Podozytenmolekülen sind nicht bekannt.

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, Mechanismen, die aufgrund einer heterozygot vorliegenden *WT1*-Mutation zur Entstehung der diffusen mesangialen Sklerose beim Denys-Drash Syndrom führen, mit Hilfe verschiedener molekulargenetischer und biochemischer Analysen zu untersuchen.

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass es beim *WT1*-assoziierten nephrotischen Syndrom zu Veränderungen der Filtrationsbarriere in den Glomeruli und so zur Proteinurie kommt. Betroffen von diesen Veränderungen sind vor allem die GBM, die stark verdickt erscheint, und die Podozyten, bei denen es zu einer Verschmelzung der Fußfortsätze und einem gestörten Aufbau des Cytoskeletts kommt. Erste Ergebnisse deuteten darauf hin, dass es sich um eine Entwicklungsstörung der Niere handelt. Der Transkriptionsfaktor *WT1* kommt in vier verschiedenen Proteinisoformen vor, die sich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Zwei der Isoformen (+Exon5/-KTS; -Exon5/-KTS) binden bevorzugt an DNA und regulieren die Expression anderer Gene. Dagegen binden die beiden anderen Isoformen (+Exon5/+KTS; -Exon5/+KTS) an RNA und scheinen eine Rolle beim Spleißen zu spielen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *WT1* Missense-Mutationen beim Menschen die terminale glomeruläre Reifung stören. Um dies zu bestätigen, sollten Glomeruli von DDS-Patienten mit fötalen „s-shape“- und „capillary-loop“ Stadien sowie mit Glomeruli von Kindern und Erwachsenen durch die Verwendung verschiedener Marker der Podozyten (*WT1*, *VEGFA*) und der GBM (Laminin, Collagen IV) verglichen werden.

WT1 nimmt sowohl direkt als Transkriptionsfaktor als auch in seiner Rolle als Interaktionspartner für andere Proteine bei der Entwicklung der Niere eine wichtige Stellung ein. Dabei ist weitgehend unklar, auf welchem Weg Mutationen, wie sie beim DDS auftreten, die Funktion von *WT1* beeinflussen. Wahrscheinlich verändern sie die Expressionslevel von *WT1*-Zielgenen. Um herauszufinden, welche Gene in DDS-Podozyten fehlreguliert sind, sollten von primären Podozyten-Zellkulturen gesunder und erkrankter Personen Expressionsanalysen durchgeführt werden. Dazu wurden zuerst die verwendeten primären Zellkulturen auf podozytenspezifische Marker untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass die primären DDS-Podozyten-Zellkulturen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stammen, wurde davon ausgegangen, dass die Expressionsprofile einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit entsprechen. Wenn man an therapeutische Targets denkt, ist es aber wichtig, die frühesten Änderungen zu analysieren, die durch einen *WT1*-Verlust in den Podozyten zustande kommen. Zur Herunterregulierung von *WT1* in

Zelllinien wurde deshalb die Technik der RNA-Interferenz mit einer spezifischen *WT1*-siRNA verwendet. Auch wurden Expressionsanalysen durchgeführt, um herauszufinden, welche Gene fehlreguliert sind. Durch dieses Experiment sollten putative *WT1*-Zielgene gefunden werden, die früh in der Erkrankung involviert sind.

2 Material

2.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Ambion Ltd.	New England Biolabs
Amersham Biosciences	Peqlab
Bio-Rad	Promega
Biozym	Roche-Diagnostics
Boehringer Mannheim	Roth
DAKO	Santa Cruz Biotechnology
Gibco BRL	Seromed
Hoffmann-La Roche	Serva
Invitrogen	Shandon
Life Technologies	Sigma
MBI Fermentas	Stratagene
Merck	USB

Alle verwendeten Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe bezogen und besaßen den Reinheitsgrad pro analysis.

2.2 Radiochemikalien

Für die Arrayanalysen wurde alpha-³³P dCTP der Firma ICN verwendet.

2.3 Enzyme

2.3.1 Restriktionsenzyme

Bam HI	MBI Fermentas	Not I	MBI Fermentas
Eco RI	MBI Fermentas	Xba I	MBI Fermentas
Hind III	MBI Fermentas	Xho I	Roche

2.3.2 Andere Enzyme

DNA-Ligase (E. coli)	Invitrogen
DNA-Polymerase I (E. coli)	Invitrogen
MMLV	Clontech
Protease	Sigma
Proteinase-K	Roche
Rnase H	Invitrogen
RNasin	Promega
Superscript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase, rekombinant	Invitrogen
T7 RNA-Polymerase	Enzo
T4 DNA Polymerase	Invitrogen

Alle Enzyme wurden mit den entsprechenden kommerziell erhältlichen Puffern verwendet.

2.4 Größenmarker

2.4.1 DNA-Marker

1 kBp-DNA-Leiter (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 Ladder (New England Biolabs):

1517/1200/1000/900/800/700/600/517,500/400/300/200/100 Bp

DNA Molecular Weight Marker IV (Roche Applied Science):

2176/1766/1230/1033/653/517/453/394/298/298/234/234/220/154/154 Bp

Low DNA Mass Ladder (Invitrogen):

2000/1200/800/400/200/100 Bp

MassRuler DNA Ladder, Low Range (MBI Fermentas):

1031/900/800/700/600/500/400/300/200/100/80 Bp

PCR-Marker (New England Biolabs):

766/500/300/150/50 Bp

2.4.2 Proteinmarker

Precision Plus Protein Standards All Blue (Bio-Rad):

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

2.5 Zelllinien

HEK293-Zellen:

HEK293-Zellen sind immortalisierte humane embryonale Nierenepithelzellen (DSMZ).

N13T-Zellen:

N13T-Zellen sind mit Telomerase (hTERT) immortalisierte humane Podozyten.

2.6 Bakterien

Die Transformationen wurden mit dem Bakterienstamm DH5 α (Hanahan, 1985) durchgeführt.

2.7 Vektoren und Konstrukte

WT1-Konstrukt:

Das verwendete WT1 cDNA Expressions-Konstrukt WIT-2F (+Exon5/+KTS) befindet sich in einem pCMV-Vektor (P. Baird, Australien).

NPFS2:

NPFS2 befindet sich in dem pCDNA3.1-Vektor der Firma Invitrogen (freundlicherweise von C. Antignac (Paris) zur Verfügung gestellt).

NPFS1:

NPFS1 befindet sich in dem pCDNA3-Vektor der Firma Invitrogen (freundlicherweise von K. Tryggvason (Stockholm) zur Verfügung gestellt).

CD2AP:

CD2AP befindet sich in dem pCDNA3.1-Vektor der Firma Invitrogen (freundlicherweise von A. S. Shaw (St. Louis) zur Verfügung gestellt).

2.8 Kulturmedien und Antibiotika-Lösungen**2.8.1 Angesetzte Medien und Lösungen**

Ampicillin	100 mg/ml in sterilem H ₂ O; lagern bei -20°C
HEK293-Einfriermedium	10 % DMSO, 10 % FCS, 80 % DMEM-Medium
LB- (Luria Bertani) Medium	10 g Bacto Trypton; 5 g Bacto Yeast; 10 g NaCl auf 1 l H ₂ O; autoklavieren
LB-Agar	10 g Bacto Trypton; 5 g Bacto Yeast; 10 g NaCl; 1,5 % Agar (w/v); auf 1 l H ₂ O; autoklavieren
Mesangiumzellen-Einfriermedium	20 % DMSO; 30 % FCS; 50 % Wachstumsmedium
Podozyten-Einfriermedium	10 % DMSO; 15 % FCS; 75 % RPMI-1640-Medium
TYM Medium	1 % Bacto-Trypton; 0,5 % Bacto-Yeast-Extrakt; 0,1 M NaCl; 10 mM MgCl ₂
TfB1-Medium	30 mM CoAc; 50 mM MnCl ₂ ; 100 mM KCl; 15 % Glycerin
TfB2-Medium	10 mM Na-MOPS pH 7; 75 mM CaCl ₂ ; 10 mM KCl; 15 % Glycerin

Medium für HEK293 Zellen:

50 ml	FCS	Invitrogen
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Mix (100x)	PAA
auf 500 ml	Dubelcco's MEM-Earle (mit Glutamin) (high glucose)	PAA

Medium für humane Podozyten und Mesangiumzellen:

50 ml	Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen
5 ml	1M L-Glutamin	Invitrogen
5 ml	Penicillin-Streptomycin-Mix (100x)	PAA
2,5 ml	1M HEPES-Buffer	Gibco
0,5 ml	NEA (Non-Essential Amino-Acids) (100x)	Gibco
0,5 ml	1M Natrium Pyruvat	Gibco
0,5 ml	ITS (Insulin-Transferrin-Selenite)-Mix (1000x)	Roche
auf 500 ml	RPMI-1640-Medium	PAA

2.8.2 Reagenzien für die Transfektion eukaryotischer Zellen

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

RNAi Fect	Qiagen
FuGENE™ 6 Transfection Reagent	Roche
Lipofectamine™ 2000-Reagent	Invitrogen

2.9 Puffer und Lösungen

2.9.1 Angesetzte Puffer und Lösungen

APS (10 %)	1 g APS auf 10 ml H ₂ O; aliquotieren; bei -20°C lagern
Bindungspuffer	20 mM Natriumphosphat pH 7,0
Block-Lösung (WB)	PBS-T + 5 % Milchpulver (w/v)
Block-Lösung (IF)	2 % FCS; 0,2 % Fischgelatine; 2 % BSA in 1 x PBS
Block-Lösung (IF)	4 % FCS; 0,1 % Tween20 in 1 x PBS
Blotpuffer (WB)	1 x Transferlösung; 20 % Methanol
Citratpuffer (10x)	10 mM NaCitrat pH 6,0 (HCl)
DEPC-H ₂ O	0,2 % DEPC auf 1 l H ₂ O; über Nacht rühren
DAPI (Stammlösung)	5 mg/ml in ddH ₂ O
Denaturierungslösung (AA)	1 M NaOH; 10 mM EDTA
DNA-Isolationspuffer	20 µg Proteinase K auf 50 µl 1 x PK-Puffer
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA; 20 g NaOH; 800 ml H ₂ O; pH auf 8,0 einstellen; ad 1 l H ₂ O
Elutionspuffer	20 mM Natriumphosphat; 2 M NaCl, pH 7,0
Ethidiumbromid Stammlösung	10 mg/ml in ddH ₂ O
Ficoll Ladepuffer (5x)	25 % Ficoll 70; 25 mM EDTA; 0,1 % Bromphenolblau
Fixierer (IF)	2 % Paraformaldehyd; 4 % Saccharose in 1 x PBS
Formamid Ladepuffer	98 % Formamid (deionisiert); 1 % EDTA; 1 % Bromphenolblau
IPTG	0,2 g/ml H ₂ O
Loading-Mix (3x, WB)	1,75 ml Sammelgelpuffer; 1,5 ml Glycerin; 5 ml 10 % (w/v) SDS; 0,5 ml beta-Mercaptoethanol; Bromphenolblau; auf 10 ml H ₂ O
Natriumphosphat (1 M NaPi)	89 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O auf 1 l H ₂ O; pH 7,2 (H ₃ PO ₄)
Natriumacetat (3 M)	408,24 g auf 1 l H ₂ O
Neutralisierungslösung (AA)	1 M NaH ₂ PO ₄ ; pH 7,0
PBS (1x, WB)	80 mM Na ₂ HPO ₄ ; 20 mM NaH ₂ PO ₄ ; 100 mM NaCl (pH 7,5)
PBS (10 x)	80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na ₂ HPO ₄ ; auf 1 l H ₂ O; pH 7,4
PBS-T (1x, WB)	0,1 % Tween 20 (v/v) in 1 x PBS (pH 7,5)
PCR-Puffer Invitrogen (10x)	200 mM Tris HCl pH 8,4; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂
PCR-Puffer AF (10x)	100 mM Tris HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl ₂ ; 0,1 % Gelatine
Permeabilisierung (IF)	0,3 % TritonX100 in 1 x PBS
PK-Puffer (10x)	100 mM Tris pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl ₂
Ponceau-Färbelösung	0,1 % Ponceau S (w/v); 5 % Essigsäure (v/v)
Protease-Lösung (IHC)	50 mg Protease (Sigma) auf 50 ml TBS
Proteinase-K	10 mg/ml in 10 mM Tris HCl pH 8,0; vor Gebrauch 2 h bei 37°C inkubieren; lagern bei -20°C
PMSF (100 mM)	0,174 g auf 10 ml Isopropanol
Reservoirlösung (1x)	1 x Transferlösung; 10 % SDS (w/v)
RIPA-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 % Triton X100; 1 % SDS; 5 mM EDTA
Sammelgelpuffer (10x)	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
SDS (10% w/v)	10 g SDS auf 100 ml H ₂ O
SSC (20x)	3 M NaCl; 0,3 M NaCitrat; pH 7,0
Strip-Puffer für (WB)	100 mM beta-Mercaptoethanol; 2 % SDS; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7
Strip-Lösung (AA)	0,5 % SDS
TAE (50x)	2 M Tris Base; 5,71 % Eisessig (v/v); 50 mM EDTA
TBE (10x)	0,89 M Tris Base; 0,89 M Borsäure; 0,02 M EDTA
TCA (100 % w/v)	100 g TCA auf 100 ml H ₂ O
TBS	pH 7,6 (DAKO, S1968)

TBS-T	1 x TBS mit 0,1 % Tween20
TCA + DOC	10 ml 100 % w/v TCA; 40 mg Natriumdeoxycholat
TE (1x)	10 mM Tris/HCl; pH 7,4; 1 mM EDTA
Terminationsmix (10x, AA)	0,1 M EDTA; 1,0 mg/ml Glycogen
Transferlösung (10x, WB)	250 mM Tris-Base; 1,9 M Glycin
Trenngelpuffer (10x)	3,0 M Tris-HCl (pH 8,8)
Tris-HCl (0,05M)	6,61 g Trizma HCl; 0,97 g Trizma Base (pH 7,4)
Triton X 100 (IF)	0,3 % Triton X 100 in 1 x PBS
X-Gal	20 mg/ml Dimethylformamid

Alle Lösungen wurden mit entionisiertem H₂O angesetzt und zum Teil autoklaviert oder steril filtriert. Lösungen zum Arbeiten mit RNA wurden mit 0,2% DEPC behandelt und anschließend autoklaviert. WB: Western Blot. AA: Atlas Array. IF: Immunfluoreszenz.

2.9.2 Fertige Puffer/Lösungen und verwendete Kits

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
Atlas™ Human 3.6 Array	Clontech
Atlas NucleoSpin Extraction Kit	Clontech
Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
BioArray™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit (T7)	ENZO
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad
DAB-Chromogen Tabletten	DAKO
DAKO Antibody Diluent	DAKO
DAKO Biotin Blocking System	DAKO
DAKO EnVision + System	DAKO
DAKO Fluoreszenz-Einbettmedium	DAKO
DAKO Labelled StreptAvidin Biotin-Kit (LSAB-Kit)	DAKO
DAKO Peroxidase Blocking Reagent	DAKO
DAKO Proteinblock Serum-free	DAKO
DAKO Target Retrieval Solution pH 9,0	DAKO
DAKO Target Retrieval Solution (high pH)	DAKO
dNTP Set (10 mM)	Promega/Invitrogen
E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit I	QIAGEN
Endofree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Entwickler (Röntgenchemie)	AGFA
ExpressHyb™ Hybridization Solution	Clontech
Genechip Sample-Clean Up Module	Affymetrix
Fixierer (Röntgenchemie)	AGFA
Hämatoxylin	Shandon/Merck
HiTrap Blue HP	Amersham
IGFBP3 (I-5278)	Sigma
Immu-Mount	Shandon
Protease	Sigma
Protease Inhibitor	Roche
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
QIAshredder	QIAGEN
qPCR Core Kit	Eurogentec
RNAi Starter Kit	QIAGEN
RNeasy Micro Kit	QIAGEN
RT Step- TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems
Strataprep TotalRNA Microprep Kit	Stratagene
SuperSignal West Femto Trial Kit	Pierce
SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix	Sigma
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems

TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG
 TNFalpha (T-0157)
 ultraPURE Distilled Water

Applied Biosystems
 Sigma
 Gibco

2.10 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden über die Firmen Metabion, MWG Biotech, Invitrogen, Biomers und Eurogentec bezogen.

2.10.1 Oligonukleotide für cDNA-Synthese

Random Primer (N6) 5'-(N)₆-3'

2.10.2 Oligonukleotide für RT-PCR

Gen	for (5'-3') / rev (5'-3')	Produkt (Bp)
alpha Actinin 4 (ACTN4)	GAGGCCAGAGGATCGCT ACTTGGAGTTGATGATTTGCGG	91
CD2-associated protein (CD2AP)	GAGGAATGTTCCCTGACAAT GTCCATAGGTGCTTATTCGT	132
Collagen IV alpha ½ (COL4A1/2)	CTACCTGGAACAAAAGGGACAA CCTCTTTCACCTTTC AACAGCA	272
Collagen IV alpha 4 (COL4A4)	GACTCCACCTCTTCCACTTAA GGTTTTCTGGAGCAGAATCA	228
Collagen IV alpha 5 (COL4A5)	GATCGCAGTTCACAGTCAGACGATC GAGTTGGCATAGTAGTTACAGGTACC	213
Decorin (DCN)	TCTCCTACATCCGCATTGCTGATACC CTTGTTGTTGTCCAAGTGAAGCTCCC	236
Densin (DN)	GACAAGCCATCAGATAAC GCATTTTACCACAGCTCT	76
Dystroglycan (DG)	ACAGGGACCCTGAGAAGAGCA AATGATGCCAGCAATGAGCAG	98
Endoglin (EG)	CGGAGCTGCTCATGTCTTGATCC GATATTGACCACCGCCTCATTGCTG	233
Endothelin 2 (ENT2)	CGCTCCCTGCCAAGGCGCTGTCAGT CCCGCATGGCCTCCTGTTGTCGCTTG	232
Glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1)	TCACTGTGGAGATGATTTAGAGG CGTCAGCATAGTTGATCCGGA	75
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG	269
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	CAGCCGTGGCATCGTTGAGGAGTGC TGGACTGCTTCCAGGTGTCATATTGG	182
Integrin, alpha 5 (ITGA5)	GCTGAGCTTCGGGTCACCGCCCC GGAAACCACGTCGCTTTGCGAGTTGT	273
Integrin, beta 3 (ITGB3)	ACACTGGCAAGGATGCAGTGAATTGTAC CGTGATATTGGTGAAGGTAGACGTGGC	335
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)	GGGAGCTTCGTGCTCTGTATGGCC AGTCTGTATTTCTTGATCTTCCGCTGGC	379
Laminin beta 1 (LAMB1)	CTGGATTCCAGGATGGAAATCA CCAGGTAACAGCCATGTCAA	315
Laminin beta 2 (LAMB2)	GGCTCTGAAATTGAAACGGGCA GCCGCTGCAGCTTGTCTGA	251

Gen	for (5'-3') / rev (5'-3')	Produkt (Bp)
Lumican	TTCCCAAATCTCTGGAGGATCTGCAG CTTGAAATACTCATCAGGGATGTTGCTG	275
Matrix-metalloproteinase 2 (MMP2)	GCTGGGAGCATGGCGATGGATAACC GGACAGAAGCCGTACTTGCCATCC	301
Natural killer cell transcript 4 (NK4)	AAGCTGAAGGCCCGAATGGTAATGC TCGACATCACCTGTCCACGTCCTG	226
Nephrin (NPHS2)	CAACTGGGAGAGACTGGGAGAA AATCTGACAACAAGACGGAGCA	189
Neuropilin-1	CTACAGTGTCTTGACAGAGCA GCAGACCAGTTGGTGCTATA	126
Osteopontin	TGGAAAGCGAGGAGTTGAATGGTGC ATCACATCGGAATGCTCATTGCTCTC	205
Osteoprotegerin (OPG)	CATATGTTCCGAAACAGTGAATCAAC GAAAGTCTGTTCTTGAGCTGTGTTG	205
PAX2	AGTGGTGTGGACAGTTTGCGGAAG GCAGATAGACTCGACTTGACTTCATC	203
Pod-1 (TCF21)	ATGCGAGTGCTGAGCAAGGCCTTC ACCATAAAGGGCCACGTCAGGTTG	194
Podocin	AAGAGTAATTATATTCCGACTGGGACAT TGGTCACGATCTCATGAAAAGG	249
Podoplanin	TTGACAACTCTGGTGGCAACA GCTGTGGCGCTTGGACTT	113
Sex determining region Y-box 9 (SOX9)	CCCTTCAACCTCCCACTACAGC TGTGTAGACGGGTTGTTCCAGTG	249
Synaptopodin	CCCAAGGTGACCCCGAAT CTGCCGCCGCTTCTCA	66
Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)	GAAACAGAACACCGTGTGCA GAGTAGAGCTTGGACTTCCA	255
Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)	GGAATGCAAGCATGGATGCA GACACAGTTCACCACTCCTA	272
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	TCGAGATGAGTGGTGGCCTCGTGAAT GGAAAGCCCTGGCTCAAGCATGTCATAT	394
Vascular endothelial growth factor A (VEGFA Ex7a / VEGF 3'UTR)	GTAAGCTTGTAACAAGATCCGCAGACG ATGGATCCGATCAGTCTTTCT	135/200
Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1)	GTAGCTGGCAAGCGGTCTTACCGGCTC GGATTTGTCTGCTGCCAGTGGGTAGAGA	316
Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)	GTGGTCTCTGTTGTGTA CCGTACATGTCAGCGTTTGA	106
Villin 2 (Ezrin)	CTACAGCGCGGAGCTGTCTAGTGAG GCTGTTACAGGGCCTCGAACTCGTC	272
Wilms'-Tumor 1 Gen (WT1)	CCGGTGCTTCTGGAACTACCAGGTG GGCTGACCTCGGAATGTTAGACACGAT	388

Tabelle 2.1: RT-PCR-Primer. Sequenzen und PCR-Produktgrößen

2.10.3 Oligos für SYBR Green-Real-Time RT-PCR (Sigma)

Gen	for (5'-3') / rev (5'-3')	Produkt (Bp)
Collagen I alpha 1 (COL1A1)	GATGCCAATGTGGTTCGTGA GTTGGGGTCAATCCAGTACT	243
Collagen IV alpha 2 (COL4A2)	ATGTGGGACAGATGGGTCCAGTTG GATCTGGGTGGAAGGTGACTCCTG	210
Collagen IV alpha 4 (COL4A4)	ATGTGGGACAGATGGGTCCAGTTG	210

Gen	for (5'-3') / rev (5'-3')	Produkt (Bp)
Collagen 6 alpha 1 (COL6A1)	GATCTGGGTGGAAGGTGACTCCTG GTCAAAGGAGCAAAGGGGTA GACGAAGTCCTTGGAATCT	216
Early growth response 1 (EGR1)	TGGCTTCCAGGTTCCCATGATCCCC GGCAAGCGTAAGGGCGTTCGTGGG	287
Fibronectin 1 (FN1)	GAACATGATGCCGACCAGA GAGTAGGCAATGCATGTCCA	186
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	GGCTCTCCAGAACATCATCCCTGC GGGTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGG	269
Gremlin	CATGTGACGGAGCGCAAATACCTG AGTTGAGTGTGACCATCATGGTATGT	229
Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1A)	TCACCACAGGACAGTACAGGATGC CCAGCAAAGTTAAAGCATCAGGTTCC	303
Inhibin alpha (INHBA)	GAGAGCCCGACGCTCAACTCCCC TCCATCCGAGGTGGTGCGGACATG	355
Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	GCAAGGGTGCAAGCATCACCTTGGC AGGCACCGGCTGGCTGCGGTCTACT	391
Integrin beta 4 (ITGB4)	TTCGGGCCAGAGCGCGAGGGCAT GACGCCTAGTGGGACATGGCGGG	340
Lamin A/C	CAAGAAGGAGGGTGACCTGA GCATCTCATCCTGAAGTTGCTT	200
Laminin beta 1 (LAMB1)	CTGGATTCCAGGATGGAAATCA CCAGGTAACAGCCATGTCAAA	315
p21	AGGTTCTTGCTGGTGTGAAATGACTGAG GCACCATAGGTACATCATCCGAGTCTTT	356
Tumor necrosis factor alpha (TNFA)	TCACCCACACCATCAGCCGCATCG GGGAAGGTTGGATGTTTCGTCTCC	272
Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	CAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGA GCTTGTCACATCTGCAAGTACGTTTCTTTA	424
Wilms'-Tumor 1 Gen (WT1)	CCGGTGCTTCTGGAAACTACCAGGTG GGCTGACCTCGGGAATGTTAGACACGAT	388

Tabelle 2.2: SYBR Green RT-PCR-Primer. Sequenzen und PCR-Produktgrößen

2.10.4 Oligonukleotide und TaqMan-Sonde für Real-Time RT-PCR

WT1:

TaqMan-Sonde	5'-AGCGATAACCAACACAACGCCCATCC-3'
Primer 1	5'-AAATGGACAGAAGGGCAGAG-3'
Primer 2	5'-CTGAAGGGCTTTTCACTTGTT-3'
Primer 3	5'-TGAAGGGCTTTTACCTGTAT-3'
Primer 4	5'-CACCTTAAAGGGCCACAGC-3'

Die TaqMan-Sonde ist am 5'-Ende mit 6-FAM (Reporterfarbstoff) und am 3'-Ende mit TAMRA (fluoreszierender Quencher) markiert.

2.10.5 Assay-on-Demand-Oligos und -Sonden für Real-Time RT-PCR (Applied Biosystems)

<u>Genname</u>	<u>Abkürzung Gen</u>	<u>Katalognummer</u>
Matrix-Metalloproteinase 2	<i>MMP2</i>	Hs00234422_m1
Eukaryotische 18S rRNA	<i>18S rRNA</i>	Hs99999901_s1
Empty spiracles homolog 2	<i>EMX2</i>	Hs00244574_m1

2.11 siRNAs (Qiagen)

WT1:

siRNA (sense): r(UGACAUCCCAGCUUGAAUG)d(TT)
 siRNA (antisense): r(CAUUCAAGCUGGGAUGUCA)d(TT)
 DNA-Target-Sequenz: 5'-AATGACATCCCAGCTTGAATG-3'

Negativkontrolle:

siRNA (sense): UUCUCCGAACGUGUCACGUdT dT
 siRNA (antisense): ACGUGACACGUUCGGAGAA dT
 DNA-Target-Sequenz: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'

Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz diente eine Fluoreszein-markierte siRNA und für die Effizienz des Silencing-Effektes *Lamin A/C* (Positivkontrolle). Beide siRNAs sind im RNAi-Starter-Kit der Firma Qiagen enthalten. Bei der Negativkontrolle handelte es sich um eine siRNA ohne Homologie zu bekannten Säugergenen.

2.12 Antikörper

Die Antikörper wurden für die Immunhistochemie, Immunfluoreszenz und Western-Blot-Analyse verwendet.

2.12.1 Primärantikörper

Antikörper für Immunfluoreszenz:

Antikörper	Art	Herkunft	Katalog-Nr./Klon	Firma
CD2AP	polyklonal	Kanninchen		A. Shaw (St. Louis, USA)
Cytokeratin	monoklonal	Maus	T-1302 (Lu-5)	BMA
IGFBP3	polyklonal	Maus	611504 (4)	BD
Nephrin	monoklonal	Maus	50A9	K. Tryggvason (Stockholm, Schweden)
Podocin	polyclonal	Kanninchen	P35	C. Antignac, (Paris)
sm-Aktin	monoklonal	Maus	M0851 (1A4)	Santa Cruz (F. Eitner, Aachen)
Talin	monoklonal	Maus	T3287 (8D4)	Sigma
Vimentin	monoklonal	Maus	M0725 (V9)	DAKO
Vinculin	monoklonal	Maus	CBL233 (V284)	Cymbus Biotechnology
WTC19	polyklonal	Kanninchen	sc-192 (L2302)	Santa Cruz

Tabelle 2.3: Antikörper für Immunfluoreszenz.

Antikörper für Immunhistochemie:

Antikörper	Art	Herkunft	Katalog-Nr./Klon	Firma
Collagen IV α 1/2	monoklonal	Maus	M3F7	Developmental Studies Hybridoma Bank
Collagen IV α 4	polyklonal	Kanninchen		J. Miner (St. Louis, USA)
ICAM1 (M19)	polyklonal	Ziege	sc-1511	Santa Cruz (K. Amann, Erlangen)
Laminin β 1	monoklonal	Maus	MAB1921	Chemicon
Laminin β 2	monoklonal	Maus	C4	Developmental Studies Hybridoma Bank
Laminin β 2 (L)		Maus	9G12	L. Sorokin (Lund, Schweden)
MMP7	monoklonal	Maus	IM71-100UG / Ab-3	Oncogene
SOX9	polyklonal	Kanninchen	S6943	Sigma
VCAM1	monoklonal	Maus	M7106 / 1.4C3	DAKO
WT1	monoklonal	Maus	M3561 / 6F-H2	DAKO
WTC19	polyklonal	Kanninchen	sc-192 (L2302)	Santa Cruz

Tabelle 2.4: Antikörper für Immunhistochemie.

Antikörper für Western-Blot:

Antikörper	Art	Herkunft	Katalog-Nr./Klon	Firma
α -Tubulin	monoklonal	Maus	T9026/ DM1A	Sigma
IGFBP3	polyklonal	Maus	611504 (4)	BD
WTC19	polyklonal	Kanninchen	sc-192 (L2302)	Santa Cruz

Tabelle 2.5: Antikörper für Western-Blot-Analysen.**2.12.2 Sekundärantikörper**Western-Blot:

Anti-mouse Ig (monoklonal), Peroxidase linked	Amersham (NA 931)
Anti-rabbit Ig (polyklonal), Peroxidase linked	Amersham (NA 934)

Immunfluoreszenz (IF):

Anti-mouse Ig, FITC-konjugiert	DAKO (F0261)
Anti-rabbit Ig, FITC-konjugiert	DAKO (F0205)

2.13 Verbrauchsmaterial

96 well optical reaction plates	Applied Biosystems
CapSure HS Caps	Arcturus
Coverplates	Shandon
GelBond PAG Film	Biozym
Küvetten	Greiner
HiTrap Blue HP	Amersham Biosciences
Immun-Blot PVDF Membran (0,45 μ m)	Bio-Rad
Micro Amp Optical Caps	Applied Biosystems
Objektträger, Adhäsions-	Histobond
Pipettenspitzen	Biozym
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym
Plastik-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak
Uvette 220-1600 nm	Eppendorf
Westran Clear Signal Membran (0,45 μ m)	Schleicher & Schüll
Whatman 3MM	Schleicher & Schüll
Zellkulturflaschen	Falcon

2.14 Software

Für die Auswertungen der Experimente waren folgende Computerprogramme notwendig:

ABI PRISM™ Sequence Detection Software (Vers. 1.6)	Applied Biosystems
AIDA Image Analysis 2.11	Raytest
AIDA Image Analysis 3.01	Raytest
BAS Image Scanning	Raytest
Dissociation Curves	Applied Biosystems
Excel Tabellenkalkulation	Microsoft
GCOS	Affymetrix
IrfanView 3.85 (http://www.irfanview.de/)	Irfan Skiljan
Isis (Fluoreszenz-Auswertung)	Metasystems
LIMMA 2.0.0 (http://www.bioconductor.org/)	BioConductor
Photoshop Bildbearbeitung	Adobe
Powerpoint	Microsoft
Simpleaffy (http://www.bioconductor.org/)	BioConductor
Word Textverarbeitung	Microsoft

2.15 Geräte

ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
CM1900 Cryostat	Leica
Fluoreszenzmikroskop Axioplan II	Zeiss
Geldokumentationsanlage für Agarosegele	Herolab
GeneChip Scanner 3000	Affymetrix
Leica FW4000	Leica
Phasenkontrast / Durchlichtmikroskop (Axioplan)	Zeiss
Phosphorimager FLA 3000	Fuji
PixCell® II LCM System	Arcturus
PTC-200 Thermal Cycler	MJ Research
Schlittenmikrotom	Leica
Thermoblock	Biometra
Ultraspec 2000 Photometer	Pharmacia Biotech
Ultrazentrifuge Pro 80	Sorvall

3 Patienten und Normalkontrollen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte humanes Nierengewebe von 11 Denys-Drash-Patienten mit kongenitalem/infantilem nephrotischen Syndrom und zwei CNF-Patienten mit kongenitalem/infantilem nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ untersucht werden. Als Kontrolle diente humanes Nierengewebe von 10 erwachsenen Personen, drei Kindern und drei Föten, die nicht am nephrotischen Syndrom erkrankt waren. Bei den Gewebeproben handelte es sich um Operationsmaterial, welches nicht zu diagnostischen Zwecken benötigt und für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt wurde. Das Einverständnis der betroffenen Personen oder, falls die Personen zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme noch nicht volljährig waren, das Einverständnis eines Erziehungsberechtigten lag in allen Fällen vor. Für die Studie liegt eine Bewilligung von der hiesigen Ethikkommission vor.

Zusätzlich standen primäre Podozyten-Zellkulturen von drei verschiedenen Denys-Drash-Patienten (N90, N100, DDS16), zwei CNF-Patienten (97-1, MD219) und zwei nicht erkrankten Kontrollpersonen zur Verfügung (N13, MD283) sowie auch mit Telomerase immortalisierte humane Podozyten einer nicht erkrankten Person (N13T).

In Tabelle 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe und Podozyten-Zellkulturen zusammengestellt.

Zusätzlich wurde auch mit den beiden Zelllinien HEK293 (humane embryonale Nierenzellen) und MesCC2559 (Mesangiumzellen) gearbeitet, wobei uns die Mesangiumzellen im Rahmen einer Kooperation mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. F. Eitner (Aachen) zur Verfügung gestellt wurden.

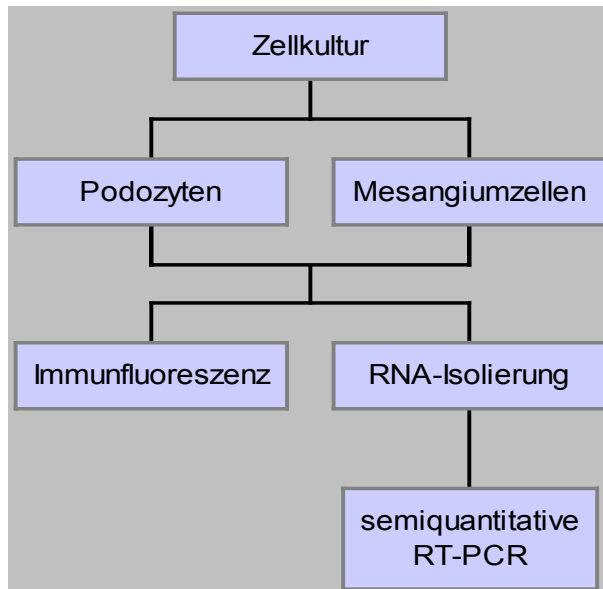
Name	Bez	Geb.datum	Alter bei Nephrektomie	Herkunft	Mutation	Kryo	Paraffin	Primärzellen	hTERT
Normale adulte und kindliche Nieren									
08.12.1999	NAK4	Adult	60-70J	Urologie, Düsseldorf		+			
02.02.2000	NAK5	Adult	60-70J	Urologie, Düsseldorf		+			
BÖ	NAK7	Adult	60-70J	Urologie, Düsseldorf		+			
BS	NAK8	Kind	60Mo	Prof. Royer-Pokora		+			
BP	NAK9	Kind	?	Prof. Royer-Pokora		+			
N13	NAK11	Adult	?	Nephrologie, Freiburg				N13 (Pavenstädt, Freiburg)	N13T
	NAK15	Adult	70J	Pathologie, Düsseldorf			+		
MD283	NAK23	Kind	84Mo	Kinderklinik, Düsseldorf		+		MD283	
Normale embryonale Nieren									
	NEK1		Abort 24. SSW	Prof. Royer-Pokora		+			
	NEK2		Abort 16. SSW	Pathologie, Berlin		+			
Denys-Drash Nieren									
N90 (NS18)	DDS16	16.05.1999	9Mo	Kinderklinik, Heidelberg	Exon 8 366 Arg>His	+		N90 (Pavenstädt, Freiburg)	
N92 (NS19)	DDS2	13.08.1999	16Mo	KfH, Münster	Exon 8 373 His>Arg	+			
HI (NS10)	DDS3	29.06.1995	14Mo	KfH, Münster	Exon 9 394 Arg>Trp	+	+		
JL (NS9)	DDS4	12.02.1994	24Mo	Hamburg?	Exon 8 379 Gly>Cys	+	+		
MG (NS8)	DDS9	28.03.1992	38Mo	Pathologie, Heidelberg	Exon 9 396 Asp>Asn	+	+		
CI	DDS10		32Mo	Pathologie, Kiel	Exon 9 394 Arg>Trp		+		
MD152 (NS20)	DDS11		24Mo	Prof. Kosmehl	Exon 9 394 Arg>Trp		+		
MD240 (NS21)	DDS14	24.10.2001	21Mo	KfH, Münster	Exon 9 388 Cys>Arg	+	+	N100	
	DDS16	27.09.2004	13Mo	Kinderklinik, Erlangen	Exon 9 394 Arg>Trp	+	+	DDS16	
CNF-Nieren									
97-1	CNF1	02.07.2001	7Mo	KfH, Münster	c.1680delC homozygot	+	+	97-1 (Pavenstädt, Freiburg)	
MD219	CNF2	21.09.1999	11.12.2003	Kinderklinik, Essen	c.1699T>A / p.Cys567Ser homozygot	+	+	MD219	

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der in dieser Arbeit verwendeten Gewebe und Zellkulturen von Patienten und Kontrollen. J = Jahr. Mo = Monat. L = links. R = rechts. SSW = Schwangerschaftswoche. ? = Angabe nicht bekannt. Bez = Bezeichnung. Geb.datum = Geburtsdatum. + = vorhandenes Material.

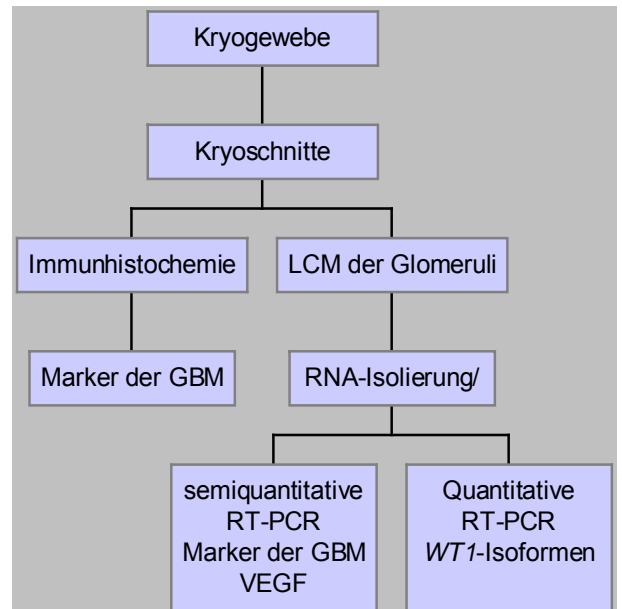
4 Methoden

Schematische Übersicht über die durchgeführten Analysen im Rahmen dieser Arbeit:

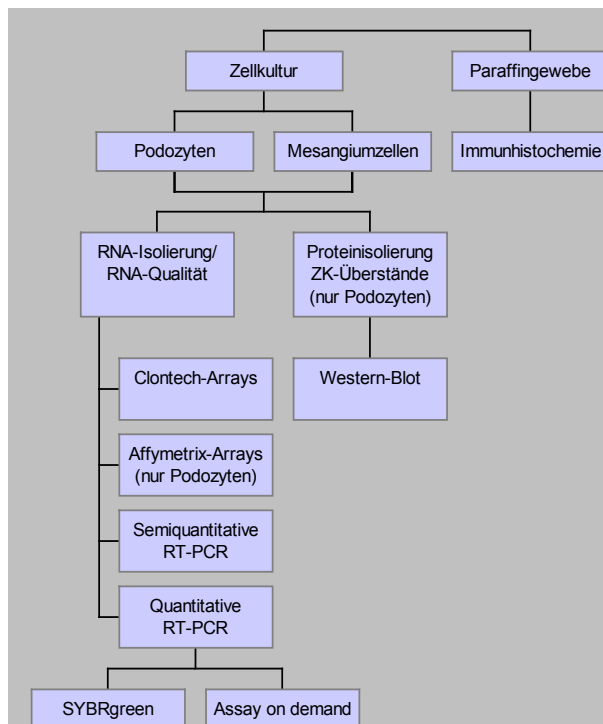
A Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen



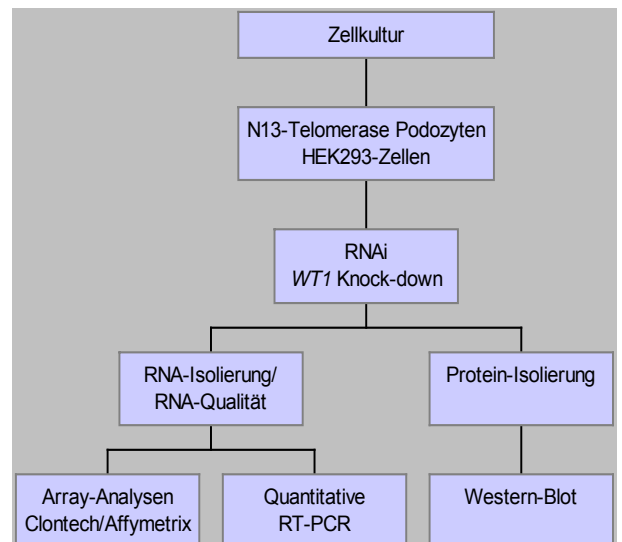
B Untersuchung der glomerulären Differenzierung beim Denys-Drash Syndrom



C Expressionsanalysen von glomerulären Nierenzellen



D Auffinden putativer WT1-Zielgene



4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultur adhärenter Zellen

Humane Podozyten, Mesangiumzellen und HEK293-Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂-Begasung gezüchtet.

4.1.2 Auftauen der Zellen

Podozyten und HEK293-Zellen

- Kryoröhrchen mit den Zellen in der Hand antauen lassen.
- Angetaute Zell-Suspension (1-1,5 ml) in ein Falconröhrchen mit 5 ml Medium geben.
- 3 min bei 1200 rpm zentrifugieren und Pellet in frischem Medium resuspendieren.
- In eine Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank züchten.

Mesangiumzellen

- Kryoröhrchen mit den Zellen unter fließendem kaltem Wasser antauen.
- Angetaute Zell-Suspension (1-1,5 ml) in ein Falconröhrchen mit 10 ml Wachstumsmedium geben.
- 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugieren und Pellet in frischem Medium resuspendieren.
- In eine Zellkulturflasche überführen und im Brutschrank züchten.

4.1.3 Passagieren von adhärenenten Zellen

Dreimal in der Woche wurde das Medium gewechselt und die Zellen, wenn dicht gewachsen, wie folgt passagiert:

- Medium absaugen.
- Trypsin/EDTA-Gemisch zu den Zellen in die Flasche geben, vorsichtig hin und her schwenken und wieder abkippen.
- Vorgang wiederholen, bei 37°C inkubieren, nach 3-5 min unter dem Mikroskop beobachten, ob sich die Zellen lösen.
- 5 ml Medium dazugeben, 3 min bei 1200 rpm zentrifugieren, Pellet in frischem Medium resuspendieren und in Zellkulturflasche überführen.
- Im Brutschrank züchten.

4.1.4 Selektion (für mit Telomerase immortalisierte Podozyten)

Zur Selektion der mit Telomerase immortalisierten Podozyten wurde das Medium mit Hygromycin B in einer Konzentration von 10 µg/ml versetzt.

4.1.5 Einfrieren der Zellen

- Trypsinbehandlung (siehe 4.1.3).
- Resuspendieren der Zellen in 5 ml Medium und Überführen in ein Falconröhrchen.
- 3 min bei 1200 rpm zentrifugieren.
- Pellet in 1-1,5 ml Einfriermedium pro Kryoröhrchen resuspendieren und in flüssigem Stickstoff lagern.

4.2 Transfektion

4.2.1 Transfektion von DNA

Transfektion bezeichnet das stabile oder transiente Einbringen von DNA in eine eukaryotische Zelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Lipofectamine™ 2000-Reagenz (Invitrogen) und FuGENE™ 6 Transfection Reagenz (Roche) für die Liposomen-vermittelte Transfektion verwendet.

Transfektion von HEK293-Zellen mit *NPHS1*, *NPHS2* und *CD2AP*

Als Positivkontrollen für die Immunfluoreszenz-Analysen zur Charakterisierung der Podozyten wurden *NPHS1*-, *NPHS2*- und *CD2AP* *cDNA-Plasmide* in HEK293-Zellen transfiziert. Die Transfektion erfolgte durch zwei unterschiedliche Transfektionsreagenzien:

a) Transfektion von HEK293-Zellen mit *CD2AP* oder *NPHS2* mit dem FuGENE™ 6 Transfection Reagenz (Roche-Diagnostics):

- Einen Tag vor Transfektion wurde eine dicht bewachsene Flasche (25 cm²) mit HEK293-Zellen auf 20 Objektträger ausgesät.
- Nach 24 h wurde die Transfektion nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.
- Es wurde 1 µg Vektor-DNA mit 3 µl Fugene-Reagenz kombiniert und für die Transfektion auf den Objektträgern eingesetzt.
- 8 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt.
- Die Zellen wurden für 24-48 h bei 37°C inkubiert.
- Das Waschen der Objektträger erfolgte mit PBS.
- Anschließend wurden die Objektträger getrocknet.
- Die Lagerung der Objektträger bis zur Immunfluoreszenz erfolgte bei –80°C.

b) Transfektion von HEK293-Zellen mit *NPHS1* mit dem Lipofectamine™ 2000 Reagenz (Invitrogen):

- Einen Tag vor Transfektion wurde eine dicht bewachsene Flasche (25 cm²) mit HEK293-Zellen auf 8 Objektträger ausgesät.
- Nach 24 h wurde die Transfektion nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.
- Es wurden 4 µg Vektor-DNA mit 10 µl Lipofectamine 2000-Reagenz für die Transfektion auf den Objektträgern eingesetzt.
- 8 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt.
- Die Zellen wurden für 36 h bei 37°C inkubiert.
- Das Waschen der Objektträger erfolgte mit PBS.
- Anschließend wurden die Objektträger getrocknet.
- Die Lagerung der Objektträger bis zur Immunfluoreszenz erfolgte bei –80°C.

Transfektion von HEK293-Zellen mit *WT1*

Die Transfektion der HEK293-Zellen mit dem *WT1*-Konstrukt WIT-2F (+Exon5/+KTS) wurde mit dem Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) durchgeführt (Protokoll siehe *Nephrin*-Transfektion). Allerdings wurde hier 8 µg Vektor-DNA verwendet und die Zellen wurden 24 h bei 37°C inkubiert.

4.2.2 Transfektion von siRNA (Genabschaltung durch RNA-Interferenz)

Genabschaltung („Silencing“) durch RNA-Interferenz (RNAi) ist ein 1998 entdecktes biologisches Phänomen, das aus der Inaktivierung eines oder mehrerer Gene resultiert. Es wird durch kurze interferierende RNA (siRNA, short interfering RNA) bewirkt. Dies sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA) von 21-23 Basenpaaren mit hoher Spezifität für die Nukleotid-Sequenz des Zielmoleküls, mRNA. siRNA-Moleküle assoziieren mit Helikase- und Nuklease-Molekülen und bilden den RNA-induzierten Silencing Complex (RISC). Dies endet in Stilllegung („Silencing“) des betreffenden Gens nach der Transkription (posttranskriptionales „Silencing“) (siehe Abbildung 4.1).

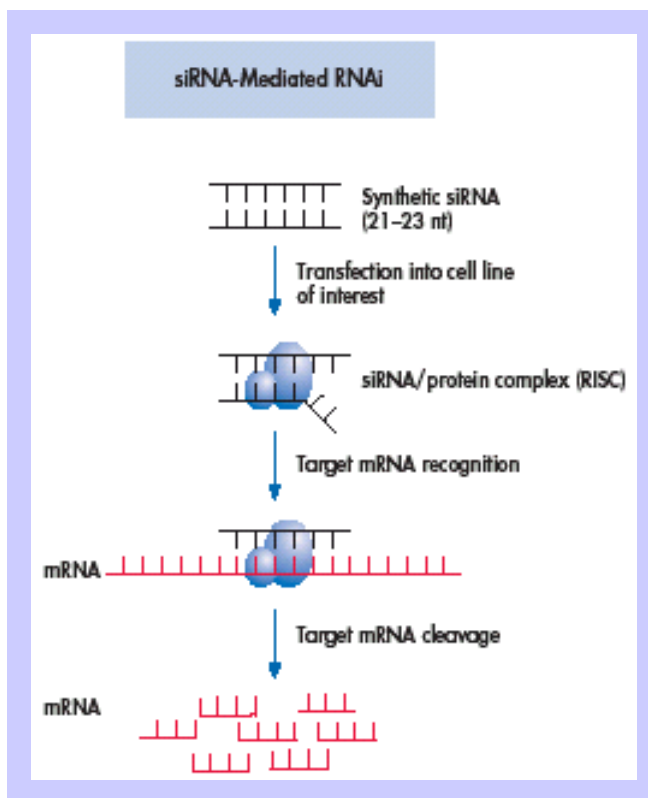


Abbildung 4.1 (übernommen aus „RNAi Starter Kit Handbook“; Qiagen, 2003): Mechanismus der RNA-Interferenz in Säugerzellen nach Transfektion mit siRNA. In kultivierten Säugerzellen werden die siRNAs über Transfektion in die Zelle geschleust und führen zur Degradierung von mRNA mit derselben Sequenz und damit zum „Silencing“ der Genexpression.

Protokoll des WT1 Knock-downs in den mit Telomerase immortalisierten N13T-Podozyten und den HEK293-Zellen

Die Etablierung dieser Methode mit den Transfektionsreagenzien Lipofectamine™ 2000-Reagenz (Invitrogen) und RNAiFect (Qiagen) ist im Ergebnisteil 5.4.1 beschrieben. Die Transfektionen erfolgten nach Angaben der Hersteller.

4.3 DNA-Analysen

4.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Eine 5 ml Übernachtskultur von DH α 5-Bakterien wird in TYM-Medium angeimpft. Am nächsten Tag wird sie zum Animpfen in 100 ml TYM-Medium aufgenommen. Diese wird bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Danach werden die Bakterien in der Zentrifuge bei 2500 g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, und das Pellet auf Eis in 20 ml Tfb1-Medium aufgenommen. Die Bakterien werden 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wird in 4 ml Tfb2 resuspendiert und in 200 μ l aliquotiert. Die Bakterien können schockgefroren bei -80°C aufbewahrt werden.

4.3.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid

- Kompetente Zellen (DH5 α) auf Eis auftauen lassen.
- Für die Transformation 200 μ l kompetente Zellen mit 10 ng Plasmid in ein vorgekühltes Röhrchen pipettieren.
- Inkubation für 30 min auf Eis.
- Hitzeschock: 5 min bei 42°C im Wasserbad.
- Zugabe von 1 ml bei 37°C vorgewärmten LB-Medium.
- Im Schüttler 45 min bei 37°C inkubieren.

- Agarplatten mit dem Antibiotikum Ampicillin (50 mg/ml) gießen, für Blau-Weiß-Selektion (β -Galaktosidase-Test) zusätzlich 70 μ l X-Gal (20 mg/ml) und 30 μ l IPTG (0,2 g/ml) auf jeder Platte ausstreichen.
- Je 50 μ l und den Rest des Transformationsansatzes auf einer Platte ausstreichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren.
- Mit den Einzelkolonien je 5 ml Ampicillin-selektives LB-Medium als Starterkultur animpfen.
- Über Nacht bei 37°C schütteln.

4.3.3 DNA-Isolierung

Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid DNA wurde mit dem Silica-Matrix basierenden E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit von Peqlab aus 5 ml-Kulturen und dem Endo Free Plasmid Maxi-Präp Kit von QIAGEN aus 100 ml-Kulturen isoliert. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Zur Kontrolle von Plasmid- und Insert-DNA wurden Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen durchgeführt.

a) Minipräparation

- DNA-Isolierung aus 2 ml Übernachtskulturen mit dem E.Z.N.A Plasmid Miniprep Kit der Firma Peqlab nach Angaben des Herstellers.

b) Maxipräparation (Endotoxin-frei)

- Von den Kulturen, die das richtige Insert enthalten, wurde mit 20 μ l der Starterkultur je 100 ml Ampicillin-selektives LB-Medium angeimpft.
- Über Nacht bei 37°C schütteln.
- Ernten der Bakterien durch Zentrifugation für 15 min bei 4000 rpm.
- Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Isolierung erfolgt mit einem Endotoxin-freien Plasmid Kit, da Endotoxine die Transfektionseffizienz stark vermindern.

- Zur dauerhaften Lagerung der Bakterien wurden Glycerin-Stocks angelegt. Dazu wurde 1 ml Kultur mit 15 % Glycerin bei -80°C eingefroren.

DNA-Isolation aus Gewebeschnitten

Bei der DNA-Isolation aus Gewebeschnitten wird ein Proteinase K-Verdau durchgeführt, um die Proteine zu lysieren und die DNA für weitere Analysen, z.B. PCR, zugänglich zu machen.

- Ein abgekratzter Schnitt wird mit 50 μ l DNA-Isolationspuffer überschichtet und über Nacht bei 56°C inkubiert.
- Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt für 30 min bei 68°C.

4.3.4. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration einer DNA-Lösung bestimmt man durch eine Messung der Absorption des Lichtes bei der Wellenlänge ihres Absorptionsmaximums (260 nm) in einem Spektralphotometer. Um Verunreinigungen durch andere Licht absorbierende Stoffe auszuschließen, wird stets eine Nullkontrolle als Referenz verwendet, die aus dem Lösungsmittel besteht, in dem auch die DNA verdünnt ist. Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

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

Bestimmt man zusätzlich die Absorption bei 280 nm, so gibt das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ an, inwieweit die DNA-Lösung mit Protein-Resten verunreinigt ist. Das Verhältnis liegt für reine DNA-Präparationen bei 1,8.

4.3.5 Gelelektrophoresen

Die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Konformation erfolgt durch Anlegen eines elektrischen Feldes an eine auf einer Trägermatrix aufgetragenen DNA. Da die DNA eine negative Ladung trägt, wandern die Moleküle in Richtung des positiven Pols. Man unterscheidet je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente zwei Systeme von Gelen: a) Polyacrylamid- (PAA-) Gele eignen sich für die Auftrennung von kleinen Fragmenten (1-500 Bp) und unterscheiden DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe und ihrer Konformation; b) Agarosegele werden für die Auftrennung von größeren Fragmenten (200 Bp - 50 kBp) entsprechend ihrer Größe verwendet.

Agarosegelelektrophorese

- Man schmilzt die Agarose in einem Puffer, der auch als Laufpuffer verwendet wird (1 x TAE oder 1 x TBE) durch Aufkochen in einem Mikrowellenherd bis zur Homogenität der Lösung.
- Der auf ungefähr 60°C abgekühlten geschmolzenen Agarose wird 1 µg/ml einer Ethidiumbromid-Stocklösung (10mg/ml) zugegeben und in den Gelrahmen mit Kamm luftblasenfrei gegossen.
- Nach Erstarren der Gelmatrix entfernt man den Kamm und füllt die Gelkammer mit Laufpuffer so weit auf, bis der Flüssigkeitsspiegel über dem Gel liegt. Die Taschen werden mit Pufferlösung ausgespült.
- Die aufzutragenden Proben werden mit 1/5 Auftragsvolumen 5 x Ficoll Ladepuffer gemischt.
- Die Elektrophorese findet in dem entsprechenden Puffer statt.
- Photographieren des Gels unter UV-Licht der Wellenlänge 260 nm.

Polyacrylamidgele

Die Anwendung von Polyacrylamidgelen bietet sich für folgende Analysen an (Beschreibungen in den entsprechenden Kapiteln):

- Western-Blot (siehe 4.6.4).
- Sequenzierung (siehe 4.3.7).

4.3.6 Restriktionsverdau

Verdau von Plasmid-DNAs (*NPHS1*, *NPHS2*, *CD2AP*)

Zur Bestimmung der richtigen Insertgröße werden die Plasmid-DNAs, die *NPHS1*, *NPHS2* und *CD2AP* enthalten, mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen verdaut.

- Verdau von 50 ng DNA in einem 10 µl Reaktionsansatz.
- Pufferkomponenten und Konzentrationen werden an die jeweiligen Angaben des Herstellers angeglichen (siehe Tabelle 4.1).

Plasmid-DNA	Enzym	Hersteller	Puffer	Hersteller
<i>CD2AP</i>	Bam HI	MBI	Y ⁺ /Tango	MBI
	Xho I	Roche	Y ⁺ /Tango	MBI
<i>NPHS2</i>	Not I	MBI	Y ⁺ /Tango	MBI
	Eco RI	MBI	Y ⁺ /Tango	MBI
<i>NPHS1</i>	Hind III	MBI	Y ⁺ /Tango	MBI
	Xba I	MBI	Y ⁺ /Tango	MBI

Tabelle 4.1: Verwendete Restriktionsenzyme mit ihren Pufferbedingungen

- Reaktionsansatz:

50 ng	Plasmid-DNA
10 U	pro Enzym
1/5 Vol	10 x Puffer
auf 10 µl	H ₂ O
- Inkubation bei 37°C für 1 h.

- Auftragen des gesamten Ansatzes + 1/5 Volumen 5 x Ficoll-Ladepuffer auf ein 1 %iges Agarosegel.
- Elektrophorese bei 80 V in 1 x TAE.

4.3.7 Sequenzierung mit dem Big Dye Terminator-Kit (Applied Biosystems)

Sequenzierung von PCR-Produkten

Mastermix für die Sequenzreaktion:

15 ng	gereinigtes PCR-Produkt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen)
1,5 µl	Big Dye Reaction Buffer (5x)
1 µl	Big Dye Terminator-Mix
0,5 µl	spezifischer Primer (10 µM)
auf 10 µl	steriles H ₂ O

Sequenzreaktion:

94°C	2 min	} 25x
96°C	10 sec	
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

Produktaufreinigung erfolgt durch Präzipitation:

10 µl	Sequenzierungs-Produkt
46 µl	H ₂ O
6,3 µl	NaAc (3M)
156 µl	100 % EtOH (RT)

- Mischen und 30 min bei 4°C halten.
- 20 min bei 12000 rpm zentrifugieren.
- Überstand abpipettieren und das unsichtbare Pellet zweimal mit 200 µl 70 % EtOH waschen.
- 10 min bei 12000 rpm zentrifugieren.
- Überstand abpipettieren und das Pellet ca. 10 min bei 37°C trocknen.

Der Gellauf für die Sequenzierungen wurde im Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf durchgeführt.

4.4 RNA-Analysen

4.4.1 RNA-Isolierung

RNA-Isolation nach Laser-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.

Mikrodissektion an Kryoschnitten:

a) Herstellung der Gefrierschnitte:

- Objektträger wurden vor dem Auftrag des Nierenschnittes 5 h bei 200°C inkubiert, getrocknet, luftdicht verpackt.
- Nach Anfertigung der 10 µm Kryoschnitte wurden die Schnitte auf Objektträger aufgetragen und direkt im Kryostaten eingefroren (keine Lufttrocknung).
- Objektträger mit Schnitt bei -80°C lagern

b) Färbung und Entwässerung:

- Schnitte 30 sec in 70 % EtOH fixieren.
- Schnitte 30 sec in H₂O-DEPC wässern.

- Schnitte 30 sec in Hämatoxylin färben.
 - Schnitte in H₂O-DEPC entfärben.
 - Schnitte je 45 sec in 70 %, 100 % und 100 % EtOH entwässern.
 - Schnitte 3 min in Xylol entwässern.
 - Xylol abdampfen lassen (ca. 3 min).
- c) Einstellungen am LCM-Gerät:
- Duration: 850 ns; Repeat: 0,2 s; Target: 0,205 V; Current: 18,0 mA; Spotsize: 30 µm; Power: 80 mW
 - Bei der Mikrodissektion für RNA-Isolierung wurde darauf geachtet, dass weniger als eine Stunde/Schnitt mikrodissektiert wurde.
- d) RNA-Isolierung mittels StrataPrep total-RNA Microprep Kit (Stratagene):
- Zu 100 µl Lysepuffer wurden 0,7 µl beta-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 mindestens 20 µl Elutionspuffer eluiert.

RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen

Total RNA wurde aus Gefrierschnitten (10 µm dick) und Zellen mit dem RNA Microprep Kit von Stratagene oder mit dem Rneasy Micro Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert. Nachdem das Gewebe mit einem Lysepuffer, der das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat enthält, lysiert wird, gibt man das Lysat auf eine Silicamatrix. Eine DNase-Behandlung erfolgt direkt auf der Säule. Nach verschiedenen Waschschrinen wird die RNA mit einem Niedrigsalzpuffer von der Säule eluiert.

4.4.2. RNA-Konzentrationsbestimmung durch photometrische Messung

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 260nm gemessen und das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zur Bestimmung des Grades an eventuellen Verunreinigungen mit Proteinresten berechnet. Es sollte für nicht verunreinigte RNA-Präparationen $\cong 2,0$ betragen.

4.4.3 RNA-Qualitätsbestimmung mittels Bioanalyzer (Agilent)

Diese Technik erlaubt die Analyse von biologischem Material (DNA, RNA, Protein) auf winzigen Trägern (Glaschips), in die feinste Reaktionskammern und Transportkanälchen von weniger als 10 µm Durchmesser eingätzt sind. Das Detektionslimit liegt für RNA bei 5 ng/µl. Die Software stellt die Daten in Form eines Elektropherogramms oder eines Gelbildes dar.

Bestimmung der RNA-Menge

Eine RNA-Leiter dient als Referenz für die Datenanalyse. Sie enthält 6 RNA-Fragmente zwischen 0,2 und 6 kbp mit einer Gesamtkonzentration von 150 ng/µl (siehe Abbildung 4.2A). Die Software vergleicht nun die unbekanntes Proben mit den Leiterfragmenten und bestimmt daraus zum einen die Konzentration der Proben und zum anderen die Peaks der verschiedenen ribosomalen RNAs. Die Konzentration der RNA wird bestimmt, indem die Fläche unter der gesamten Kurve bestimmt und mit der Fläche unter der Kurve der RNA-Leiter verglichen wird.

Bestimmung der RNA-Qualität

Die Bestimmung der RNA-Qualität erfolgt anhand der Detektion der ribosomalen RNAs (siehe Abbildung 4.2B). Peak 1 kann die 5.8S, 5S und die tRNA enthalten. Peak 2 enthält die

18S rRNA und Peak 3 die 28S rRNA. Die Baseline zwischen 29 sec und der 18S rRNA sollte möglichst flach sein. Die Software bestimmt das Verhältnis des 18S- und 28S-Peaks. Dieses Verhältnis bestimmt weitgehend die Qualität der RNA-Präparation. Ein Verhältnis von $18S/28S = 2$ kennzeichnet eine optimale RNA-Präparation.

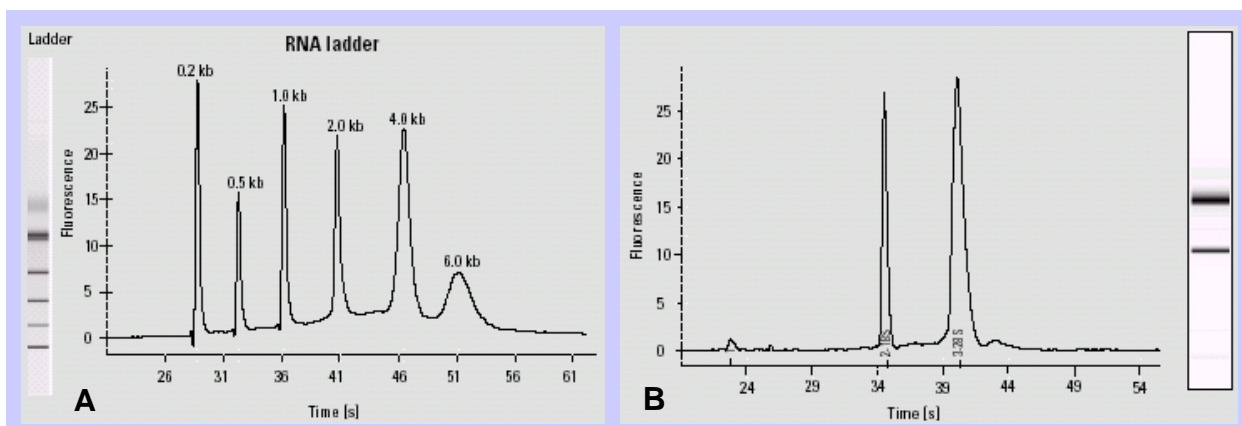


Abbildung 4.2: A) Elektropherogramm der RNA-Leiter. B) Elektropherogramm einer optimalen RNA-Präparation (Agilent).

4.4.4. Reverse Transkription

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 (RT-PCR) durchgeführt.

Protokoll der cDNA-Synthese für die semiquantitativen RT-PCRs und die quantitativen SYBRgreen RT-PCRs bzw. Assay on demand RT-PCRs

- Für die cDNA-Synthese wurden im ersten Schritt folgende Bestandteile für das Oligonukleotid-Annealing zusammengefügt:
 - 1-5 µg total RNA
 - 1,0 µl Random Hexadesoxynukleotide (100 ng)
 - auf 9,2 µl H₂O (DEPC)
- 10 min bei 70°C inkubieren, dann 2 min auf Eis abkühlen
- Für die cDNA-Synthese wurde im zweiten Schritt folgende Bestandteile zugefügt:
 - 1,3 µl BSA (1,5 mg/ml)
 - 0,5 µl RNasin (40 U/µl)
 - 2,0 µl 0,1 M DTT (Invitrogen)
 - 1,0 µl 10 mM dNTP
 - 4,0 µl 5 x RT-Puffer (Invitrogen)
 - 1,0 µl Superscript RT Enzym (Invitrogen)
- 60 min bei 37°C inkubieren; Enzym 10 min bei 95°C inaktivieren, abzentrifugieren und bei -20°C lagern.
- Als Kontrolle wird immer ein Ansatz ohne die Reverse Transkriptase Superscript II mitgeführt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

cDNA-Synthese für die Real-Time RT-PCR der WT1-Isoformen

Die cDNA-Synthese wurde mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

- Reaktionsansatz für die vier *WT1*-Isoformen und *18S rRNA*:

Komponente	Volumen (µl)	Endkonzentration
10 x TaqMan RT Puffer	1,0	1 x
25 mM MgCl ₂	2,0	5,5 mM
dNTPs	2,0	500 µM von jedem dNTP
Random Hexamers	0,5	2,5 µM
Rnase Inhibitor	0,2	0,4 U/µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	0,25	1,25 U/µl
DEPC-H ₂ O	2,85	-
RNA	1,0	wie benötigt
Σ	10,0	

- PCR-Cycler-Bedingungen:

	Reverse Transkription	Inaktivierung der RT
Temperatur	25°C	48°C
Zeit	10 min	30 min
		95°C
		5 min

Als Kontrolle wird auch hier immer ein Ansatz ohne die „MultiScribe Reverse Transcriptase“ mitgeführt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen.

4.4.5 RT-PCR

Semiquantitative RT-PCR

Bei einer semiquantitativen RT-PCR muss immer ein interner Standard in den Reaktionen mitgeführt werden. Dafür wählt man ein in dem zu analysierenden Gewebe konstitutiv exprimiertes Gen („Housekeeping-Gen“), mit dessen Expression dann die Expressionslevel der zu analysierenden Gene verglichen werden. Dadurch kann eine stärkere Amplifikation aufgrund höherer cDNA-Konzentration ausgeschlossen werden. Die Standardisierung erfolgte anhand des Nachweises des Housekeeping-Gens *GAPDH*.

Um eine quantitative Aussage über das PCR-Produkt treffen zu können, muss eine Messung der Amplifikation während der exponentiellen Phase erfolgen. Um dies zu gewährleisten, werden von jeder Probe nach verschiedenen Zyklen 5-15 µl PCR-Produkt (angepasst an die exponentielle Phase der PCR) entnommen. Die Proben jeder PCR-Reaktion werden auf einem 2- oder 3 %igen Agarosegel (je nach Größe des PCR-Produktes) elektrophoretisch aufgetrennt.

Die genaue Quantifizierung der Banden erfolgte mittels der AIDA Image Analysis 2.11-Software (Raytest) nach Detektion der DNA mit Hilfe des Phosphorimager FLA 3000 (Fuji). Die Quantifizierung wurde nach Anleitung des Softwareherstellers durchgeführt.

- *Reaktionsansatz*:

Komponenten	Volumen (µl)	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer (Invitrogen)*	5,0	1 x
10 mM dNTPs	1,0	
Forward Primer (10pmol/µl)	1,0 – 2,5	wie benötigt
Reverse Primer (10pmol/µl)	1,0 – 2,5	wie benötigt
Taq DNA-Polymerase	0,5	
H ₂ O	auf. 50,0	
Template (cDNA)	max. 5,0 unverdünnt	
Σ	50,0	

* falls nicht anders angegeben (siehe Tabelle 4.2 mit den Annealing-Temperaturen)

- *PCR-Cycler-Bedingungen:*

	PCR (40 Zyklen)				
	Initielle Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Extension	Finale Extension
Temperatur	95°C	95°C	siehe Tabelle 4.2	72°C	72°C
Zeit	3 min (hot start)	1 min	1 min	1 min	10 min

- *Annealing-Temperaturen der RT-PCR-Primer:*

Gen	Annealing-Temperatur [°C]
alpha Actinin 4 (ACTN4)	60
CD2-associated protein (CD2AP)	53
Collagen IV alpha 1/2 ¹ (COL4A1/2)	59
Collagen IV alpha 4 ^{1,2} (COL4A4)	57
Collagen IV alpha 5 (COL4A5)	68
Decorin (DCN)	68
Densin (DN)	56
Dystroglycan (DG)	60
Endoglin	68
Endothelin 2 (ENT2)	68
Glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1)	60
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	68
Insulin-like growth factor 2 (IGF2)	68
Integrin, alpha 5 (ITGA5)	68
Integrin, beta 3 (ITGB3)	68
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1)	68
Laminin beta 1 (LAMB1)	59
Laminin beta 2 ¹ (LAMB2)	64
Lumican	68
Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	68
Natural killer cell transcript 4 (NK4)	68
Nephrin (NPHS2)	60
Neuropilin-1	55
Osteopontin	68
Osteoprotegerin (OPG)	68
Pax2	68
Pod-1 (TCF21)*	65
Podocin	60
Podoplanin	60
Sex determining region Y-box 9 (SOX9)	68
Synaptopodin	60
Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)	55
Tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)	55
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	68
Vascular endothelial growth factor A (VEGF Ex7a/ VEGF 3'UTR)	55
Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1)	68
Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)	55
Villin 2 (Ezrin)	68
Wilms' tumor 1 gene (WT1)	68

Tabelle 4.2: Annealing-Temperaturen der RT-PCR Primer. ¹PCR mit 10% DMSO, ²PCR mit Puffer AF

Real-Time RT-PCR

a) Real-time RT-PCR mit TaqMan-Sonden (*WT1*-Isoformen)

Bei der real-time PCR arbeitet man mit einer fluorogenen Sonde und macht sich die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase zunutze. Das 5'-Ende der Sonde ist mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff markiert, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff trägt. Wird die Sonde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, findet aufgrund der räumlichen Nähe zueinander ein Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen Reporter und Quencher statt, der die Fluoreszenz des Reporters verhindert. Während der Annealing-Phase der PCR binden sowohl die Primer, als auch die Sonde an die DNA-Matrize. In der Extensionsphase trifft die DNA-Polymerase auf die Sonde und hydrolysiert diese aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität. Damit wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben und es kann kein Energietransfer mehr stattfinden. Nun kann die Fluoreszenz des Reporters nach Anregung detektiert werden. Je mehr PCR-Produkt entsteht, umso stärker fluoresziert der Ansatz. Der erhaltene C_T -Wert (= „*threshold cycle*“) drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Grundlinie erfasst wird. Im sogenannten „*amplification plot*“ wird das normalisierte Reportersignal über der Zyklenzahl dargestellt. Der normalisierte Reporter-Wert R_n entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität des passiven Referenzfarbstoffes ROX. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsveränderungen aufgrund von Pipettierfehlern können so ausgeglichen werden. Der „*threshold*“ stellt einen Schwellenwert für die gemessene Reporterfluoreszenz dar.

Die Quantifizierung erfolgt relativ zu einem gewählten Standard. Bei der Form der hier gewählten relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_T$ -Methode) wird die Zielsequenz relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz bestimmt. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz abgeschätzt. Als Standards dienen sogenannte Housekeeping-Gene wie z.B. hier die *18S rRNA*. Um die $\Delta\Delta C_T$ -Berechnung anwenden zu können, muss die Effizienz der Zielsequenz- wie auch der Referenzreaktion nahezu identisch sein. Eine sehr empfindliche Methode, um zu überprüfen, ob die Effizienzen zweier Amplicons gleich sind, bietet ein Vergleich des ΔC_T ($= C_{T \text{ Gen}} - C_{T \text{ Housekeeper}}$) bei verschiedenen Verdünnungsstufen der Matrizen. Die hierzu benötigten Daten liefern die verwendeten Standardkurven der *WT1*-Isoformen und der *18S rRNA*. Man trägt den log der Startkonzentration über ΔC_T auf. Sind die Effizienzen für beide Amplicons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Mit Hilfe dieses Vorexperiments kann bei Anwendung der $\Delta\Delta C_T$ Methode gezeigt werden, dass die Effizienzen beider Reaktionen von Zielsequenz und Referenz ungefähr gleich sind. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung des Graphen <0.1 sein. Kann dies gezeigt werden, so kann die $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden. Der ΔC_T -Wert wird durch Subtraktion des *18S rRNA*- C_T - Mittelwerts vom Mittelwert der C_T s der einzelnen *WT1*-Isoformen erhalten. Zur Berechnung des ΔC_T -Werts wird jeweils der ΔC_T -Wert des Kalibrators von dem der Zielsequenz abgezogen.

Protokoll für die WT1-Isoformen:

Die Real-time RT-PCR-Reaktionen wurden in Quadruplikaten mit cDNA aus 50 ng Total-RNA und der HotGold Star-Polymerase (Eurogentec) auf dem TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems) durchgeführt.

- **Reaktionsansatz:**

Komponenten	Volumen (µl)	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	2,0	1 x
25 mM MgCl ₂	1,92	1,38 mM
2,5 mM dNTPs	1,6	136 µM von jedem dNTP
Forward Primer	2,0	wie benötigt
Reverse Primer	2,0	wie benötigt
TaqMan Sonde	2,0	200 nM
Hot GoldStar Enzym	0,1	0,025 U/µl
H ₂ O	4,38	
Template	4,0	
Σ	20,0	

- **Primerkonzentrationen (optimiert in Diplomarbeit Schuhen, 2002):**

Isoform	Primerkombination	Konzentration (nM)
+Exon5/ +KTS	1/2	300/ 300
+Exon5/ -KTS	1/3	300/ 900
-Exon5/ +KTS	2/4	300/ 900
-Exon5/ -KTS	3/4	300/ 900

- **PCR-Bedingungen:**

	PCR (40-60 Zyklen)			
	UNG-Inkubation	Aktivierung der AmpliTaq Gold	Denaturierung	Annealing/Extension
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C
Zeit	2 min	10 min	15 sec	1 min

Abbildung 4.3 zeigt die Lage der vier Primer und der fluorogenen Sonde für die Detektion der vier *WT1*-Isoformen.

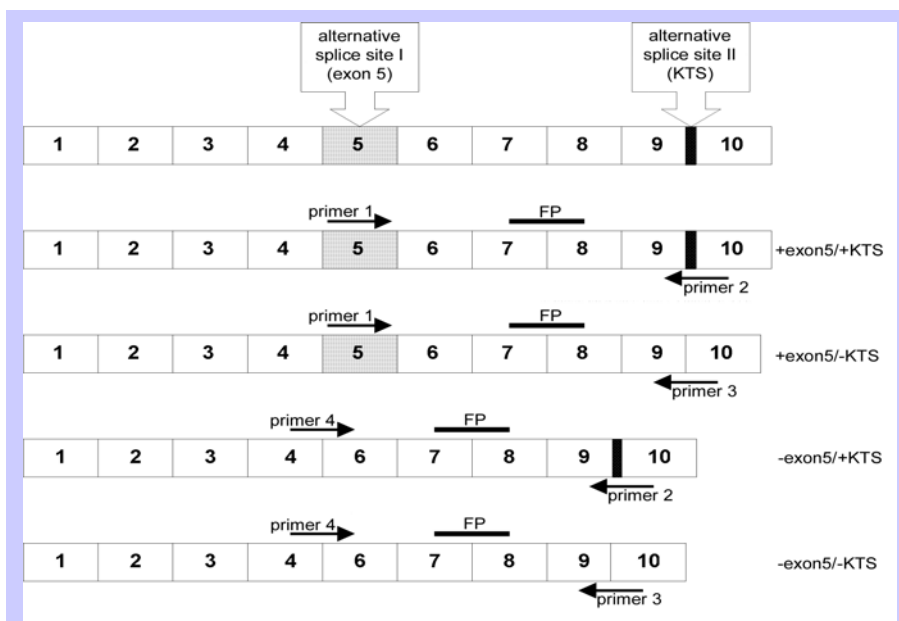


Abbildung 4.3: Lage der vier verschiedenen Primerkombinationen und der TaqMan-Sonde (FP) im *WT1*-Gen. 1-10 = Exons.

Der 2-minütige Schritt bei 50°C wird für eine optimale AmpEraseUNG (= Uracil-N Glykosylase)-Aktivität benötigt.

Protokoll für die endogene Kontrolle 18S rRNA (Kit von Applied Biosystems):

Als endogene Kontrolle wurde die kommerziell erhältlichen fertigen TaqMan-Reagents mit optimierten Primern und Sonde für die humane *18S rRNA* der Firma Applied Biosystems verwendet.

- *Reaktionsansatz:*

Komponenten	Volumen (µl)	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	2,0	1 x
25 mM MgCl ₂	1,92	1,38 mM
2,5 mM dNTPs	1,6	136 µM von jedem dNTP
Hot GoldStar Enzym	0,1	0,025 U/µl
<i>18S rRNA</i> (Primer und Sonde)	1,0	1 x
H ₂ O	9,38	
Template	4,0	
Σ	20,0	

- *PCR-Bedingungen:*

Die PCR-Bedingung für die *18S rRNA* entspricht der für die vier *WT1*-Isoformen.

b) Real-time RT-PCR mit den Assays on demand (Applied Biosystems)

Bei den Assay on demand Produkten der Firma Applied Biosystems handelt es sich um optimierte, gebrauchsfertige 5'-Nuklease-Assays für die Detektion und Quantifizierung spezifischer humaner Nukleinsäuresequenzen.

- *Reaktionsansatz:*

Komponenten	Volumen [µl]	Endkonzentration
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), No AmpErase UNG	10,0	1 x
Assay-on-demand Gene Expression Assay Mix (20x)	1,0	1 x
cDNA	2,0	
H ₂ O	7,0	
Σ	20,0	

- *PCR-Bedingungen:*

		PCR (40 Zyklen)	
	Initielle Denaturierung	Denaturierung	Annealing/Extension
Temperatur	95°C	95°C	60°C
Zeit	10 min	15 sec	1 min

c) Real-time RT-PCR mit SYBR Green I (Sigma)

Der SYBR Green I-Farbstoff besitzt eine hohe Bindungsaffinität zur kleinen Furche doppelsträngiger DNA. Das Excitationsmaximum liegt bei 497 nm und das Emissionsmaximum bei 520 nm. Ungebunden zeigt der Farbstoff eine nur sehr schwache Fluoreszenz, erst bei Bindung kommt es zu einem starken Anstieg. Die Fluoreszenzintensität erreicht ihr Maximum in der Elongationsphase bei der Verlängerung durch die Polymerase. Die Durchführung von Schmelzkurven ist bei der Bestimmung eventueller Primerdimere wichtig.

- *Reaktionsansatz:*

Komponenten	Volumen [μ l]	Endkonzentration
SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (2 x)	10,0	1 x
Interner Referenzfarbstoff	0,2	
Primer forward (10pM/ μ l)	0,4	0,2 μ M
Primer reverse (10pM/ μ l)	0,4	0,2 μ M
cDNA	2,0	
H ₂ O	7,0	
Σ	20,0	

- *PCR-Bedingungen:*

	PCR (40 Zyklen)			
	Initielle Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Extension
Temperatur	95°C	95°C	60°C	72°C
Zeit	10 min	15 sec	1 min	1 min

- *Annealing-Temperatur der Primer:*

Gen	Annealing-Temperatur [°C]
Collagen I alpha 1 (COL1A1)	55
Collagen IV alpha 2 (COL4A2)	68
Collagen IV alpha 4 (COL4A4)	68
Collagen VI alpha 1 (COL6A1)	55
Early growth response 1 (EGR1)	68
Fibronectin 1 (FN1)	55
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	68
Gremlin	68
Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1A)	68
Inhibin alpha (INHA)	68
Insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)	68
Integrin beta 4 (ITGB4)	68
Lamin A/C	60
Laminin beta 1 (LAMB1)	59
p21	68
Tumor necrosis factor alpha (TNFA)	68
Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	68
Wilms' tumor 1 gene (WT1)	68

Tabelle 4.3: Annealing-Temperaturen der SYBRgreen-Primer.

- *Schmelzkurve*

Die Anfertigung der Schmelzkurven erfolgte direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion:

	Denaturierung		Ramp-Schritt	
Temperatur	95°C	60°C	19,59 min	95°C
Zeit	15 sec	20 sec	bis 95°C	30 sec

Im Falle eines Gelauftrags nach der Schmelzkurve sollte man noch einen Zyklus der PCR-Reaktion anschließen, um wieder das spezifische doppelsträngige PCR-Produkt zu erhalten.

4.5 Array-Analysen

4.5.1 cDNA-Arrays (human 3.6 Array, Clontech)

Expressionsprofile primärer Podozyten- und Mesangiumzellkulturen

Es wurden Expressionsprofile von primären Podozyten und Mesangiumzellen mit Hilfe von cDNA-Arrays (Atlas 3.6 human cDNA Expression Arrays, Clontech) erstellt. Die RNA von gesunden und erkrankten Podozyten sowie von Mesangiumzellen wurde extrahiert (siehe 4.4.1), cDNA synthetisiert, radioaktiv markiert und dann auf den cDNA-Array hybridisiert. Die Arrays bestehen aus Nylonmembranen, auf die genau charakterisierte Oligonukleotide gespottet sind. Bei dem Atlas 3.6 Array-Kit handelt es sich um drei Macro-Nylonarrays (je 8 x 12 cm) mit je 1188 einfach gespotteten cDNAs bekannter Gene.

Protokoll der Array Hybridisierung:

Die Markierung der Proben (cDNA-Synthese) und Hybridisierung der Filter erfolgten nach Protokollen des Herstellers. Abweichungen sind im Folgenden aufgeführt:

- Die Menge des Master Mix wurde verdoppelt, aber es wurden statt 7 µl [α 33 P]dCTP nur 5 µl verwendet.
- Es wurden zwischen 3,0 und 3,4 µg RNA pro Filter eingesetzt.
- Um die Genauigkeit und Effizienz zu erhöhen, wurde für die cDNA-Synthese ein Gemisch aus MMLV (Clontech) und Superscript II (Invitrogen) verwendet.
- Zur Reinigung der cDNA wurde die Probe auf 400 µl mit Puffer NT2 verdünnt.

Die Waschprozedur der Filter wurde wie folgt verändert:

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

Die Exposition der Filter erfolgte auf Imaging Plates der Firma Fuji für 72-96 h in einer Bleibox. Die Auswertung der Arrays erfolgte mittels eines Fuji Phosphorimagers und der AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware der Firma Raytest (siehe 4.5.3).

4.5.2 cRNA-Arrays (human U133A Array und human Focus Array, Affymetrix)

Expressionsprofile primärer Podozytenkulturen

Im Unterschied zu den Arrays der Firma Clontech wird hier Biotin-markierte cRNA auf die Arrays hybridisiert. Das Ausgangsmaterial beträgt zwischen 1-15 µg Total-RNA, wobei die Amplifikation der RNA in einem Zyklus erfolgte. Die RNA wird zuerst mit T7-Oligo(dT)-Primern während der Erststrangsynthese revers transkribiert. Nach der RNase H-vermittelten Zweitstrangsynthese wird die doppelsträngige cDNA aufgereinigt und dient als Template für die *in vitro* Transkription (IVT). Die IVT-Reaktion verläuft in Anwesenheit einer T7-RNA-Polymerase und einem biotinylierten Nukleotid-Analogen/Ribonukleotid-Mix für komplementäre RNA (cRNA), Amplifikation und Biotinmarkierung. Die biotinylierte cRNA wird dann aufgereinigt, fragmentiert und auf die GeneChip Expressionsarrays hybridisiert (siehe Abbildung 4.4).

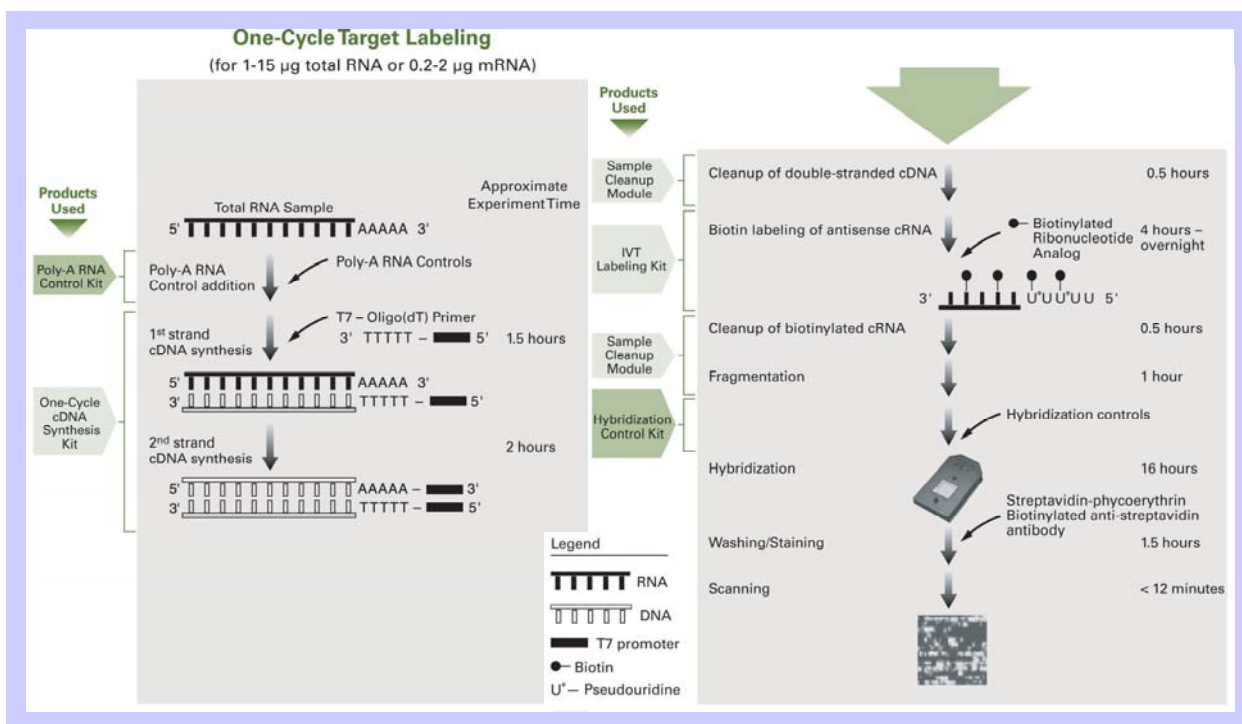


Abbildung 4.4: Ablauf der Probenvorbereitung für die GeneChip Expressionsarrays (Affymetrix). Erklärung im Text.

Protokoll für die *in-vitro* Transkription aus Total-RNA

a) Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer (siehe 4.4.3)

Die Qualität der RNA ist für das Ergebnis des ganzen Versuches von großer Bedeutung. Gleichzeitig dienen die Bioanalyzer-Ergebnisse auch zur Quantifizierung und damit zur Bestätigung der RNA-Mengen, die über das Spektrometer bestimmt wurden.

b) Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

- Auf Eis Zugabe von:
 - x µl total RNA (1-5 µg)
 - 2,0 µl Oligo-dT-T7-Primer (50 µM)
 - mit dH₂O auf 11 µl auffüllen
- 10 min bei 70°C inkubieren (Thermoblock), dann sofort auf Eis stellen.
- Zugabe von:
 - 4 µl Erststrang-Puffer (5 x)
 - 2 µl DTT (0,1 M)
 - 1 µl dNTP (10 mM)
 - 1 µl RNasin, (gesamt 19 µl)
- Mittels Pipette vermischen, für 2 min bei 42°C inkubieren (Thermocycler).
- Zugabe von 1 µl Superscript II (200 U/µl), mittels Pipette vermischen.
- 1 h bei 42°C inkubieren (Thermocycler), kurz abzentrifugieren, dann auf Eis stellen.

c) Herstellung von doppelsträngiger cDNA (Zweitstrangsynthese)

- Auf Eis Zugabe von:
 - 20 µl cDNA-Probe
 - 91 µl H₂O-DEPC
 - 30 µl Zweitstrang-Puffer (5 x)
 - 3 µl dNTP (je 10 mM)
 - 1 µl E.coli DNA-Ligase (10 U/µl)
 - 4 µl E.coli DNA-Polymerase I (10 U/µl)
 - 1 µl RNase H (2 U/µl) (gesamt 150 µl)

- Mittels Pipette vermischen und sofort 2 h bei 16°C (Thermocycler) inkubieren.
 - Zugabe von 2 µl T4-DNA-Polymerase (10 U), 5 min bei 16°C inkubieren (Thermocycler).
 - Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M).
- d) Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA (Genchip Sample-Clean Up Module, Affymetrix) nach Angaben des Herstellers
- dsDNA bei -20°C lagern oder direkt In vitro-Transkription.
 - Aliquot von 1 µl für Gel aufbewahren (Lagerung bei -20°C).
- e) In vitro Transkription (ENZO): Synthese von Biotin-markierter cRNA
- Bei RT pipettieren:
 - 12 µl dsDNA
 - 10 µl dH₂O
 - 4 µl HY-Reaction Buffer 10 x
 - 4 µl Biotin Labeled Ribonucleotides 10 x
 - 4 µl DTT 10 x
 - 4 µl RNase Inhibitor 10 x
 - 2 µl T7-Polymerase (gesamt 40 µl)
 - Mittels Pipette mischen, für 5 h bei 37°C inkubieren (Wasserbad), alle 30 min mischen.
 - Lagerung bei -20°C bzw. -80°C möglich.
 - Aliquot von 0,4 µl für Gel aufbewahren (Lagerung bei -80°C).
- f) Aufreinigung der Biotin-markierten cRNA (Genchip Sample-Clean Up Module, Affymetrix) nach Angaben des Herstellers
- Lagerung der cRNA bei -80°C.
 - Aliquot von 0,2 µl für Gel aufbewahren (Lagerung bei -80°C).
- g) Quantifizierung und Qualitätsbestimmung der Biotin-markierten cRNA
- Bestimmung der RNA-Menge im Photometer.
 - Bestimmung der RNA-Qualität mittels Bioanalyzer.
- h) Fragmentierung der cRNA
Bei der Fragmentierung wird die cRNA in Fragmente zwischen 35-200 Basen durch Metall-induzierte Hydrolyse zerlegt.
- Zugabe von:
 - 14 µl cRNA-Probe (10-15 µg/Chip)
 - 6 µl Fragmentierungspuffer (5 x)
 - mit dH₂O auf 30 µl einstellen (10 µl)
 - 35 min bei 94°C inkubieren (im Thermoblock), auf Eis stellen.
 - Aliquot von 1 µl für Gel aufbewahren (Lagerung bei -80°C).
 - Fragmentierte cRNA bei -80°C lagern.
- i) Hybridisierung
Das Hybridisieren, Waschen, Färben und Scannen erfolgte im Institut für Onkologische Chemie der Universität Düsseldorf, da hier die benötigten Reagenzien sowie der Scanner zur Verfügung standen.

4.5.3 Auswertung der Expressionsanalysen

Clontech-Arrays

Die benutzten Nylonarrays wurden nach der Waschprozedur zwischen zwei Whatmanpapieren kurz getrocknet, in Frischhaltefolie faltenfrei eingepackt und auf Imaging-Platten gelegt. 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. Es wurde darauf geachtet, die Expositionszeiten immer gleich lange (72-96 h) zu gestalten. Sie wurden in einer Bleibox ausgeführt, da durch diese die unspezifische Hintergrundstrahlung um den Faktor fünf reduziert wird.

Die Array-Scans wurden am Phosphorimager auf CD gebrannt und später in die AIDA-Array-Image-Auswertungssoftware (Version 3.1) der Firma Raytest eingeladen. Für die Auswertung wurden die reinen Intensitätswerte (Integralwerte) mit Hilfe der Raytest-Software nach Angaben des Herstellers ermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte anschließend mit Hilfe von LIMMA 2.0.0 (Linear Models for Microarray Data), einem Zusatzpaket zur Statistik-Software-Umgebung R (R-Projekt). Die Wahl fiel auf diese Software, da sie speziell auf die Detektion differenziell exprimierter Gene ausgelegte Algorithmen enthält, die auch auf die einkanalen Experimente der Nylonarrays anwendbar sind. Einer Empfehlung von Smyth folgend, wurden die Daten vor der eigentlichen Analyse, d.h. der Bestimmung von p -Werten für differenzielle Genexpression, mittels der „vs n “-Methode normalisiert (Smyth, 2005).

Affymetrix-Arrays

Ist der Array eingescannt, wird ein sogenanntes „image file“ („dat file“) angelegt, das nur das Bild enthält. Die Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS) erstellt dann aus dem Bild Intensitäts-Daten, die in dem „image file“ („cel file“) angelegt werden und durch den „Cell Analysis Algorithm“ erstellt werden. Die Intensitätsdaten werden analysiert und als „chp file“ gespeichert. Dieses enthält die qualitativen und quantitativen Informationen der Datenanalyse für jedes „probe set“ des Arrays sowie für die Kontrollen. Aus diesem „chp file“ wird wiederum ein „report file“ kreiert („rpt file“), in das als Text die Information der Datenqualität eines jeden Arrays zusammengefasst wird. Sowohl die Qualität der Bilder als auch die Qualität der RNA und der Hybridisierung wurden überprüft (vergleiche Ergebnisse 5.3.2).

Zur Normalisierung und statistischen Auswertung der Daten standen nun zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

a) Die Affymetrix GeneChip Operating Software GCOS, der der MAS 5.0-Algorithmus zugrunde liegt, bestimmt die Expressionslevel für jedes „probe set“. Der Algorithmus generiert aus den „probe pair“-Intensitäten einen „detection p -value“, der gegen Benutzer-bestimmte „cut-offs“ evaluiert wird und den „detection call“ bestimmt. Dieser „call“ zeigt an, ob ein Transkript detektiert („present“) oder nicht detektiert („absent“) wurde (Hubbell et al., 2002; Wilson und Miller, 2005).

b) Zur Auswertung wurde jedoch das Statistikpaket Simpleaffy ausgewählt, einer ebenfalls auf R aufsetzenden Zusatzsoftware. Hierin steht neben dem MAS 5.0-Algorithmus auch der RMA-Algorithmus zur Verfügung. Zunächst wurden für die einzelnen Arrays sogenannte QC-Werte zur Qualitätskontrolle erzeugt, um misslungene Hybridisierungen auszuschließen und die Vergleichbarkeit der Experimente sicherzustellen. Die Parameter dieser QC-Werte, wie durchschnittlicher Hintergrund, Anzahl der als „present“ detektierten Transkripte sowie der normalisierende „scale factor“ zwischen den Arrays, wurden dabei vom MAS 5.0-Algorithmus erzeugt. Erwies sich die Hybridisierung als gelungen, wurden die Daten vor der statistischen Auswertung jedoch erneut über den RMA-Algorithmus normalisiert. Während die erwähnten MAS 5.0-Parameter hilfreich bei der Qualitätskontrolle waren, zeigte sich nämlich die RMA-Methode letztlich bei der Normalisierung überlegen (siehe Seite 86, Abbildung 5.18) (Miller, 2005).

4.6 Protein-Analysen

4.6.1 Protein-Isolierung

Protein-Extraktion aus Zellen (RIPA-Methode)

- Zellen abtrypsinieren und in PBS aufnehmen.
- Zellen für 5 min bei 4°C und 1200 rpm abzentrifugieren.
- Zellen erneut mit PBS waschen und zentrifugieren.

- Zellen in 0,5 ml Reaktionsgefäß mit 50 µl Lyse-Puffer pro 5×10^6 Zellen (50 µl RIPA-Puffer + 0,5 µl PMSF) geben, während einer 30-minütigen Inkubation mehrmals invertieren.
- 10 min bei 13000rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Proteinkonzentration bestimmen (siehe 4.6.3) und bei -80°C lagern.

Protein-Extraktion aus Zellkultur-Überständen

- TCA-Fällung der Zellkulturüberstände (siehe 4.6.2).
- Pellet wurde in 3 x SDS-Ladepuffer aufgenommen.

Protein-Extraktion aus Blutplasma

- Vollblut ohne Gerinnungsmittel wurde sofort nach Entnahme 15 min bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert.
- Den Überstand (Plasma) abnehmen und mit Protease Inhibitor-Tablette (Roche) nach Angaben des Herstellers versetzen.
- Entfernung von Albumin mit Hilfe von HiTrap Blue HP-Säulen der Firma Amersham Biosciences nach Angaben des Herstellers, wobei das Plasma aber nicht mit dem Bindungspuffer verdünnt wurde.
- Nach Elution mit 5 ml Elutionspuffer erfolgte eine TCA-Fällung (siehe 4.6.2), nach der das Pellet sofort in 3 x SDS-Ladepuffer aufgenommen wurde.

4.6.2 Aufkonzentrierung von Proteinen durch TCA-Fällung

- 1/4 Volumen TCA + DOC wird zum Protein gegeben und gevortext.
- Inkubation auf Eis für 30 min.
- 15 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen und verwerfen.
- Zugabe von 3 Volumen Aceton.
- Lösen des Pellets, 10 min bei RT stehen lassen.
- 15 min bei 13000 rpm abzentrifugieren.
- Überstand abnehmen und verwerfen.
- Pellet 10 min auf Eis mit offener Kappe stellen.
- Pellet entweder in RIPA-Puffer oder in 3 x SDS-Ladepuffer aufnehmen.

4.6.3 Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay nach Angaben des Herstellers. Zugrunde liegt diesem Assay die Tatsache, dass sich das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blue G-250 nach Bindung von Proteinen von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Je nach Proteinkonzentration verändert sich die Farbe.

- Erstellung einer Verdünnungsreihe mit einem Standard (1, 2, 5, 10, 20 µg/ml).
- Vermischen von 0,8 ml Standard oder Proteinprobe im Reaktionsgefäß mit 0,2 ml Dye Reagent Concentrate.
- Vortexen, 5 min bei RT inkubieren.
- Messung der optischen Dichte der Standards bei 595 nm in Photometer.
- Zuerst wird eine BSA-Eichkurve (OD₅₉₅-Messung) angefertigt, aus deren Steigung dann mit den OD₅₉₅-Werten der Proteinextrakte die Proteinkonzentration (X) nach folgender Formel errechnet werden kann:

$$y = a \times X + b$$

$$y = \text{OD}_{595}$$

$$a = \text{Steigung}$$

$$b = \text{Schnittpunkt mit y-Achse}$$

4.6.4 Western-Blot-Analysen

Beim Western-Blot werden Proteine, die zuvor in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, auf eine PVDF-Membran transferiert und immunologisch mit Antikörpern nachgewiesen. Die Normalisierung erfolgte mittels des immunologischen Nachweises des α -Tubulin-Proteins.

SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine Form der PAA-Gelelektrophorese (siehe 4.3.5). Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart des Detergenz SDS und eines reduzierenden Stoffes (z.B. DTT oder hier beta-Mercaptoethanol) in einem diskontinuierlichen Gelsystem elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Das negativ geladene SDS steht in hydrophober Wechselwirkung mit den Polypeptidketten (Micellenbildung), die dadurch eine etwa gleichmäßige negative Ladung erhalten, so dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld nur noch von ihrem Molekulargewicht abhängt.

Herstellung eines diskontinuierlichen PAA-Gels:

- Trenngel 10%:

13,3 ml	PAA-Lösung 30 % (30:0,8)
5 ml	Trenngel-Puffer
0,4 ml	10 % SDS
0,32 ml	10 % APS
20,9 ml	ddH ₂ O
steril filtrieren, entgasen	
32 μ l	TEMED
- Gel gießen, mit Isopropanol überschichten und auspolymerisieren lassen. Isopropanol abgießen, vollständig absaugen und das Sammelgel über das Trenngel gießen.
- Sammelgel:

3,3 ml	PAA-Lösung 30 % (30:0,8)
5 ml	Sammelgel-Puffer
0,2 ml	10 % SDS
0,1 ml	10 % APS
11,4 ml	ddH ₂ O
20 μ l	TEMED

Probenvorbereitung:

- 100-400 μ g Protein werden mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,5 auf das gleiche Volumen gebracht und mit 1/3 Volumen 3 x SDS Loading-Mix versetzt.
- Denaturierung für 30 min bei 60°C im Wasserbad, 5 min in Eiswasser stellen, 5 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand auf das Gel laden.
- Der Proteinstandard wird 5 min in einem kochenden Wasserbad denaturiert und dann sofort auf das Gel aufgetragen.

Gellauf:

- Einlauf ins Gel: 80 V, Lauf im Sammelgel: 100 V, Lauf im Trenngel: 150 V.

Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Transfer der Proteine erfolgt im sogenannten Nassblotverfahren in 1 x Transferlösung + 20 % Methanol über Nacht bei 4°C und 150 mA. Die PVDF-Membranen werden dafür zunächst kurz in 100 % Methanol eingeweicht, dann 2-3 min in 1 x Transferpuffer + 20 % Methanol äquilibriert. Auch das Trenngel wird vor dem Blot 15-20 min in 1 x Transferpuffer + 20 % Methanol eingelegt.

Antikörpermarkierung und Immunodetektion

- Membran 1 h bei RT in Blocklösung (5 % Magermilchpulver in PBS-T) schütteln, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.
- 3 x 10 min mit PBS-T waschen.
- Primärantikörper in Blocklösung (0,5 % Magermilchpulver in PBS-T) verdünnen und Membran 1 h darin schütteln:

Antikörper	Verdünnung
WTC19	1:1000
α -Tubulin	1:2000
IGFBP3	1:250

- 4 x 15 min in PBS-T waschen.
- Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt) in Blocklösung (5 % Magermilchpulver in PBS-T) verdünnen und Membran 1 h darin inkubieren.

Anti-mouse Ig (monoclonal), Peroxidase linked 1:7500 verdünnt
 Anti-rabbit Ig (polyclonal), Peroxidase linked 1:7500 verdünnt

- 3 x 15 min in PBS-T waschen.
- Detektion mit dem ECL Western blotting detection Kit (Amersham) oder dem SuperSignal West Femto Kit (Pierce) nach Angaben des Herstellers.
- Entwicklung erfolgt auf einem X-OMAT Röntgenfilm (Kodak).

Antikörper-Entfernung (Strippen von PVDF-Membranen)

Zur Wiederverwertung der Membran mit einem anderen Antikörper müssen die alten Antikörper entfernt werden:

- Membran in 100 % Methanol anfeuchten.
- Membran für 5 min in H₂O schütteln.
- 5 min in 0,2 M NaOH schütteln.
- Membran für 5 min in H₂O schütteln.
- Membran trocknet leicht aus und kann durch Einweichen in 100 % MeOH immer wieder angefeuchtet werden.

4.6.5 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Ziel immunhistochemischer (IHC) und immunfluorimetrischer (IF) Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische primäre und sekundäre Antikörper, die durch Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme markiert sind.

Zellkulturen

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

- Zellen in PBS waschen und Objektträger trocknen lassen.
- Objektträger bei -80°C lagern.

Anfertigung von Gefrierschnitten

- 7 μ m dicke Schnitte werden mit dem CM1900 Kryostat der Firma Leica angefertigt und für die normale Immunhistochemie für mindestens 2 h bei RT luftgetrocknet.
- Lagern der Schnitte entweder bei -80°C oder direkte Weiterverarbeitung.

Anfertigung von Paraffinschnitten

- Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die Paraffinblöcke vor dem Schneiden mindestens 1 h bei -20°C gelagert.
- 5 μ m dicke Schnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom der Firma Leica angefertigt.
- Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.
- Vor der Weiterverarbeitung der Paraffinschnitte wurde eine Entwässerung wie folgt durchgeführt:
- Schnitte 30 min bei 55°C in Luftinkubator erwärmen.
- Zweimal in Xylol geben: 30 min und 10 min.
- EtOH-Reihe: je 5 min 100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %.

- Anschließend in PBS stellen.
- Blocken der endogenen Peroxidase: 20 min bei RT mit 3 % H₂O₂

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

- Behandlung in der Mikrowelle mit Citratpuffer
 - 10 mM Na-Citrat (pH 6.0) in der Mikrowelle erhitzen.
 - Schnitte 10 oder 20 min in der Mikrowelle in Citratpuffer bei 600 W kochen.
 - 20 min bei RT abkühlen, dann in PBS waschen.
- Behandlung mit Target Retrieval Solution (high pH) (DAKO)
 - Target Retrieval Solution (TRS) im Wasserbad bei > 95°C erwärmen.
 - Schnitte 5 min in TRS kochen.
 - 20 min bei RT abkühlen, dann in TBS waschen.
- Behandlung mit Target Retrieval Solution (pH 9,0) (DAKO)
 - Target Retrieval Solution (TRS) in der Mikrowelle erhitzen.
 - Schnitte 5 min in der Mikrowelle in TRS kochen.
 - 20 min bei RT abkühlen, dann in PBS waschen.
- Behandlung mit Protease bei Raumtemperatur oder 38°C (Sigma P6911)
 - 50 mg Protease in 50 ml TBS bei 38°C im Wasserbad vorwärmen.
 - Schnitte 10 min bei 38°C mit Protease behandeln.
 - Blocken der Protease durch Überführen der Schnitte in H₂O.
 - Spülen in TBS.
- Kombination aus Protease und Target Retrieval Solution (high pH)
 - 50 mg Protease in 50 ml TBS bei 38°C im Wasserbad vorwärmen.
 - Schnitte 10 min bei 38°C mit Protease behandeln.
 - Blocken der Protease durch Überführen der Schnitte in H₂O.
 - Überführen der Schnitte in die im Wasserbad auf >95°C vorgewärmte TRS für 5 min
 - Spülen in H₂O und dann in TBS.

Immunhistochemie (DAKO)

Verwendet wurde entweder der „Labelled StreptAvidin Biotin-Kit“ (LSAB-Kit) der Firma DAKO oder der EnVision-Kit (DAKO). Vorteil der LSAB-Methode gegenüber anderen Methoden (z.B. ABC-Methode) ist eine gesteigerte Sensitivität durch die verstärkende Wirkung eines biotinylierten Brückenantikörpers an den Primärantikörper. Diesem Schritt folgt eine Inkubation mit einem StreptAvidin-Peroxidase-Konjugat, das durch die Reaktion mit einem Substratchromogen (hier DAB 3', 3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) angefärbt wird. Als Gegenfärbung zur besseren Kenntlichmachung der antikörpergefärbten Bereiche wird eine Hämatoxylin Gegenfärbung eingesetzt. Die verschiedenen Primärantikörper und ihre Bedingungen finden sich in Tabelle 4.4.

Antikörper	Fixierung	Verdünnung		Methode/ Waschpuffer	Antigendemaskierung
	Kryo	Kryo	Paraffin		Paraffin
Collagen IV α 1/2	M	1:25	---	LSAB, PBS	---
Collagen IV α 4	M	1:100	---	LSAB, PBS	---
Gremlin	---	---	1:100	EnVision, TBST	20 min Citratpuffer pH 6,0
ICAM1	---	---	1:100	LSAB ; PBS	5 min TRS (pH 9,0)
Laminin β 1	---	1:500	---	LSAB, PBS	---
Laminin β 2	M	1:5	---	LSAB, PBS	---
MMP7	---	---	1:50	LSAB, PBS	10 min Protease bei RT
SOX9	---	---	1:200	EnVision, TBST	10 min Protease, 5min TRS high pH
VCAM1	---	---	1:25	LSAB, PBS	5 min TRS (pH 9,0)
WT1	---	---	1:25	LSAB, TBST	10 min Protease
WTC19	A/M	1:100	1:150	LSAB, PBS	10 min Protease

Tabelle 4.4: Antikörperbedingungen für die Immunhistochemie. M: Methanol. A/M: Aceton/Methanol (1:1).

- Für die Kryoschnitte wurde der LSAB Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt.
- Kryoschnitte wurden 10 min fixiert (Methanol oder Aceton/Methanol 1:1 bei -20°C , siehe Tabelle 4.4).
- Fixiermedium abdampfen lassen und Schnitt in PBS äquilibrieren und mit der Antikörperfärbung beginnen.
- Bei den Paraffinschnitten wurde das Protokoll folgendermaßen abgewandelt:
- Je 10 min Avidin- und Biotin-Block (DAKO).
- 30 min Proteinblock (DAKO).
- 2 h Primärantikörper bei RT.
- Je 30 min Biotinylated LINK und Streptavidin-HRP (LSAB).
- 10 min Substratchromogen (hier DAB 3', 3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, DAKO).
- Abstoppen der Reaktion mit Wasser.
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Waschschriffe mit PBS oder TBST (vergleiche Tabelle 4.4).

Die bei zwei Antikörpern verwendete Envision Technologie bindet eine große Anzahl von Molekülen an ein Dextranrückgrat und ermöglicht somit die Verkürzung der Zeit für die Immunhistochemie und die Verstärkung des IHC-Ergebnisses. Die Durchführung erfolgte wie mit dem LSAB-Kit, wobei der Primärantikörper nur eine Stunde bei RT inkubiert wurde und der EnVision Kit für 30 min.

Immunfluoreszenz-Methode

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wird die Expression verschiedener Proteine in Zellen mit Hilfe von Primär- und Sekundärantikörpern nachgewiesen. Der Primärantikörper ist spezifisch für ein bestimmtes Antigen, der Sekundärantikörper bindet an den konstanten Teil des Primärantikörpers und ist dabei spezifisch für die Tierart, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde.

Protokoll:

- Waschen der Zellen in PBS.
- Fixierung der Zellen (siehe Tabelle 4.5).

Antikörper	Fixierung	Blockierung	Verdünnung
CD2AP	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:100
Cytokeratin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:500
IGFBP3	Aceton -20°C , 10min	2% FCS; 0,2% Fischgelatine; 2% BSA in PBS	1:25
Nephrin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:50
Podocin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:750
smAktin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:500
Talin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:20
Vimentin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:20
Vinculin	Methanol -20°C , 10min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:200
WTC19	2% Paraformaldehyd; 4% Saccharose in PBS, 15min	4% FCS; 0,1% Tween20 in PBS	1:50

Tabelle 4.5: Antikörperbedingungen für die Immunfluoreszenz.

- Waschen in PBS.
- Permeabilisierung mit Triton X100 (0,3 %) in PBS für 10 min (nur für WTC19).
- Waschen in PBS.
- 30 min Blockierung (siehe Tabelle 4.5).
- Waschen in PBS.
- 1 h Inkubation des Primärantikörpers (siehe Tabelle 4.5).
- Dreimaliges Waschen in PBS.
- 1 h Inkubation des Sekundärantikörpers im Dunkeln:

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

- Dreimaliges Waschen in PBS.
- Einbetten in Fluoreszenz-Einbettmedium mit DAPI (1 µg/ml), Lagerung bei 4°C (dunkel).

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchung der glomerulären Differenzierung beim Denys-Drash Syndrom

Zur Frage, wie *WT1*-Missense-Mutationen zu Glomerulosklerose führen, wurde die glomeruläre Reifung bei Denys-Drash-Patienten mit Real-time RT-PCR, semiquantitativer RT-PCR und Immunhistochemie in den zwei Komponenten Podozyten und GBM untersucht.

Als Ausgangsmaterial stand Paraffin- und Gefriermaterial von fötalen- (16. und 24. SSW), kindlichen- und adulten Nieren sowie DDS-Nieren zur Verfügung. Die kindlichen und adulten Kontrollnieren stammten von makroskopisch normal erscheinenden Tumor-Nephrektomien. Das Vorhandensein eines Denys-Drash Syndroms wurde von Nephropathologen diagnostiziert und durch die Anwesenheit einer *WT1*-Missense-Mutation bestätigt (Schumacher et al., 1998 und im Rahmen der molekularen Diagnostik des Institutes). Dabei handelte es sich um Missense-Mutationen in Exon 8 oder 9 von *WT1* (siehe Patienten 3).

5.1.1 Bestimmung des Differenzierungsgrades von Podozyten

A) Bestimmung der podozytären *WT1*-Expression

Zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von Podozyten wurden die *WT1* mRNA-Isoformen mit Hilfe der quantitativen Real-time RT-PCR in verschiedenen Geweben untersucht.

Um die vier verschiedenen *WT1*-Isoformen miteinander vergleichen zu können, wurden zuerst die PCR-Bedingungen so optimiert, dass jede PCR mit der gleichen Effizienz abläuft (siehe Methoden 4.4.5). Dazu wurde eine serielle Verdünnungsreihe der Test-cDNA hergestellt. Nach der Real-time RT-PCR, die in Triplikaten erfolgte, wurde der Logarithmus der eingesetzten cDNA-Menge gegen den gemittelten C_T -Wert aufgetragen. Um ein optimales Ergebnis zu erhalten, wurden verschiedene Primerkonzentrationen ausgetestet. Im Methodenteil unter 4.4.5 sind die endgültigen Reaktionsansätze sowie das PCR-Programm für die vier *WT1*-Isoformen zu finden. Die Steigungen der vier Geraden sollten nicht mehr als 0,1 voneinander abweichen. Wie in Abbildung 5.1 zu erkennen ist, variieren die Steigungen hier um maximal 0,06 mit einem $R^2 > 0,99$.

Bestimmung der relativen Menge der *WT1* mRNA-Isoformen

Zur Bestimmung der Menge der vier *WT1* mRNA-Isoformen in unterschiedlichen Geweben wurden die Glomeruli aus Kryogewebe von vier DDS-Patienten (milde bis moderat betroffene

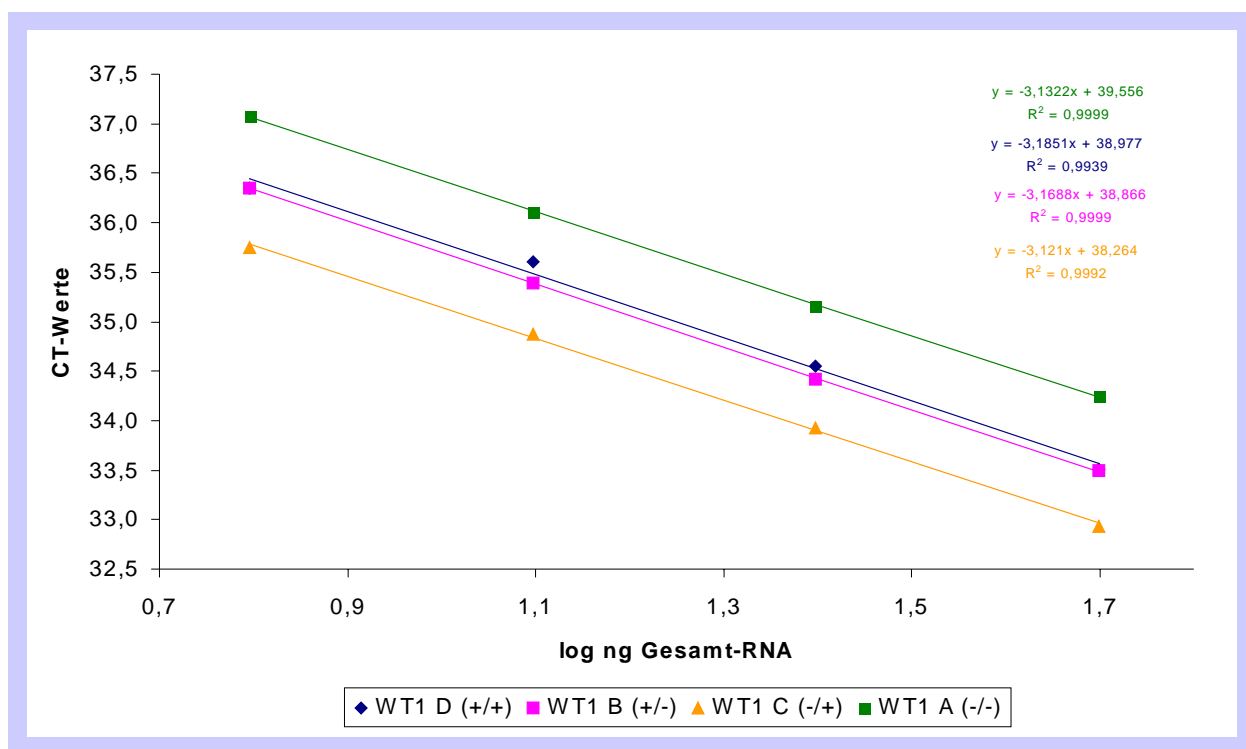


Abbildung 5.1: Effizienz der vier *WT1*-Isoformen. Die Steigungen sollten nicht mehr als um 0,1 voneinander abweichen. CT = „threshold cycle“.

Glomeruli), von drei Erwachsenen, einem Kind und die „capillary-loop“ Stadien (= unreifes Glomeruli-Stadium) zweier fötaler Nieren (16. und 24. SSW) mikrodisektiert. Dabei wurden insgesamt zwischen 60 und 720 Glomeruli je nach Gewebe mikrodisektiert, RNA isoliert und eine Real-time RT-PCR Reaktion in Quadruplikaten durchgeführt (siehe Methoden 4.4). Da nicht alle mikrodisektierten Zellen *WT1* exprimieren, sondern nur die Podozyten, konnte die relative Menge einer Isoform in den verschiedenen Geweben nur unter Zuhilfenahme folgender Formel, die die unterschiedliche Anzahl an *WT1*-exprimierenden Zellen (Podozyten) pro mikrodisektierter Fläche des Glomerulus in Betracht zieht, bestimmt werden:

$$\frac{E_{P_1}}{E_{P_2}} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{p_2}{p_1} \times \frac{2^{\Delta C_{T_2}}}{2^{\Delta C_{T_1}}}$$

E_p = Expression von Podozyten in einem betrachteten Gewebe

n = Durchschnittliche Anzahl von Zellen pro mikrodisektiertem Glomerulus

p = Durchschnittliche Anzahl von Podozyten pro mikrodisektiertem Glomerulus

ΔC_T = (C_T von *WT1*) - (C_T von *18S rRNA*)

Zusätzlich wurde nach einer *WT1*-Immunhistochemie (siehe Methoden 4.6.5) die Anzahl an *WT1*-positiven Zellen und Gesamtzellen pro Glomerulus bestimmt. Zwischen 4 und 20

Glomeruli wurden ausgezählt und der Mittelwert an WT1-positiven Zellen bestimmt (siehe Tabelle 5.1). Die Zellzahl zwischen verschiedenen Glomeruli eines Gewebes variierte, aber das Verhältnis WT1-positiver Zellen zu den Gesamtzellen blieb nahezu konstant. In den fötalen Nieren wurden die Zellen des „capillary-loop“ Stadiums gezählt.

Gewebe	Gruppe	Gezählte Glomeruli	WT1 pos. Zellen (Mittelwert)	Gesamtzellen (Mittelwert)	WT1 pos. Zellen/ Gesamtzellen (Mittelwert)
NEK1	fötal (24. SSW) c	8	41.3 (+/-8,5)	60.9 (+/-13,2)	0.68 (+/-0,04)
NEK2	fötal (16. SSW) c	9	49.3 (+/-13,7)	73.0 (+/-15,5)	0.68 (+/-0,10)
NEK6	fötal (27. SSW) s	20	26.85 (+/-7,0)	71.4 (+/-20,9)	0.4 (+/-0,09)
NAK8	Kind	10	20.8 (+/-3,9)	41.3 (+/-7,6)	0.50 (+/-0,01)
NAK4	Erwachsener	8	15.5 (+/-3,4)	47.9 (+/-10,1)	0.32 (+/-0,01)
NAK5	Erwachsener	10	28.0 (+/-6,9)	86.7 (+/-21,0)	0.32 (+/-0,00)
NS8	DDS	6	22.0 (+/-7,7)	68.2 (+/-24,0)	0.32 (+/-0,02)
NS10	DDS	4	6.8 (+/-3,1)	20.8 (+/-9,0)	0.33 (+/-0,01)
NS18	DDS	10	11.2 (+/-4,3)	25.3 (+/-9,7)	0.44 (+/-0,01)

Tabelle 5.1: Bestimmung der WT1-positiven Zellen und Gesamtzellzahl/mikrodissektierter Fläche. c = „capillary-loop“ Stadium. s = „s-shape“ Stadium. SSW = Schwangerschaftswoche.

Tabelle 5.2 zeigt die Berechnung der relativen *WT1*-mRNA-Menge in den Podozyten der mikrodissektierten Glomeruli. Eine genaue Beschreibung der Berechnung ist im Methodenteil 4.4.5 zu finden. Abbildung 5.2 zeigt die Expressionslevel aller vier *WT1*-Isoformen in den Podozyten von acht Geweben. Wie man erkennen kann, ist die Expression in den „capillary-loop“ Glomeruli der Niere der 16. SSW am geringsten. Die Expression in den anderen Geweben wurde relativ zur Expression in der Niere der 16. SSW bestimmt.

Bei Betrachtung der relativen mRNA-Expression in den Geweben stellt man fest, dass während der Entwicklung die Menge aller vier Isoformen ansteigt. Sie ist in den Glomeruli des Kindes am höchsten und nimmt in denen der Erwachsenen wieder ab. Die Expression der Isoformen A (-/-), B (+/-) und D (+/+) steigt zwischen der 16. und 24. SSW deutlich an, im Kind nur noch schwach und fällt wieder bei den Erwachsenen. Dagegen steigt die Menge an Isoform C (-/+) um das 5-fache zwischen der 16. und 24. SSW an und um ein weiteres 3-faches in den Glomeruli des Kindes. Bei den DDS-Glomeruli sind die Expressionslevel aller vier Isoformen im Vergleich zu den kindlichen Glomeruli geringer und liegen zwischen der Expression der 16. und der 24. SSW. Besonders dramatisch ist der Verlust der Isoform C (-/+), die über 6-fach geringer als in den Glomeruli des Kindes und 4-fach geringer als in den Glomeruli der Erwachsenen exprimiert wird. Zu beachten ist, dass die relativen Expressionslevel nur innerhalb einer Isoform und nicht zwischen den verschiedenen Isoformen verglichen werden können.

	Gewebe	C_T Mittelwert (+/-SDTF)	ΔC_T ($C_{T \text{ Isoform}} - C_{T \text{ 18SrRNA}}$)	$\frac{E_{P_1}}{E_{P_2}} = \frac{n_1}{n_2} \times \frac{p_2}{p_1} \times \frac{2^{\Delta C_{T_2}}}{2^{\Delta C_{T_1}}}$
18S rRNA	Fötal 16SSW	16,30 (+/-0,09)		
	Fötal 24SSW	13,29 (+/-0,03)		
	NAK8	16,54 (+/-0,07)		
	NAK4	18,26 (+/-0,11)		
	NAK5	19,08 (+/-0,10)		
	NS8	17,67 (+/-0,03)		
	NS18	18,03 (+/-0,12)		
	NS19	13,38 (+/-0,02)		
	WT1 A (-/-)	Fötal 16SSW	32,49 (+/-0,24)	16,19
Fötal 24SSW		26,95 (+/-0,08)	13,66	5,5
NAK8		30,25 (+/-0,10)	13,71	7,3
NAK4		33,71 (+/-0,19)	15,45	3,5
NAK5		34,18 (+/-0,24)	15,10	4,5
NS8		33,52 (+/-0,52)	15,85	2,7
NS18		32,75 (+/-0,20)	14,72	4,2
NS19		30,88 (+/-0,15)	17,50	3,8
WT1 B (+/-)		Fötal 16SSW	33,78 (+/-0,27)	17,48
	Fötal 24SSW	27,06 (+/-0,05)	13,77	13,1
	NAK8	30,68 (+/-0,27)	14,14	13,2
	NAK4	34,70 (+/-0,25)	16,44	4,9
	NAK5	34,36 (+/-0,09)	15,28	9,7
	NS8	33,63 (+/-0,40)	15,96	6,0
	NS18	33,64 (+/-0,09)	15,61	5,6
	NS19	33,62 (+/-0,43)	20,24	7,8
	WT1 C (-/+)	Fötal 16SSW	32,09 (+/-0,03)	15,79
Fötal 24SSW		26,73 (+/-0,17)	13,44	5,1
NAK8		28,84 (+/-0,15)	12,30	14,6
NAK4		31,49 (+/-0,25)	13,23	12,4
NAK5		33,41 (+/-0,27)	14,33	6,8
NS8		33,55 (+/-0,45)	15,88	2,0
NS18		33,07 (+/-0,10)	15,04	2,5
NS19		31,75 (+/-0,37)	18,37	2,5
WT1 D (+/+)		Fötal 16SSW	30,52 (+/-0,19)	14,22
	Fötal 24SSW	26,14 (+/-0,07)	12,85	2,5
	NAK8	29,63 (+/-0,07)	13,09	2,9
	NAK4	32,77 (+/-0,30)	14,51	1,7
	NAK5	34,08 (+/-0,06)	15,00	1,2
	NS8	32,99 (+/-0,22)	15,32	1,0
	NS18	32,38 (+/-0,09)	14,35	1,4
	NS19	30,57 (+/-0,10)	17,19	2,4

Tabelle 5.2: Berechnung der relativen *WT1* mRNA-Menge in den Podozyten der mikrodisssektierten Glomeruli. C_T = „threshold cycle“. SDTF = Standardfehler. Fötal 16SSW = fötale Niere der 16. SSW. Fötal 24SSW = fötale Niere der 24. SSW. NAK8 = kindliche Kontrollniere. NAK4+5 = adulte Kontrollnieren. NS8+18+19 = DDS-Nieren. Beschreibung der angewendeten Formel im Text.

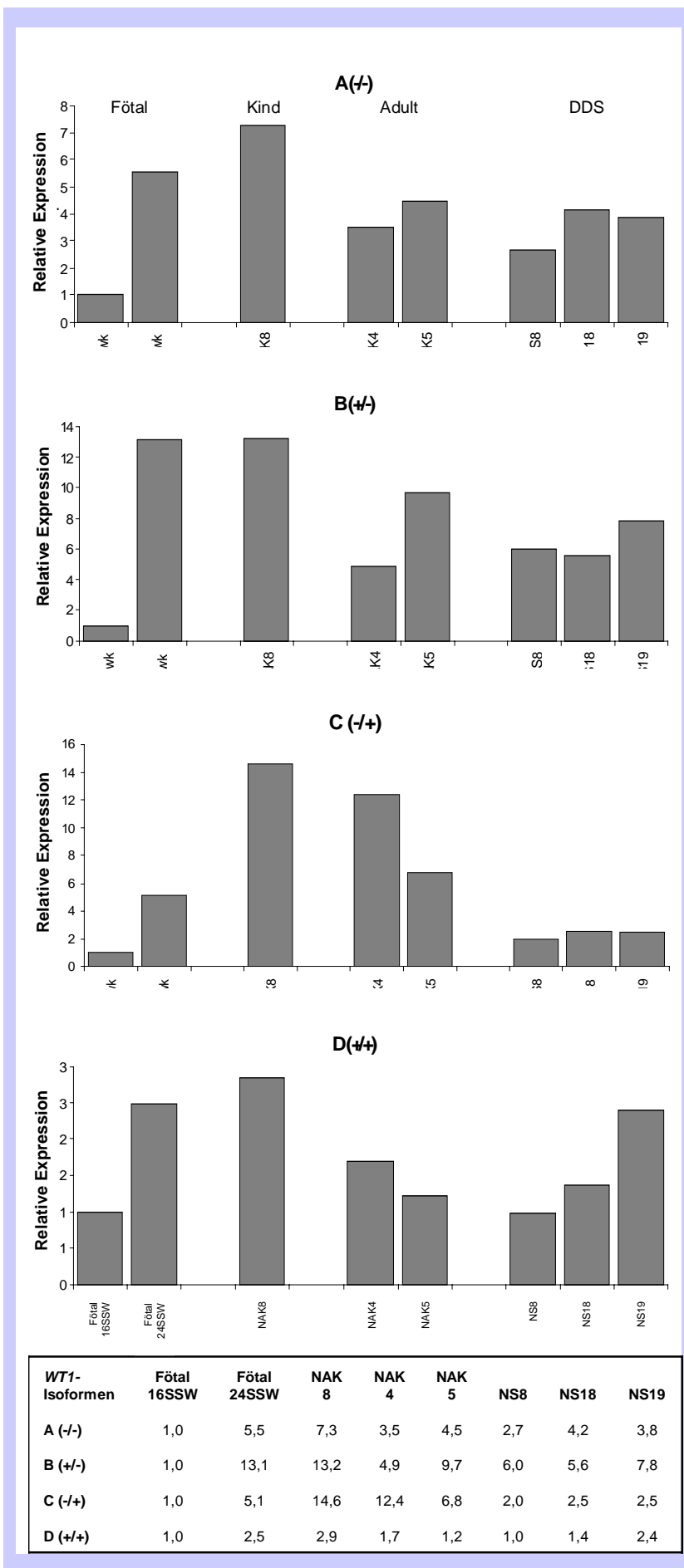


Abbildung 5.2: Vergleich der relativen mRNA-Menge jeder WT1-Isoform zwischen verschiedenen Geweben. Die Expression ist für jedes Gewebe angegeben. Die relativen Expressionslevel können nur innerhalb einer Isoform und nicht zwischen den Isoformen verglichen werden. Fötal 16SSW = fötale Niere der 16. SSW. Fötal 24SSW = fötale Niere der 24. SSW. NAK8 = kindliche Kontrollniere. NAK4+5 = adulte Kontrollieren. NS8+18+10 = DDS-Nieren.

Verhältnis der *WT1* mRNA-Isoformen

Um das Reifungsstadium der Podozyten in den DDS-Patienten zu bestimmen, wurde mit den Real-time RT-PCR-Daten das Verhältnis der vier *WT1* mRNA-Isoformen berechnet. Die Tabelle 5.3 zeigt die zugrundeliegenden Berechnungen. Eine genaue Beschreibung befindet sich im Methodenteil 4.4.5.

Abbildung 5.3 zeigt in den mikrodisssektierten Proben die entwicklungsbedingten Expressionsänderungen in den Kontrollen, die hauptsächlich die relative Menge der Isoform C (-/+) und D (+/) betreffen. Das Verhältnis C/D steigt von 0,3 in der 16. SSW und 0,7 in der 24. SSW auf 1,7 in den Glomeruli des Kindes und 2,0 (1,6-2,4) in denen der Erwachsenen. Die Glomeruli der DDS-Patienten zeigen ein Verhältnis von 0,5 (0,3-0,7), was den fötalen „capillary-loop“ Stadien entspricht. Betrachtet man das Verhältnis der +/- Exon 5-Isoformen, kann man eine Abnahme während der Entwicklung beobachten: fötal (16. SSW) 1,9; fötal (24. SSW) 1,2; Kind 0,6; Erwachsene 0,6 (0,4-0,7). Die DDS-Glomeruli zeigen ein ähnliches Verhältnis von 1,2 (0,9-1,8) wie die „capillary-loop“ Stadien der fötalen Niere der 24. SSW. Die entwicklungsbedingten Veränderungen des +/- KTS Verhältnisses sind folgende:

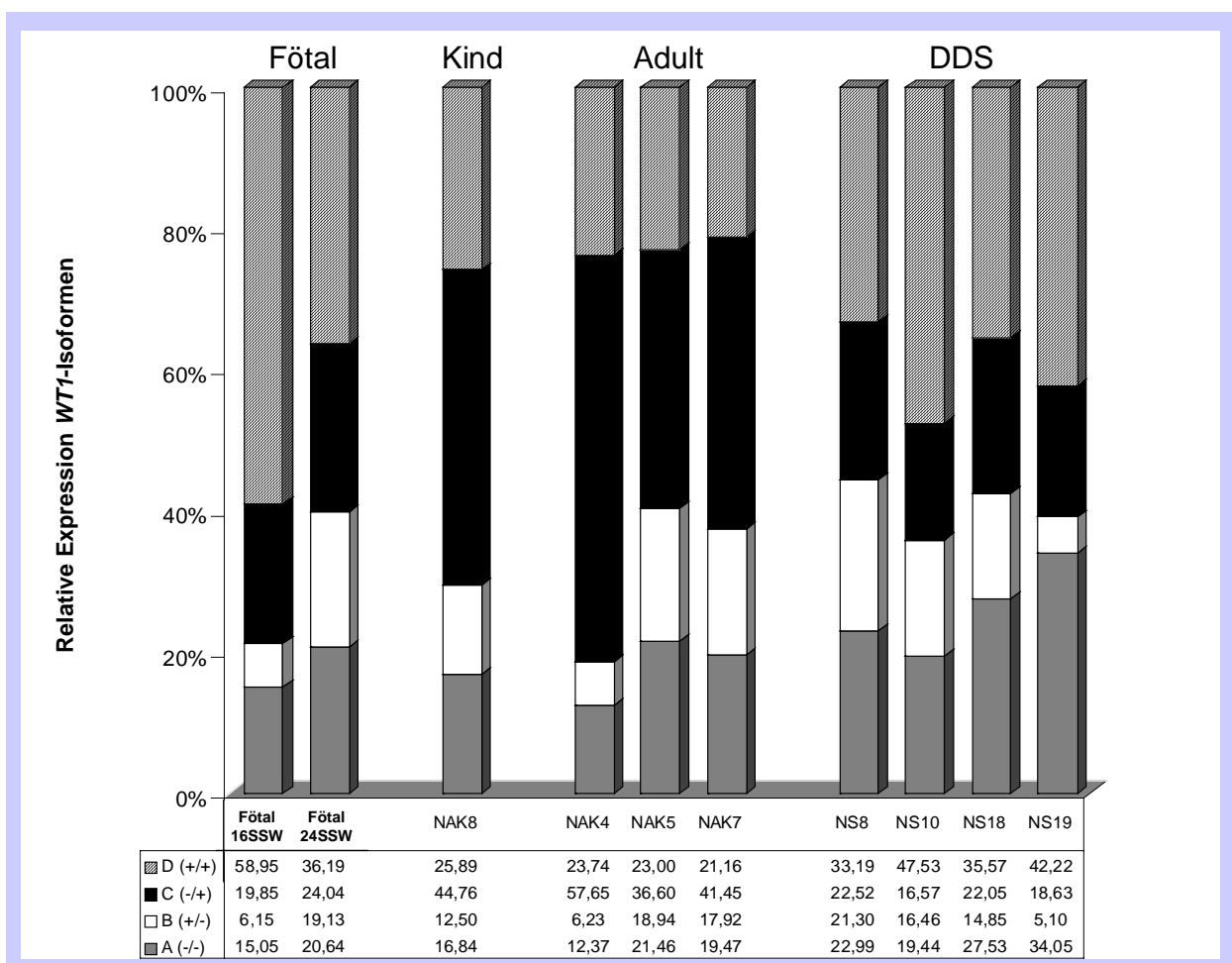


Abbildung 5.3: Verhältnis der vier *WT1*-Isoformen innerhalb eines Gewebes. Fötal 16SSW = fötale Niere der 16. SSW. Fötal 24SSW = fötale Niere der 24. SSW. NAK8 = kindliche Kontrollniere. NAK4+5+7 = adulte Kontrollnieren. NS8+10+18+19 = DDS-Nieren.

	Gewebe	C _T Mittelwert (+/-SDTF)	ΔC _T (C _T Isoform-C _T 18SrRNA)	2 ^{-ΔC_T}	% Expression (bezogen auf 100%)
18S rRNA	Fötal 16SSW	16,30 (+/-0,09)			
	Fötal 24SSW	13,29 (+/-0,03)			
	NAK8	16,54 (+/-0,07)			
	NAK4	18,26 (+/-0,11)			
	NAK5	19,08 (+/-0,10)			
	NAK7	13,40 (+/-0,01)			
	NS8	17,67 (+/-0,03)			
	NS10	16,86 (+/-0,19)			
	NS18	18,03 (+/-0,12)			
	NS19	13,38 (+/-0,02)			
WT1 A (-/-)	Fötal 16SSW	32,49 (+/-0,24)	16,19	1,34E-05	15,05
	Fötal 24SSW	26,95 (+/-0,08)	13,66	7,73E-05	20,64
	NAK8	30,25 (+/-0,10)	13,71	7,46E-05	16,84
	NAK4	33,71 (+/-0,19)	15,45	2,23E-05	12,37
	NAK5	34,18 (+/-0,24)	15,10	2,85E-05	21,46
	NAK7	35,30 (+/-0,25)	21,90	2,56E-07	19,47
	NS8	33,52 (+/-0,52)	15,85	1,69E-05	22,99
	NS10	32,18 (+/-0,18)	15,32	2,44E-05	19,44
	NS18	32,75 (+/-0,20)	14,72	3,71E-05	27,53
	NS19	30,88 (+/-0,15)	17,50	5,39E-06	34,05
WT1 B (+/-)	Fötal 16SSW	33,78 (+/-0,27)	17,48	5,47E-06	6,15
	Fötal 24SSW	27,06 (+/-0,05)	13,77	7,16E-05	19,13
	NAK8	30,68 (+/-0,27)	14,14	5,54E-05	12,50
	NAK4	34,70 (+/-0,25)	16,44	1,12E-05	6,23
	NAK5	34,36 (+/-0,09)	15,28	2,51E-05	18,94
	NAK7	35,42 (+/-0,31)	22,02	2,35E-07	17,92
	NS8	33,63 (+/-0,40)	15,96	1,57E-05	21,30
	NS10	32,42 (+/-0,11)	15,56	2,07E-05	16,46
	NS18	33,64 (+/-0,09)	15,61	2,00E-05	14,85
	NS19	33,62 (+/-0,43)	20,24	8,08E-07	5,10
WT1 C (-/+)	Fötal 16SSW	32,09 (+/-0,03)	15,79	1,76E-05	19,85
	Fötal 24SSW	26,73 (+/-0,17)	13,44	9,00E-05	24,04
	NAK8	28,84 (+/-0,15)	12,30	1,98E-04	44,76
	NAK4	31,49 (+/-0,25)	13,23	1,04E-04	57,65
	NAK5	33,41 (+/-0,27)	14,33	4,86E-05	36,60
	NAK7	34,21 (+/-0,15)	20,81	5,44E-07	41,45
	NS8	33,55 (+/-0,45)	15,88	1,66E-05	22,52
	NS10	32,41 (+/-0,32)	15,55	2,08E-05	16,57
	NS18	33,07 (+/-0,10)	15,04	2,97E-05	22,05
	NS19	31,75 (+/-0,37)	18,37	2,95E-06	18,63
WT1 D (+/+)	Fötal 16SSW	30,52 (+/-0,19)	14,22	5,24E-05	58,95
	Fötal 24SSW	26,14 (+/-0,07)	12,85	1,35E-04	36,19
	NAK8	29,63 (+/-0,07)	13,09	1,15E-04	25,89
	NAK4	32,77 (+/-0,30)	14,51	4,29E-05	23,74
	NAK5	34,08 (+/-0,06)	15,00	3,05E-05	23,00
	NAK7	35,18 (+/-0,22)	21,78	2,78E-07	21,16
	NS8	32,99 (+/-0,22)	15,32	2,44E-05	33,19
	NS10	30,89 (+/-0,06)	14,03	5,98E-05	47,53
	NS18	32,38 (+/-0,09)	14,35	4,79E-05	35,57
	NS19	30,57 (+/-0,10)	17,19	6,69E-06	42,22

Tabelle 5.3: Berechnung der Verhältnisse der *WT1*-Isoformen in den Podozyten der mikrodisssektierten Glomeruli. C_T = „threshold cycle“. SDTF = Standardfehler. Fötal 16SSW = fötale Niere der 16. SSW. Fötal 24SSW = fötale Niere der 24. SSW. NAK8 = kindliche Kontrollniere. NAK4+5+7 = adulte Kontrollnieren. NS8+10+18+19 = DDS-Nieren.

Die DDS-Glomeruli zeigen ein ähnliches Verhältnis von 1,3-1,8 wie die „capillary-loop“ Stadien der fötalen Niere der 24. SSW mit 1,5. Während der Entwicklung ist das Verhältnis der +/- KTS-Isoformen jedoch sehr heterogen: fötal (16. SSW) 3,7; fötal (24. SSW) 1,5; Kind 2,4; Erwachsene 2,5 (1,5-4,4).

Zusätzlich dazu sollte mit einer Immunhistochemie die rein podozytäre Expression von WT1 bestätigt werden. Die Färbungen und die Bilder wurden mit freundlicher Genehmigung von F. Eitner (Aachen) zur Verfügung gestellt (siehe Abbildung 5.6, Seite 65). Zu sehen ist die Beschränkung von WT1 auf die Podozytenvorläufer während der Nierenentwicklung und auf die Podozyten in kindlichen und adulten Glomeruli, was mit früheren Studien einhergeht (Armstrong et al., 1993; Mundlos et al., 1993). Eine WT1-Färbung ist in allen DDS-Glomeruli zu finden. Allerdings sieht man in fortgeschrittenen Stadien eine reduzierte Anzahl an WT1-positiven Kernen, was einen Verlust von Podozyten während der Progression der Krankheit vermuten lässt.

B) Bestimmung der podozytären *VEGF165*-Expression

VEGF165 repräsentiert die häufigste Isoform von *VEGFA* in differenzierten Podozyten und wird alternativ in die angiogenetisch stimulierende Form *VEGF165a* und die inhibitorische Form *VEGF165b* gespleißt.

Zur Bestimmung der relativen Menge von *VEGF165*-mRNA (ohne die Unterscheidung zwischen stimulatorischer und inhibitorischer Isoform) wurden die „s-shaped bodies“ und „capillary-loop“ Stadien einer fötalen Niere (16. SSW), die Glomeruli eines Kindes sowie die Glomeruli einer adulten und einer DDS-Niere (milde bis moderat betroffene Glomeruli) mikrodisektiert und anschließend RNA isoliert. Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese waren 100 ng Total-RNA. In die SYBRgreen Real-time RT-PCR wurden 10 ng für *VEGF165* und die *18S rRNA* zur Normalisierung eingesetzt (siehe Methoden 4.4.5).

Abbildung 5.4A zeigt die relative Menge von *VEGF165* nach Normalisierung mit der *18S rRNA* und nach Einberechnung der Anzahl der Podozyten (vergleiche Ergebnisse 5.1.1A). Die *VEGF165*-Expression steigt zwischen dem „s-shaped“ Stadium und dem „capillary-loop“ Stadium in der fötalen Niere um das 10-fache und fällt dann wieder in den reifen Glomeruli vom Kind bis zum Erwachsenen. Dagegen zeigen die Glomeruli des DDS-Patienten eine 9-14-fach höhere Expression als die Glomeruli der kindlichen- und erwachsenen Kontrolle.

Zusätzlich dazu wurde die Expression der angiogenetisch stimulatorischen *VEGF165a*- und inhibitorischen *VEGF165b*-Isoform in den Podozyten der mikrodisektierten Glomeruli bestimmt. Um mehr Proben untersuchen zu können, wurde auch noch Total-RNA aus Gesamtnierenmaterial von vier kindlichen-, drei adulten- und fünf DDS-Geweben isoliert.

Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese waren 100 ng Total-RNA (siehe Methoden 4.4.4). In die semiquantitative RT-PCR wurden 25 ng für die *VEGF*-Isoformen und 1/20 für *GAPDH* zur Normalisierung eingesetzt und so deren relative Expressionslevel bestimmt (siehe Abbildung 5.4, Methoden 4.4.5). Aliquots der PCR-Produkte wurden auf ein 2 %iges Agarosegel nach 30 und 40 Zyklen aufgetragen. Die gewählten Primer (aus Cui et al., 2003) ergaben zwei PCR-Produkte, deren größeres die angiogenetische stimulatorische Isoform *VEGF165a* repräsentiert und ein kleineres, welches die inhibitorische Isoform *VEGF165b* beinhaltet (siehe Abbildung 5.4C). Abbildung 5.4B zeigt das Verhältnis der angiogenetischen stimulatorischen *VEGF165a*- zu der inhibitorischen *VEGF165b*-Isoform. Während der glomerulären Reifung steigt die Expression der anti-angiogenetischen *VEGF165b*-Isoform ab dem „capillary-loop“

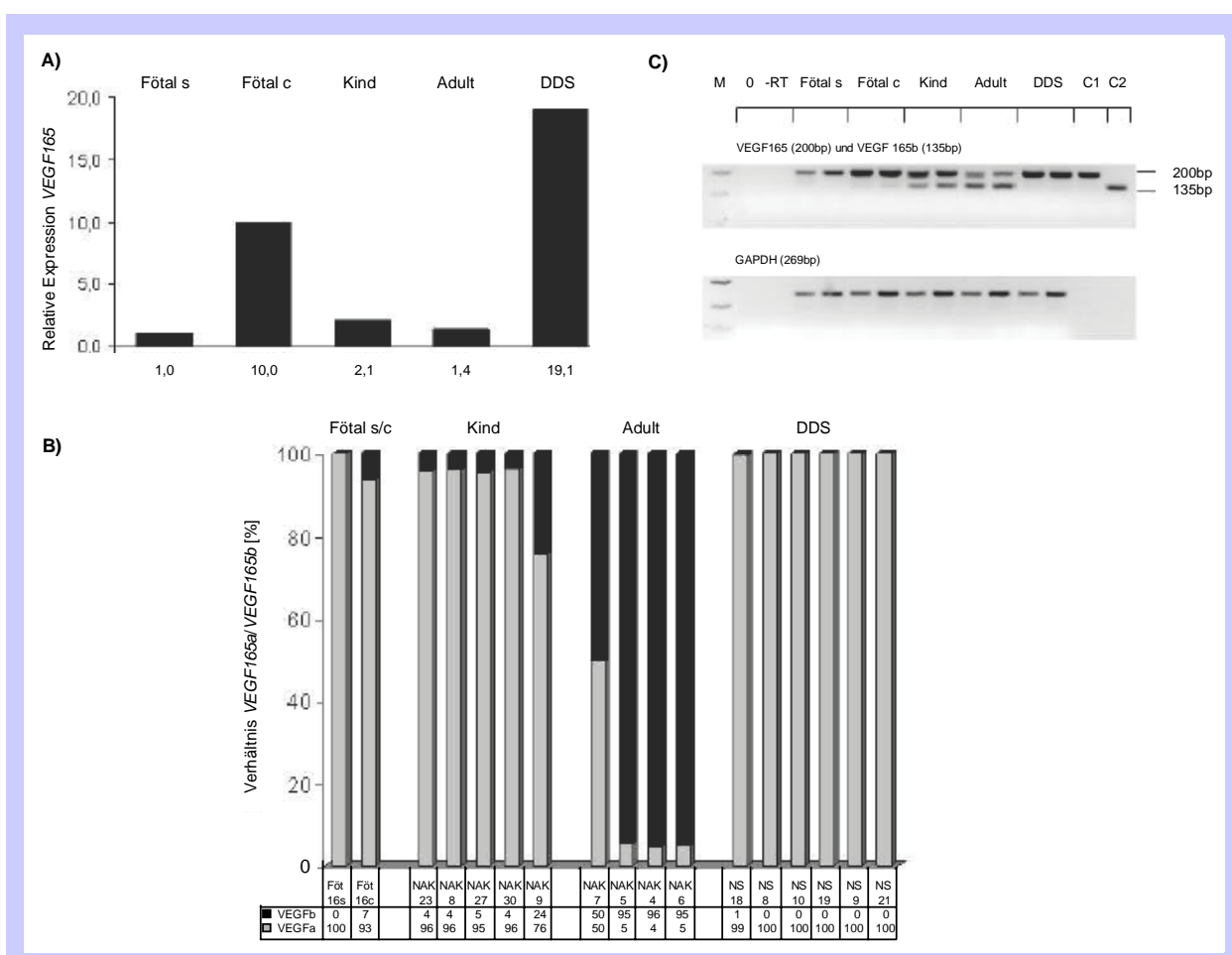


Abbildung 5.4: Relative Expression von totalem *VEGF165* und Verhältnis von *VEGF165a/VEGF165b*. Die Glomeruli wurden mikrodiseziert und die Expression über SYBRgreen Real-time RT-PCR sowie semiquantitative RT-PCR bestimmt. A) relative Expression von *VEGF165* normalisiert auf die *18S rRNA*. B) Verhältnis von *VEGF165a/VEGF165b*, bestimmt durch semiquantitative RT-PCR und Normalisierung auf *GAPDH* (Fötal 16s/c, NAK23, NAK9, NAK7, NS18 wurden mikrodiseziert, die anderen nicht). C) Gelbild mit den mikrodisezierten Proben: Aliquots der PCR-Produkte wurden nach 30 und 40 Zyklen auf ein Agarosegel aufgetragen. M = Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 0 = Negativkontrolle der PCR mit H₂O. -RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase; C1 = Positivkontrolle für *VEGF165a*. C2 = Positivkontrolle für *VEGF165b* (freundlicherweise von D. Bates, Universität Bristol, zur Verfügung gestellt). s = „s-shaped bodies“. c = „capillary-loop“ Stadien. Gelbilder invertiert.

Stadium bis zur adulten Niere stetig an, wohingegen die angiogenetische Form *VEGF165a* abnimmt. Die Glomeruli der DDS-Nieren zeigen ein ähnliches Expressionsprofil wie die „s-shaped bodies“ der fötalen Niere bezogen auf die *VEGF165a*- und *VEGF165b*-Expression.

5.1.2 Bestimmung des Differenzierungsgrades der glomerulären Basalmembran (GBM)

Zur Bestimmung der Expression unterschiedlicher Collagen- und Laminin-Ketten wurden die „s-shaped bodies“ und „capillary-loop“ Stadien einer fötalen Niere (16. SSW), die Glomeruli eines Kindes sowie die Glomeruli von adulten und DDS-Nieren (milde bis moderat betroffene Glomeruli) mikrodisssektiert und anschließend RNA isoliert. Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese waren 1,3 µg Total-RNA (siehe Methoden 4.4.4). Über semiquantitative RT-PCR und *GAPDH* zur Normalisierung wurden die relativen Expressionslevel von *Collagen IV alpha 1*, *-alpha 4* und *Laminin beta 1*, *-beta 2* bestimmt (siehe Abbildung 5.5, Methoden 4.4.5). Aliquots der PCR-Produkte wurden auf ein 2 %iges Agarosegel nach 30, 35 und 40 Zyklen aufgetragen. Eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase wurde immer mitgeführt. Dabei können die relativen Expressionslevel nur innerhalb eines Gens und nicht zwischen verschiedenen Genen verglichen werden, da aufgrund der unterschiedlich starken Expression für die verschiedenen Gene unterschiedliche cDNA-Mengen eingesetzt wurden, um PCR-Produkte aus der exponentiellen Phase der PCR zu erhalten.

Eine reziproke Expression kann für *Collagen IV alpha 1* und *-alpha 4* gesehen werden (siehe Abbildung 5.5). Während der glomerulären Reifung nimmt die *Collagen IV alpha 1*-Expression ab, während die *-alpha 4*-Expression zunimmt. Das Gleiche kann man auch für die *Laminin beta 1* und *-beta 2*-Ketten beobachten. Beide, *Collagen IV alpha 1*- und *Laminin beta 1*-Ketten, zeigen die höchste Expression in den „s-shaped bodies“. Die positive Expression, die man später sieht, reflektiert die Expression in der mesangialen Matrix. Im Gegensatz dazu findet man keine *Collagen IV alpha 4*- und *Laminin beta 2*-Ketten in den „s-shaped bodies“ der fötalen Niere; sie können erst ab dem „capillary-loop“ Stadium detektiert werden. Glomeruli einer DDS-Niere zeigen ein ähnliches Expressionsprofil wie die „s-shaped bodies“ der fötalen Niere. Die RT-PCR-Produkte wurden sequenziert, um die Spezifität der Primer für jede Isoform zu bestätigen (siehe Methoden 4.3.7).

Zusätzlich wurde die *Collagen IV alpha 4*- und *Laminin beta 2*-Expression immunhistochemisch untersucht (siehe Methoden 4.6.5). Dazu wurden insgesamt zwei fötale, zwei kindliche, 5 adulte und 6 DDS-Nieren untersucht. Abbildung 5.6 zeigt exemplarisch die Färbungen. Während der fötalen Entwicklung kann die glomeruläre Expression von *Collagen IV alpha 4* zuerst im Mesangium und der GBM des „capillary-loop“ Stadiums nachgewiesen werden. Die starke Expression dieser Collagen-Isoform findet man auch in den kindlichen und

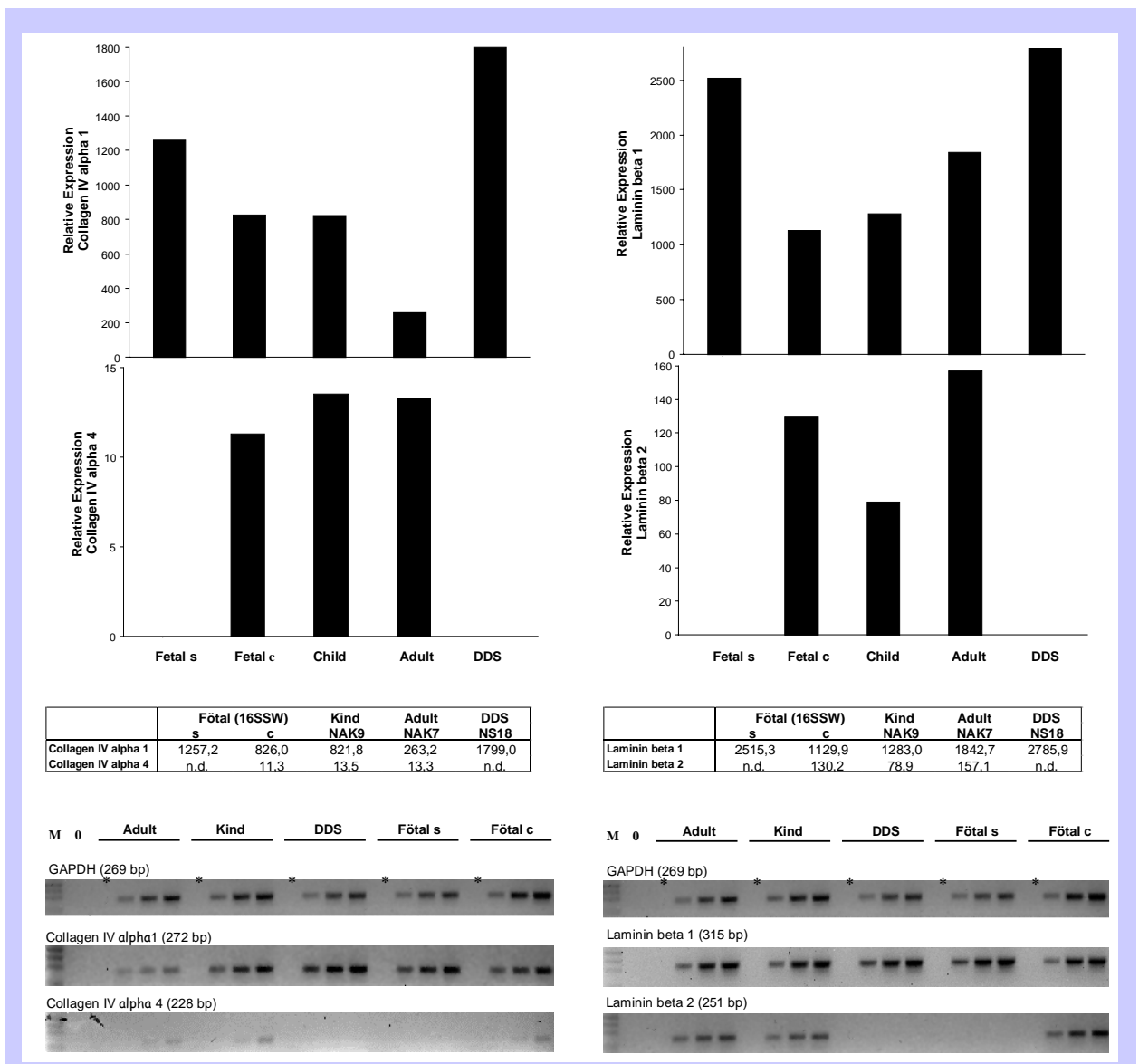


Abbildung 5.5: Relative Expression von Collagen IV alpha 1, alpha 4 und Laminin beta 1, beta 2. Die relativen Expressionslevel können nur innerhalb eines Gens und nicht zwischen den verschiedenen Genen verglichen werden. M = 1kb-Leiter (Invitrogen). 0 = 0-Wert der PCR-Reaktion. * = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. s = „s-shaped bodies“. c = „capillary-loop“ Stadien. Fötal 16SSW = fötale Niere der 16. Schwangerschaftswoche. n.d. = kein PCR-Produkt detektierbar.

adulten Glomeruli; in den DDS-Glomeruli ist sie jedoch signifikant reduziert. Außerdem ist die glomeruläre Expression eher segmental. Die glomeruläre Expression von Laminin beta 2 zeigt während der Entwicklung ein ähnliches Muster wie Collagen IV alpha 4: keine Expression in den frühen glomerulären Strukturen, stark positiv im Mesangium und der GBM der „capillary-loop“ Stadien der Glomeruli und auch in den kindlichen und adulten Glomeruli. Die DDS-Nieren zeigen eine reduzierte Laminin beta 2-Expression, einige Glomeruli sind auch völlig negativ.

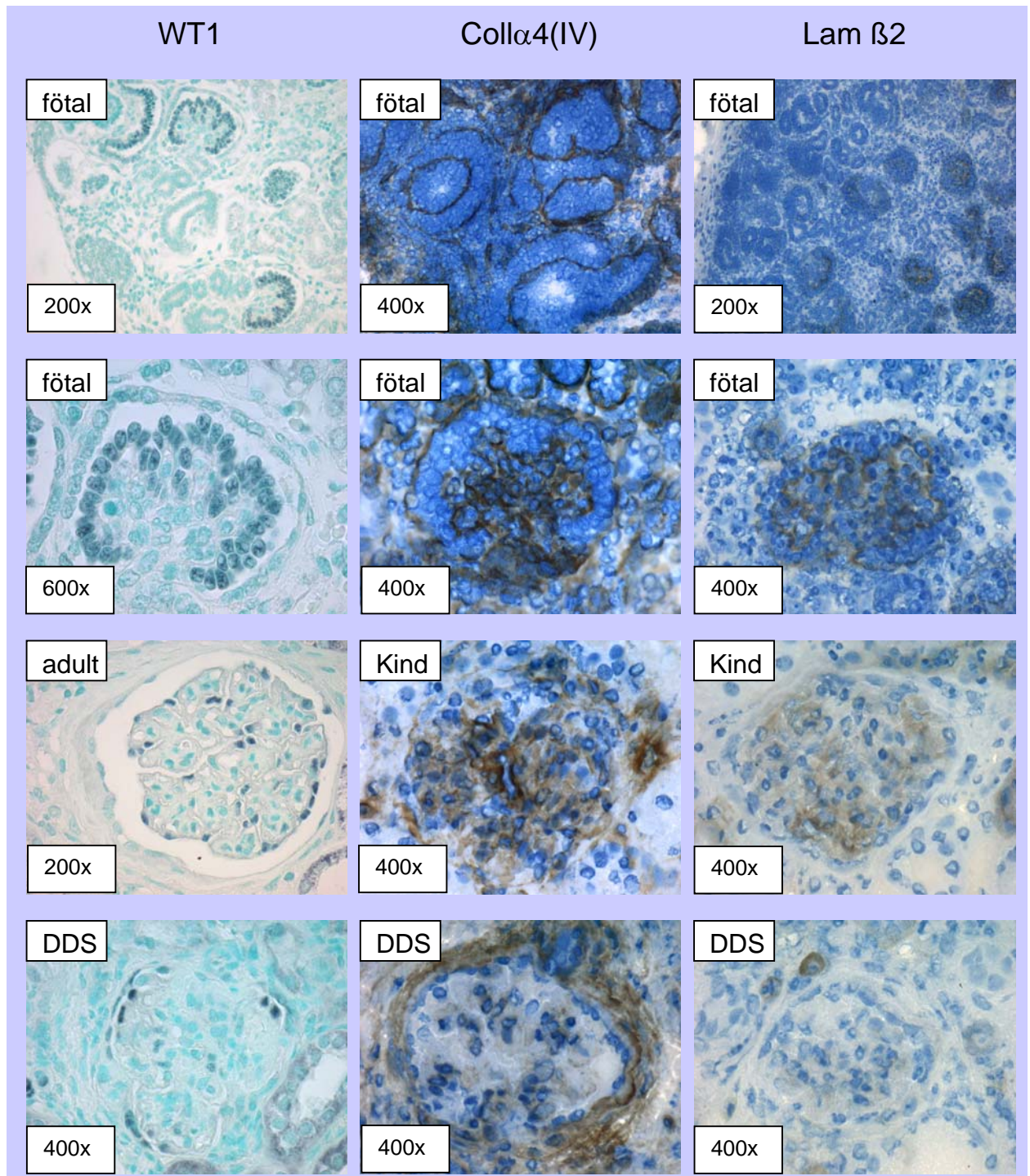


Abbildung 5.6: Übersicht über die immunhistochemischen Färbungen in den fötalen-, kindlichen-, adulten- und DDS-Glomeruli. Die WT1-Färbungen wurden mir mit freundlicher Genehmigung von F. Eitner (Aachen) zur Verfügung gestellt.

5.2 Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen

Beim Anlegen primärer Podozyten-Zellkulturen besteht die Gefahr der Durchmischung mit anderen Zelltypen der Niere, wie z.B. Mesangiumzellen, Endothelzellen und Parietalzellen. Um herauszufinden, ob es sich bei den verwendeten Podozyten-Zellkulturen um möglichst reine Kulturen handelt, wurden die Zellen immunfluorimetrisch auf Proteinebene und über semiquantitative RT-PCR auf RNA-Ebene auf bekannte Podozytenmarker untersucht. Dies war für die anschließenden Versuche (Expressionsanalysen, siRNA-Experimente) notwendig.

Insgesamt standen für die Charakterisierung drei Podozyten-Zellkulturen nicht erkrankter Personen, drei DDS-Kulturen, zwei CNF-Kulturen sowie Mesangiumzellen (MesCC2559) und embryonale Nierenzellen (HEK293) zur Verfügung (siehe Tabelle 5.4). Im Gegensatz zu den DDS-Podozyten, die alle Mutationen im *WT1*-Gen besitzen, tragen die CNF-Podozyten Mutationen im *NPHS1*-Gen, das für Nephrin kodiert und zum kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ führt.

Zellkultur	Zelltyp	Indikation	Mutation	Methode
N13	Podozyten	gesund	---	IF, SQ RT-PCR
N13T	Podozyten	gesund	---	IF, SQ RT-PCR
MD283r	Podozyten	gesund	---	SQ RT-PCR
N90	Podozyten	DDS	<i>WT1</i>	IF, SQ RT-PCR
N100	Podozyten	DDS	<i>WT1</i>	SQ RT-PCR
DDS16	Podozyten	DDS	<i>WT1</i>	SQ RT-PCR
97-1	Podozyten	CNF	<i>NPHS1</i>	IF, SQ RT-PCR
MD219	Podozyten	CNF	<i>NPHS1</i>	IHC
HEK293	embryonale Nierenzellen	Kontrolle	---	IF, SQ RT-PCR
CC2559	Mesangium	Kontrolle	---	IF, SQ RT-PCR

Tabelle 5.4: Material für die Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen. IF = Immunfluoreszenz. SQ RT-PCR = semiquantitative RT-PCR.

5.2.1 Nachweis von Podozytenmarkern mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Methode wurden die Podozyten-Kulturen auf Proteinebene charakterisiert. In den meisten Fällen erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Untersucht wurde die Expression der Proteine smAktin, Cytokeratin, Talin, Vinculin, Vimentin, Nephrin, CD2AP, Podocin und WT1:

smAktin wird von mesangialen Zellen exprimiert und sollte in den Podozyten negativ sein (Holthöfer et al., 1995).

Cytokeratin ist ein Intermediärfilamentprotein, das charakteristisch für epitheliale Zellen ist. Es wird im reifen Nephron, allerdings nicht im Glomerulus und in den Parietalzellen der BOWMAN-Kapsel, exprimiert (Holthöfer et al., 1984).

Vinculin ist Bestandteil des kontraktiven Apparates der Podozytenfußfortsätze und kann an Aktin und Paxillin binden (Smoyer und Mundel, 2001; Nagata und Watanabe, 1997).

Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein, das charakteristisch für mesenchymale Zellen ist (Oosterwijk et al., 1990). Podozyten exprimieren ebenso wie Nieren-Stammzellen und uninduziertes Mesenchym Vimentin aufgrund ihrer mesenchymalen Herkunft (Smoyer und Mundel, 2001; Nagata und Watanabe, 1997).

Nephrin ist der Hauptbestandteil der Schlitzmembran, die von den Podozyten zwischen den Fußfortsätzen gebildet wird (Holthöfer et al., 1999; Holzman et al., 1999).

CD2AP verbindet das Cytoskelett der Podozyten mit Nephrin in der Schlitzmembran (Li et al., 2000). Mäuse, denen CD2AP fehlt, sterben 6 Wochen nach Geburt aufgrund abnormaler Podozytenfußfortsätze und Proteinurie (Shih et al., 1999).

Podocin ist Teil der Schlitzmembran in den Podozyten. Mutationen im entsprechenden *NPHS2*-Gen resultieren in einem autosomal rezessiven steroid-resistenten nephrotischen Syndrom (Boute et al., 2000).

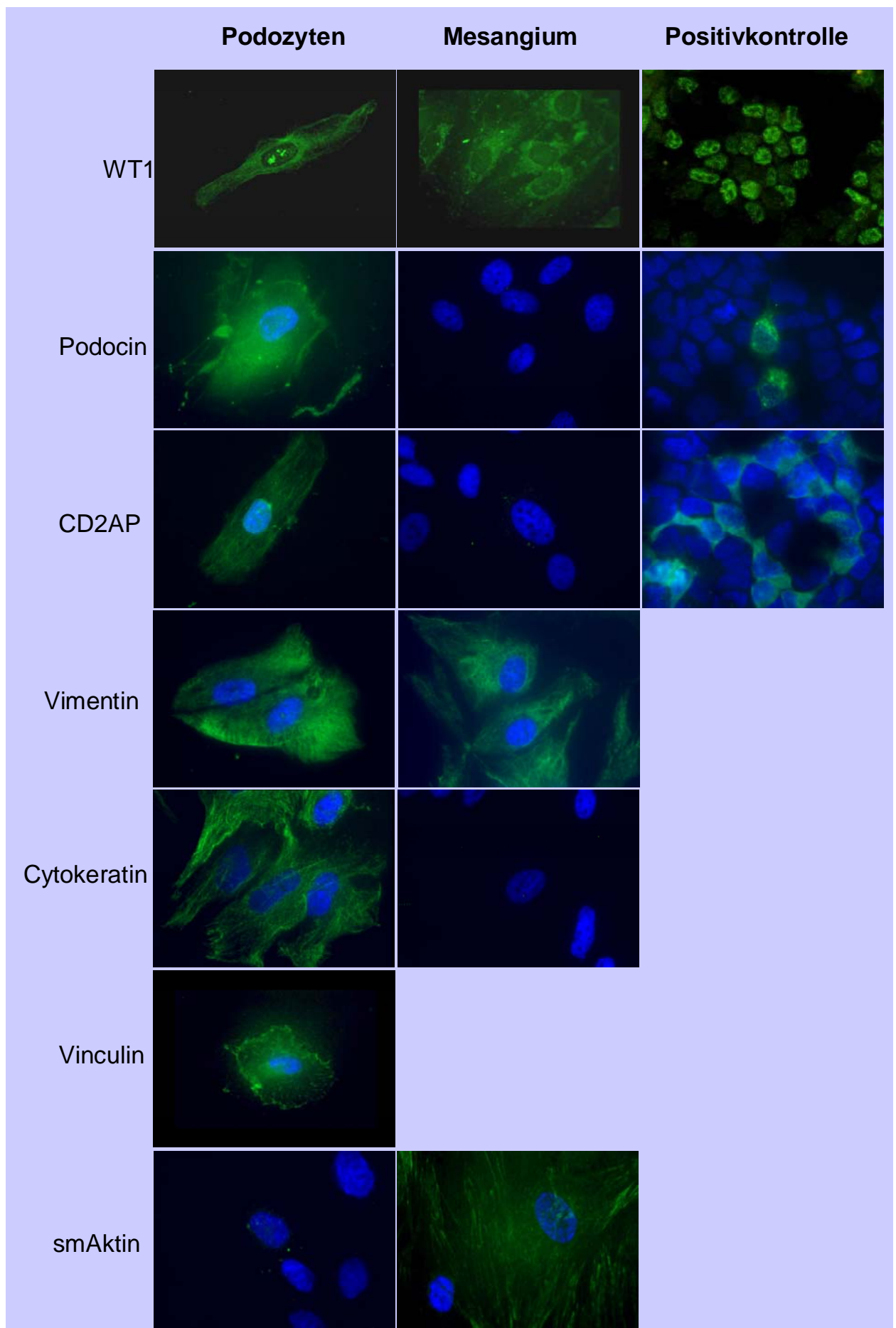
WT1 ist ein kernlokalisierendes Protein, das als Transkriptionsfaktor in vollständig ausgebildeten Nieren nur von Podozyten und während der Entwicklung von uninduziertem und induziertem Mesenchym sowie von Podozytenvorläuferzellen exprimiert wird (Palmer et al., 2001).

Als Positivkontrolle für CD2AP, Nephrin, Podocin und WT1 wurden HEK293-Zellen mit den jeweiligen cDNAs transfiziert (Herstellung siehe 4.2.1). Als Positivkontrolle für smAktin dienten die primären Mesangiumzellen MesCC2559. Die vollständige Charakterisierung ist in Tabelle 5.5 zusammengefasst. In Abbildung 5.7 ist ein Teil der Immunfluoreszenz-Untersuchungen dargestellt.

Zellkultur		Antikörper								
		Cytokeratin	Vimentin	Talin	Vinculin	sm-Aktin	CD2AP	Podocin	Nephrin	WT1
N13 P24diff	NN	+	+	+	+	-	+	+	n.a.	+
N13T P10		+	+	+	+	-	+	+	n.a.	+
N90 P4diff	DDS	+	+	+	+	-	+	+	n.a.	+
N90 K1 P3		+	+	+	+	-	+	+	-	+
97/1 K7 P4	CNF	+	+	+	+	+	+	+	n.a.	+
MD219 K2 P3		+	+	+	+	-	+	+	n.a.	+
MD219 K1 P4		+	n.a.	n.a.	n.a.	-	n.a.	n.a.	n.a.	+
MD219 K1 P3		+	+	+	+	-	+	+	n.a.	n.a.
MD219 K9 P3		n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	-	+	-	-	-
CC2559	Mesangium	-	-	+	+	+	-	-	-	-
HEK293 transf.		n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	+	+	+	+

Tabelle 5.5: Ergebnisse der immunfluorimetrischen Charakterisierung von Podozyten. P = Passage. K = Klon. diff = ausdifferenzierte Zellen. + = Protein wird exprimiert. - = Protein wird nicht exprimiert. n.a. = nicht analysiert. n.v. = Präparate nicht vorhanden. transf. = mit dem untersuchten Gen transfizierte HEK293-Zellen (Positivkontrollen). NN = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Abbildung 5.7 (siehe nächste Seite): Charakterisierung von Podozyten mittels Immunfluoreszenz. Alle Bilder sind mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen. grün = FITC. blau = DAPI. Positivkontrollen = HEK293-Zellen mit den jeweiligen cDNAs transfiziert.



Alle Podozyten-Zellkulturen, bis auf die CNF-Podozyten MD219 K9 P3, die keine Expression von Podocin und WT1 zeigten, exprimierten die Podozytenmarker Vinculin, WT1, Vimentin, CD2AP und Podocin. Die Podozyten und die mit WT1-transfizierten HEK293-Zellen zeigten eine kernständige WT1-Färbung. Eine cytoplasmatische WT1-Färbung konnte bei Podozyten und Mesangium festgestellt werden. Nephtrin als Hauptbestandteil der Schlitzmembran wurde hingegen bei keiner Podozyten-Zellkultur nachgewiesen. Da allerdings die mit einer Nephtrin cDNA transfizierten HEK293-Zellen positiv waren, kann dies nicht an der Methode an sich liegen (Abbildungen nicht gezeigt). Dass die Zellen kein Nephtrin exprimieren, liegt wohl daran, dass sie noch proliferieren und nicht ausdifferenziert sind. smAktin als mesangialer Marker war erwartungsgemäß in allen Podozyten, bis auf die CNF-Podozyten 97-1, negativ. Dagegen war Cytokeratin in allen Podozyten positiv, obwohl es als epithelialer Zellmarker in allen Podozyten negativ sein sollte.

5.2.2 Nachweis von Podozytenmarkern mittels semiquantitativer RT-PCR

Die Immunfluoreszenz-Ergebnisse wurden auf mRNA-Ebene durch semiquantitative RT-PCRs ergänzt. Untersucht wurde die Expression der Gene *WT1*, *NPHS2*, *GLEPP1*, *NPHS1*, *ACTN4*, *Synaptopodin*, *Pod-1*, *CD2AP*, *Densin*, *Dystroglycan*, *Ezrin* und *Podoplanin*. Durch die zusätzlich untersuchten Marker sollte auch der Pool an bekannten podozytären Markern erweitert werden.

GLEPP1 ist eine Rezeptortyrosin-Phosphatase, die in der apikalen Membran der Podozyten sitzt (Wiggins et al., 1995; Sharif et al., 1998).

α -Actinin 4 ist ein Podozyten-spezifisches Protein, das Aktin quervernetzt (Michaud et al., 2003). Mutationen in dem entsprechenden *ACTN4*-Gen sind mit einer Form der autosomal dominanten fokal-segmentalen Glomerulosklerose assoziiert.

Synaptopodin ist ein Protein differenzierter Podozyten (Mundel et al., 1991, 1997a) und ist dort mit Aktin-Filamenten assoziiert.

Pod-1 wird in den Podozytenvorläufern und den reifen Podozyten exprimiert (Quaggin et al., 1999). Das Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor des Helix-Loop-Helix-Typs. Pod-1 wird während der Embryonalentwicklung nur von mesodermalen Zellen gebildet.

Densin wird spezifisch von Podozyten in der adulten Niere exprimiert und interagiert mit α -Actinin 4 (Ahola et al., 2003).

Dystroglycan wird von den Podozyten adulter Nieren exprimiert (Ferletta und Ekblom, 1999).

Ezrin ist entlang der apikalen Plasmamembran von Podozyten lokalisiert und mit dem Cytoskelett über Aktin verbunden (Orlando et al., 2001).

Podoplanin wird von Podozyten und Parietalzellen im adulten Glomerulus exprimiert (Breiteneder-Geleff et al., 1997).

Die optimierten RT-PCR-Programme und –Reaktionsansätze für die einzelnen Gene sind im Methodenteil 4.4.5 aufgelistet. In die PCR wurden ca. 50 ng cDNA eingesetzt, für *GAPDH* als Housekeeping-Gen nur 1/20. Nach 30, 35 und 40 Zyklen wurden 10 µl PCR-Produkt entnommen und auf ein 2- oder 3 %iges TAE-Agarosegel, je nach Produktgröße, aufgetragen. Die semiquantitative Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels der AIDA 2.11-Software der Firma Raytest. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR sind in Tabelle 5.6 dargestellt.

	Kontroll-Podozyten			DDS-Podozyten			CNF-Podozyten		
	MD283r	N13Tel	N13	N90	DDS16	N100	97/1	HEK293	Mesangium
WT1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Synaptopodin	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Pod-1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NPHS1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
NPHS2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Densin	+	+	+	+	+	+	+	.*	.*
Podoplanin	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	+	+
Ezrin	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	+	+
Dystroglycan	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	+	+
ACTN4	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	+	+
GLEPP1	+	+	+	+	n.a.	+	+	+	-
CD2AP	n.a.	n.a.	+	+	n.a.	+	+	+	.*

Tabelle 5.6: Ergebnisse der Charakterisierung von Podozyten mittels semiquantitativer RT-PCR. + = RNA wird exprimiert. - = RNA wird nicht exprimiert. n.a. = nicht analysiert. * = PCR-Produkt erst bei Zyklus 40. Kontrollen = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Alle untersuchten Podozyten-Zellkulturen exprimierten die Gene *WT1*, *Synaptopodin*, *Pod-1*, *NPHS1*, *NPHS2* und *Densin*, die in den Mesangium- bzw. HEK293-Zellen nicht oder erst bei Zyklus 40 der PCR-Reaktion detektiert wurden. Sie können deshalb als typische podozytäre Marker angesehen werden. Die untersuchten Marker *Podoplanin*, *Ezrin*, *Dystroglycan*, *ACTN4*, *GLEPP1* und *CD2AP* konnten sowohl bei Podozyten als auch bei HEK293-Zellen sowie z.T. auch bei den Mesangiumzellen nachgewiesen werden. Deshalb können diese nicht zur Charakterisierung von Podozyten verwendet werden. Abbildung 5.8 zeigt exemplarisch die Gelbilder der semiquantitativen RT-PCR von *GAPDH*, *NPHS1* und *Densin*.

Zusätzlich wurde auch die Expression der einzelnen Gene untereinander verglichen (siehe Abbildung 5.9), was durch die Normalisierung auf *GAPDH* als Housekeeping-Gen ermöglicht wurde. Ausgangspunkt für diese Gegenüberstellung war die Überlegung, dass Nephrin, welches immunfluorimetrisch in den Podozyten nicht nachgewiesen werden konnte, vielleicht unter der Nachweisgrenze liegt. Vergleicht man jedoch auf mRNA-Ebene die

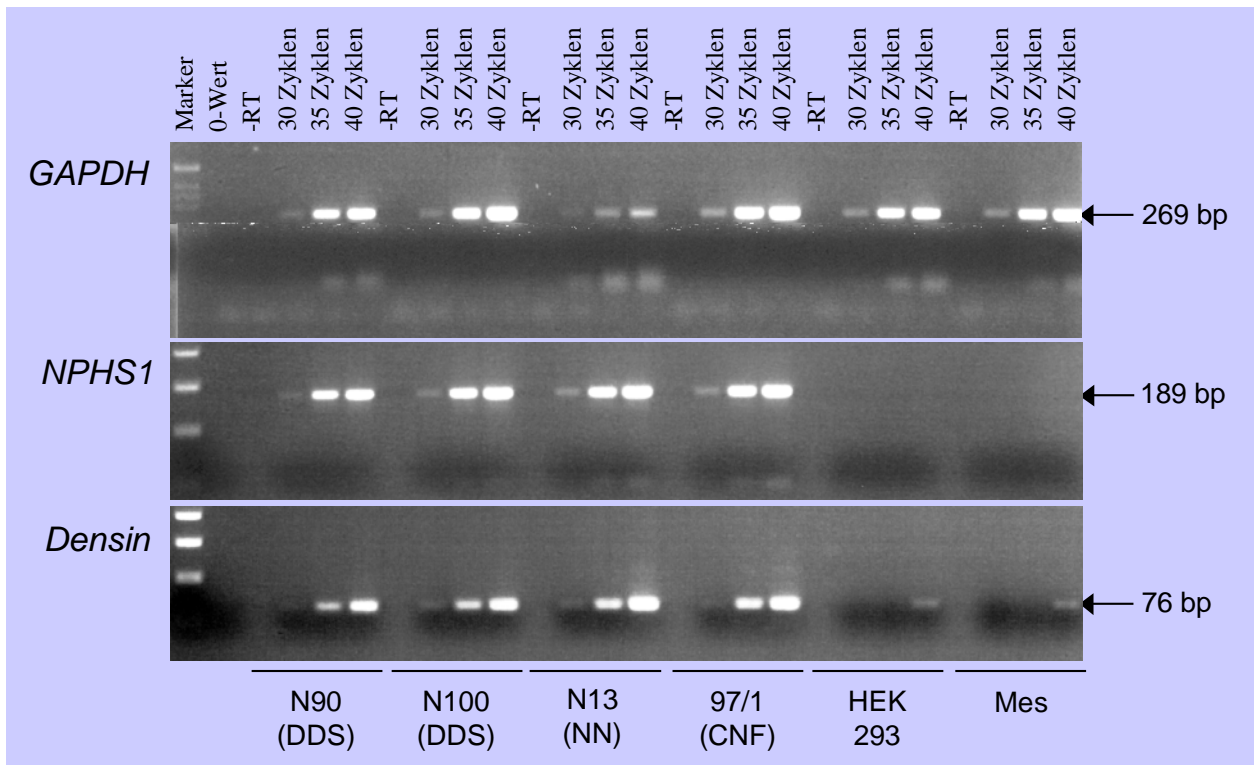


Abbildung 5.8: Gelbilder zur Charakterisierung von Podozyten mittels semiquantitativer RT-PCR am Beispiel von *GAPDH*, *NPHS1* und *Densin*. -RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. Größenmarker für *GAPDH*: 1kB-Leiter von Invitrogen. Größenmarker für *NPHS1* und *Densin*: PCR-Marker von New England Biolabs. Mes = Mesangium. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

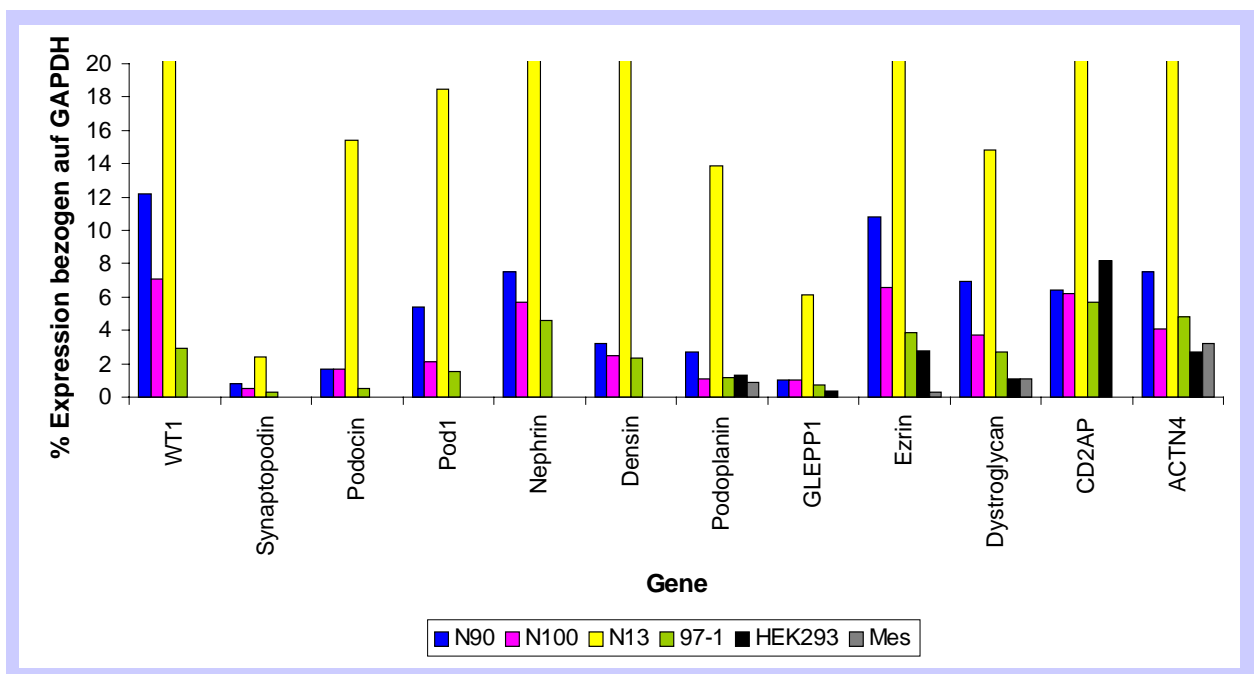


Abbildung 5.9: Charakterisierung von Podozyten mittels semiquantitativer RT-PCR. Dargestellt ist die prozentuale Expression bezogen auf *GAPDH* als Housekeeping-Gen. N90 und N100 = DDS-Podozyten. N13 = Podozyten einer nicht erkrankten Person. 97-1 = CNF-Podozyten. Mes = Mesangium.

Expression von *NPHS1* mit *CD2AP*, welches in der Immunfluoreszenz ohne Probleme detektiert werden konnte, stellt man eine ähnlich starke Expression auf mRNA-Ebene fest. Auffällig ist auch, dass die Expression der N13-Podozyten bei allen untersuchten Genen immer sehr viel stärker als in den anderen Podozyten und Zelllinien ist. Dies könnte aufgrund einer schlechten Amplifikation der *GAPDH*-Normalisierungskontrolle in den N13-Podozyten zustande gekommen sein. Hier kann man schon bei Zyklus 30 Primerdimere erkennen, die bei den anderen Zellen erst später oder gar nicht auftreten (siehe Abbildung 5.8). Dies führt zu der Vermutung einer eigentlich stärkeren Expression von *GAPDH* bei Zyklus 30, was sich auch auf die Berechnung der Expression der untersuchten Gene auswirken würde.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass es sich bei den Zellkulturen mit großer Sicherheit um Podozyten handelt. Sowohl die Podozytenmarker, die spezifisch in den Fußfortsätzen zu finden sind, wie Densin, Synaptopodin, Podocin und Nephrin, als auch die podozytenspezifischen Transkriptionsfaktoren WT1 und Pod-1 und das für Podozyten typische Intermediärfilamentprotein Vimentin konnten in den untersuchten Zellen nachgewiesen werden.

5.3 Expressionsanalysen von glomerulären Nierenzellen

Zur Anfertigung der Expressionsprofile von Podozyten-Zellkulturen und Mesangiumzellen wurden Arrays der Firma Clontech und Affymetrix verwendet.

Das Verfahren des „Expression-Profiling“ ermöglicht die simultane Expressionanalyse tausender Gene innerhalb der zu untersuchenden Proben. Wichtig ist hier vor allem die Auswahl einer guten Kontroll-RNA, die für alle betrachteten Gene als „normal exprimiert“ anzusehen ist, da die Genexpression von einer Vielzahl örtlicher, zeitlicher und exogener Faktoren abhängig ist.

Podozyten können in Zellkultur zwei verschiedene Formen ausbilden (Mundel und Kriz, 1995): die kopfsteinpflasterähnliche, polygonale Form und die verzweigte Form, die eine baumartige Struktur aufweist. Bisher 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. Um vergleichbare Expressionsprofile zu erhalten, wurde bei den verwendeten Podozyten-Zellkulturen für die Expressionsanalysen darauf geachtet, dass möglichst frühe Passagen mit polygonalen und somit undifferenzierten Zellen verwendet wurden (siehe Abbildung 5.10). Von den Mesangiumzellen (MesCC2559) wurde ein Expressionsprofil nur mit Hilfe der Clontech-Arrays erstellt.

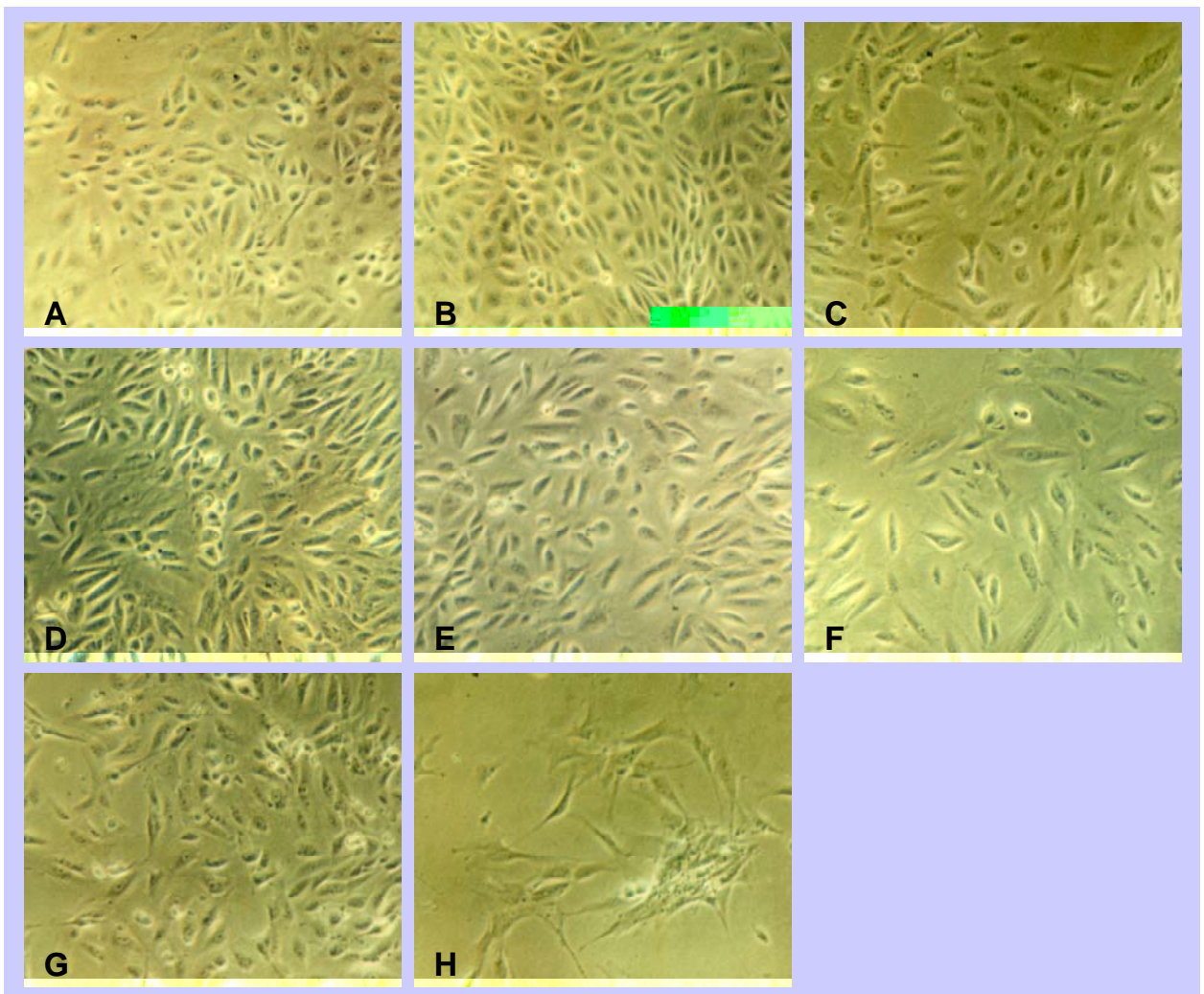


Abbildung 5.10: Zellkulturen von Podozyten und Mesangiumzellen. A-C: Podozyten von nicht erkrankten Personen (A: N13 P17, B: N13T P46, C: MD283r P4); D-E: Podozyten von DDS-Patienten (D: N90/3 K1 P3, E: N100 K2 P2, F: DDS16); G: Podozyten von einem CNF-Patient (97-1 K29 P2); H: Mesangiumzellen (CC2559 P6). Alle Zellen sind mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen.

5.3.1 Clontech-Arrays

In der vorliegenden Arbeit wurde das Human Atlas-Array-Set 3.6 für die Erstellung der Expressionsprofile verwendet. Der Ablauf einer Array-Analyse ist in Abbildung 5.11 zusammengefasst.

Es wurden Expressionsprofile einer Podozyten-Zellkultur einer nicht erkrankten Person (NN, = Kontroll-Podozyten), zweier DDS-Kulturen (DDS) und einer CNF-Kultur (CNF) sowie von Mesangiumzellen erstellt (siehe Methoden 4.5.1). In Tabelle 5.7 sind die verwendeten Proben zusammengefasst.

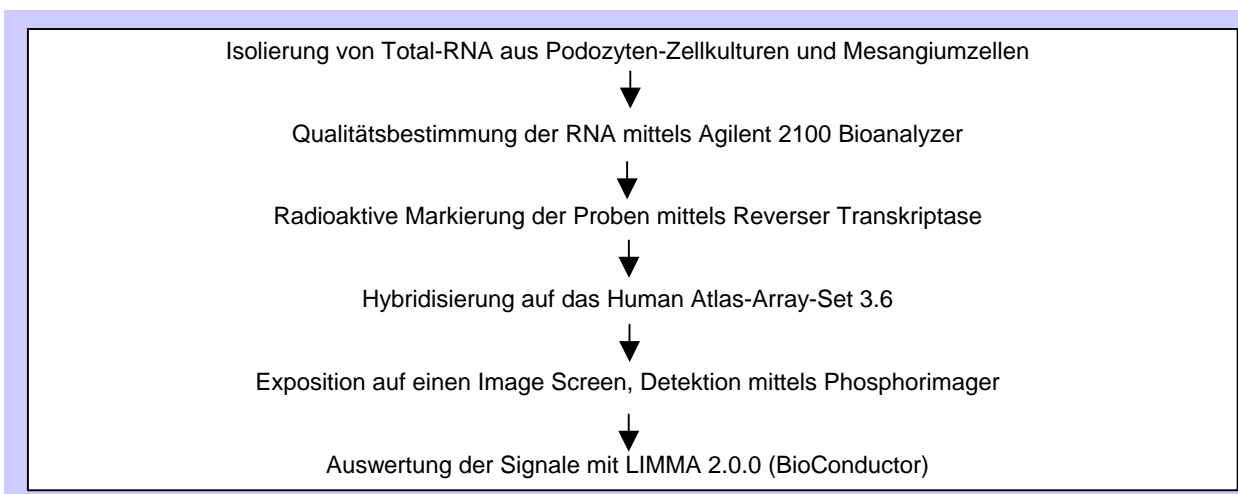


Abbildung 5.11: Ablauf der Array-Analyse nach der Clontech-Methode.

Zellen	Passage	Anzahl RNAs	Anzahl cDNA-Synthesen	Filter			Anzahl Meßwerte
				I	II	III	
NN	N13 P17	1	2	3	3	3	8
	N13 P17	1	2	3	3	3	
	N13 P22	1	1	2	2	2	
NS	CNF 97-1 K11 P2	1	2	3	3	3	7
	97-1 K31 P2/K32 P1/K29 P2	3	1	2	2	2	
	97-1 K3 P3	1	1	2	2	2	
DDS	N90/3 K5 P4/K3 P4	2	2	3	3	3	6
	N100 K2 P3/K3 P3	2	2	3	3	3	
Mes	CC2559 P7	1	1	2	2	2	2

Tabelle 5.7: Zellkulturmaterial für die Clontech-Arrays. K = Klon. P = Zellkultur-Passage. NN = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ. NS = CNF + DDS. Mes = Mesangium.

Zuerst wurde die Qualität der isolierten RNAs mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt (siehe Abbildung 5.12). Das Verhältnis der Peaks der 28S/18S ribosomalen RNA lag immer im Bereich 2:1, wie es bei einer hoch qualitativen RNA, also undegradierter RNA, sein sollte (siehe Methoden 4.4.3).

Pro Filter wurden 3,4 µg Total-RNA radioaktiv mit α -³³P dCTP markiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Filter gewaschen, um unspezifisch gebundene Radioaktivität zu entfernen. Die radioaktiven Signale wurden nach 72 h gemessen. Es wurden RNA-Proben aus Zellkulturen verschiedener Passagen hybridisiert (bis auf die Mesangiumzellen) und im Anschluss die Ergebnisse gemittelt, um Zellzyklus- und Zelldichte-abhängige Expressionsveränderungen so gering wie möglich zu halten. Die Proben wurden teilweise getrennt voneinander markiert und auf die Filter hybridisiert (vergleiche Tabelle 5.7).

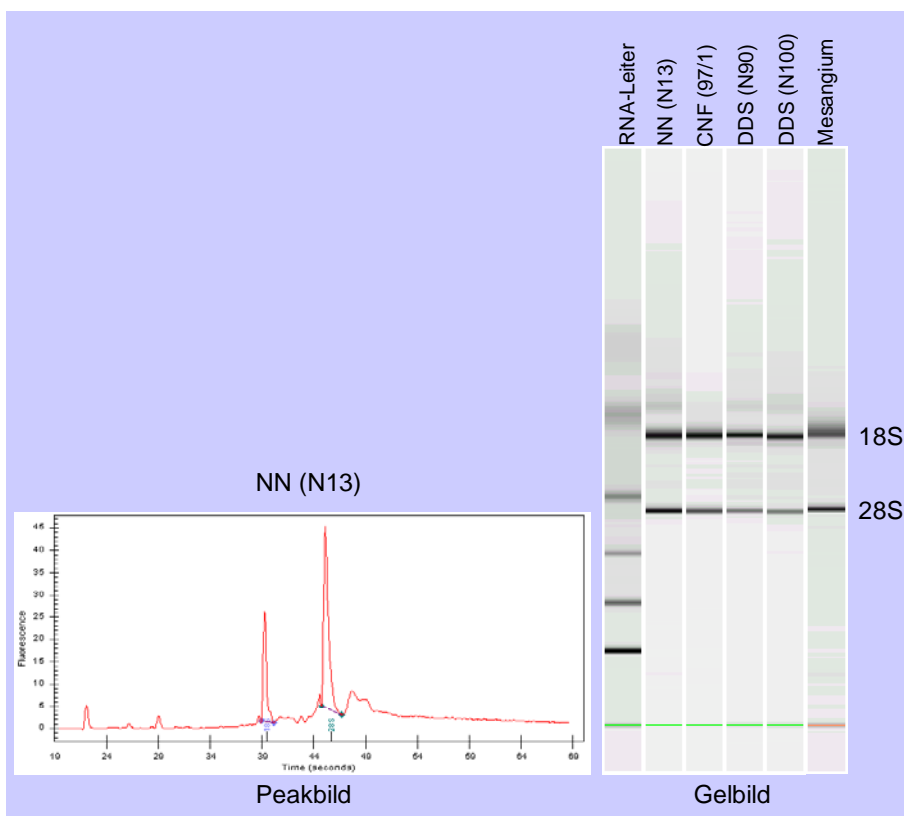


Abbildung 5.12:

Qualitätsbestimmung der RNA mittels Bioanalyzer. Dargestellt ist das Peakprofil am Beispiel der N13-Podozyten und das Gelbild der meisten verwendeten RNAs. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Die genaue Quantifizierung der Signale, die die Expressionsstärke der Gene darstellen, erfolgte anschließend mit Hilfe des LIMMA 2.0.0-Programms (siehe Methoden 4.5.3). Erst wenn mindestens ein Unterschied von Faktor 1,5 in der Signalstärke zwischen zwei unterschiedlichen Proben zu beobachten war, wurde eine differentielle Genexpression in Erwägung gezogen.

Die Array-Analysen ergaben sehr große Datenmengen, die deshalb in dieser Arbeit nur in Auszügen wiedergegeben werden können. Listen der ausgesuchten Daten finden sich im Anschluss bei dem Vergleich der folgenden Expressionsdaten:

- DDS-Podozyten vs. CNF- und Kontroll-Podozyten (= DDS-spezifische Gene)
- Kontroll-Podozyten vs. DDS- und CNF-Podozyten (= NS-spezifische Gene)
- CNF-Podozyten vs. DDS- und Kontroll-Podozyten (= CNF-spezifische Gene)
- Podozyten vs. Mesangium

Durch den Vergleich der DDS-Podozyten mit den CNF- und Kontroll-Podozyten sollten Expressionsunterschiede herausgefiltert werden, die auf das Vorhandensein einer *WT1*-Mutation zurückzuführen sind. Expressionsunterschiede beim nephrotischen Syndrom (NS) im Allgemeinen sollten durch den Vergleich der CNF- und DDS-Podozyten mit den Kontroll-Podozyten erhalten werden. Durch den Vergleich von CNF-Podozyten mit den restlichen Podozyten sollte man Expressionsunterschiede aufgrund des Vorhandenseins einer *NPHS1*-Mutation erhalten. Dabei sind die beiden zuletzt genannten Vergleiche nur bedingt

aussagekräftig, da nur eine CNF- und eine Kontroll-Zellkultur untersucht wurden. Hier zeigen die Ergebnisse nur eine Richtung auf und müssen in Zukunft durch die Analyse weiterer Proben vervollständigt bzw. mit den noch folgenden Ergebnissen der Affymetrix-Arrays verglichen werden.

Durch den Vergleich der Podozyten mit den Mesangiumzellen sollten neue podozytäre wie auch mesangiale Marker gefunden werden. Problematisch war auch hier, dass nur eine Mesangium-Zelllinie zur Verfügung stand und deshalb Schwankungen in den Expressionsdaten möglich sind.

Bei den unten aufgeführten Tabellen ist zu beachten, dass nur der p-Wert beim Vergleich der zwei DDS-Zellkulturen mit der Kontroll- und CNF-Zellkultur eine Aussage über die biologische Varianz zulässt. Bei allen anderen Vergleichen zeigt der p-Wert nur eine experimentelle Varianz auf, da von den Kontroll-, CNF- und Mesangium-Zellen nur jeweils eine Zellkultur mit teilweise unterschiedlichen Passagen untersucht wurde.

Die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene bei den einzelnen Vergleichen ist in Abbildung 5.13 zusammengefasst. Insgesamt sind 52 DDS-spezifische ($FC \geq 1,5$; $p < 0,05$), 47

CNF-spezifische ($FC \geq 1,5$; $p < 0,05$) und 129 NS-spezifische ($FC \geq 2,0$; $p < 0,05$) Gene differentiell exprimiert, wobei es zwischen den einzelnen Auswertungen aufgrund der Festlegung der p-Wert-Grenze zu Überschneidungen kommt.

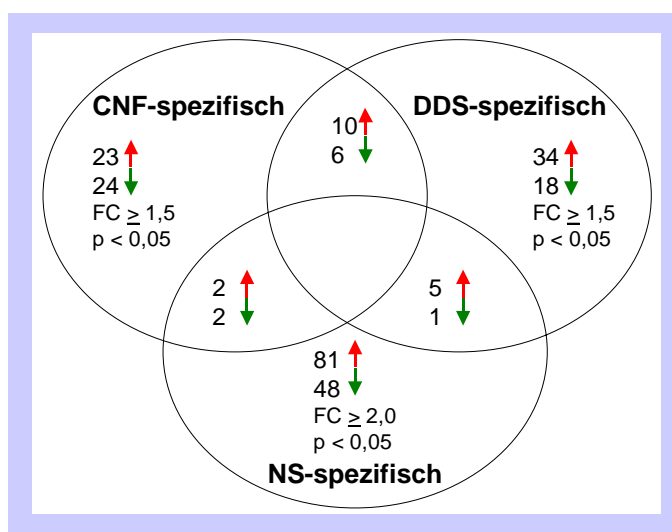


Abbildung 5.13: Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene der Clontech-Array Analysen. Erklärung im Text. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

In den folgenden stark gekürzten Listen (siehe Tabellen 5.8 – 5.10) wurden die aufgeführten Gene nach den größten Unterschieden und ihrer biologischen Funktion ausgewählt:

a) DDS-Podozyten vs. CNF- und Kontroll-Podozyten (NN)

Filter	Label	Gen	DDS / NN + CNF	
			FC $\geq 1,5$	p < 0,05
I	C08f	tumor necrosis factor alpha (TNFA); cachectin	6,84	1,11E-07
I	F05m	matrix metalloproteinase 7 (MMP7); matrilysin	3,66	3,35E-05
I	F08d	colony-stimulating factor 2 (CSF2)	3,41	3,98E-08

Filter	Label	Gen	DDS / NN + CNF	
			FC \geq 1,5	p < 0,05
I	E14g	intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1); CD54 antigen	2,81	3,98E-08
II	E07h	osteoprotegerin (OPG)	2,78	5,78E-04
I	F12g	small inducible cytokine subfamily subfamily B member 5 (SCYB5); CXCL5	2,44	3,34E-03
II	E10n	dual-specificity protein phosphatase 5 (DUSP5)	2,26	4,92E-05
III	C02c	FIBULIN 1 ISOFORM C	2,15	2,86E-04
I	B05f	epithelial discoidin domain receptor 1 (EDDR1; DDR1)	2,08	3,35E-05
II	B05j	natural killer cells protein 4 (NK4)	1,83	4,36E-03
I	C09j	IEX-1L anti-death protein; PRG-1; DIF-2 (IER3)	1,82	1,05E-02
I	E10i	integrin alpha 6 (ITGA6); VLA6	1,80	6,42E-03
I	E02g	cadherin 3 (CDH3); placental cadherin (P-cadherin; CDHP)	1,77	1,24E-03
III	F04d	F-ACTIN CAPPING PROTEIN BETA SUBUNIT (CAPZ)	1,72	1,79E-04
II	B10d	B-cell translocation gene 1 (BTG1)	1,71	2,68E-03
I	E05i	integrin beta 6 (ITGB6)	1,68	3,34E-03
II	F11k	NEUROFILAMENT TRIPLET L PROTEIN (NEFL)	1,66	8,47E-03
II	E06e	insulin-like growth factor-binding protein 10 (IGFBP10)	1,64	4,98E-03
I	B12n	ras-related associated with diabetes protein (RRAD; RAD1)	1,60	1,55E-02
III	E05k	GREMLIN	1,58	3,87E-03
III	B06k	MUCOSAL ADDRESSIN CELL ADHESION MOLECULE 1 (MADCAM-1)	1,56	1,31E-02
II	F03l	muscle/brain cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKIA)	0,61	3,26E-02
I	A11d	v-erbA related protein 3 (EAR3); nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (NR2F2)	0,60	3,34E-03
I	B12g	smooth muscle & non-muscle myosin light chain kinase (MLCK)	0,55	7,89E-04
I	C09e	transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)	0,51	6,97E-03
II	A04m	thy-1 membrane glycoprotein; CDW90 antigen	0,47	5,78E-04
III	C01n	fibrillin 2 (FBN2)	0,46	1,79E-04
I	F03m	matrix metalloproteinase 2 (MMP2); gelatinase A	0,46	1,23E-04
I	A09g	insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2)	0,36	1,30E-02
I	E11i	integrin beta 4 (ITGB4)	0,33	7,89E-04

Tabelle 5.8: DDS-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

b) DDS- und CNF-Podozyten (=NS) vs. Kontroll-Podozyten (NN)

Filter	Label	Gen	NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 2,0	p < 0,05
I	F12h	insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)	14,44	4,38E-10
III	E05m	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5)	8,94	7,57E-10
I	F05k	protease inhibitor 1 (PI1); alpha-1-antitrypsin	5,55	1,23E-08
I	C11f	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL); APO2L; TNFSF10	5,10	1,74E-05
I	A08g	cell surface glycoprotein MUC18 (MCAM)	4,63	5,25E-10
I	E03h	vascular cell adhesion protein 1 (V-CAM1)	4,60	1,63E-05
I	F06f	diphtheria toxin receptor (HBEGF, DTR)	4,08	4,78E-07
I	F02f	vascular endothelial growth factor (VEGF)	3,91	1,14E-07
I	F06j	interleukin 11 (IL11)	3,78	1,16E-06
III	F03m	MYOSIN HEAVY CHAIN, NONMUSCLE TYPE A (NMMHC-A)	3,47	2,86E-07
II	F12n	actinin alpha 1 (ACTN1)	3,02	1,58E-04
I	F12d	transforming growth factor beta 2 (TGFB2)	2,98	5,03E-06
I	E09f	procollagen IV alpha 2 subunit (COL4A2)	2,89	1,25E-05
I	C14i	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 (BNIP3; NIP3)	2,85	2,22E-03
III	E09k	myosin regulatory light chain 2 smooth muscle isoform (myosin RLC)	2,84	1,49E-03
I	F12c	bone morphogenetic protein 1 (BMP1)	2,66	5,11E-04
I	E13h	integrin beta 3 (ITGB3)	2,64	2,59E-06

Filter	Label	Gen	NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 2,0	p < 0,05
I	F09m	matrix metalloproteinase 1 (MMP14); MT-MMP1	2,64	7,14E-05
I	F04k	heregulin-beta3; glial growth factor; neuregulin	2,50	6,49E-04
I	F07e	neuroleukin (NLK)	2,46	9,26E-06
I	E13k	fibroblast growth factor receptor1 (FGFR1)	2,45	1,06E-05
II	F13a	drebrin E	2,40	1,75E-03
I	E09i	integrin beta 1 (ITGB1); fibronectin receptor beta subunit (FNRB)	2,40	1,27E-06
II	D07h	antagonist decoy receptor for TRAIL/APO2L (TRID); TNFRSF10C	2,34	1,32E-03
I	D02g	neuregulin 1 (NRG1); heregulin alpha (HRGA; HGL)	2,29	6,19E-04
I	E14j	tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6)	2,26	1,61E-05
I	B08m	ras homolog gene family member B (RHOB; ARHB)	2,24	7,70E-05
II	C02f	secreted phosphoprotein 1 (SSP1); osteopontin (OPN) vitronectin receptor alpha subunit (VNRA); integrin alpha V subunit (ITGAV)	2,24	1,32E-04
I	E12g		2,20	4,17E-06
I	E08i	fibronectin receptor alpha subunit (FNRA); integrin alpha 5 (ITGA5)	2,19	2,37E-04
II	F07c	a disintegrin & metalloproteinase domain 10 (ADAM10)	2,13	1,32E-04
III	C02d	fibrillin 1	2,12	5,31E-03
I	B02j	Janus tyrosine-protein kinase 1 (JAK1)	2,09	1,25E-05
II	F02l	annexin VI (ANX6)	2,07	4,65E-03
I	D08j	hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 alpha)	2,06	4,28E-04
I	D05k	microphthalmia-associated transcription factor (MITF)	2,02	1,06E-02
I	F01k	follistatin-related protein	2,02	1,21E-02
I	C12f	tumor necrosis factor superfamily member 7 (TNFSF7)	1,98	6,57E-03
III	F02k	microtubule-associated protein 4 (MAP4)	1,98	2,00E-05
I	E10b	homeobox protein 7 (HOX7)	0,49	5,81E-03
II	E07e	wingless-related MMTV integration site 7a protein (WNT7A)	0,48	2,35E-03
I	E05b	interferon-stimulated gene factor 3 gamma subunit (ISGF3G) inhibitor of apoptosis protein1 (IAP1; API1); TNFR2-TRAF signaling	0,45	3,36E-05
I	C09k	complex protein 1; MIHC	0,45	1,53E-03
I	C05l	DNA topoisomerase II alpha (TOP2A)	0,44	2,07E-03
III	A03h	TROPOMODULIN	0,39	1,06E-04
III	A01i	Human intestinal and liver tetraspan membrane protein (il-TMP); TM4SF4	0,39	3,09E-05
II	A07l	pre-B-cell leukemia transcription factor 3 (PBX3)	0,37	3,46E-06
III	D03i	RETINAL SHORT-CHAIN DEHYDROGENASE/REDUCTASE RETSDR1	0,32	3,39E-06
II	A06c	membrane metalloendopeptidase (MME); neprilysin; CALLA	0,32	3,98E-06
I	C12d	ems1 oncogene; cortactin (CTTN)	0,31	4,87E-04
I	D09m	basic transcription element-binding protein 2 (BTEB2)	0,29	6,76E-06
I	C06h	caspase 4 (CASP4); CASP5	0,29	1,16E-06
III	A10l	hairy & enhancer of split protein 1 (HES1)	0,26	1,92E-06
I	A06a	p53-binding mouse double minute 2 homolog (MDM2)	0,24	1,23E-06
II	C14f	annexin VIII (ANX8)	0,23	3,16E-08
I	D11m	inhibitor of DNA binding 2 protein (ID2)	0,22	2,59E-06
II	D04k	cytochrome P450 VIII A1 (CYP8A1); PTGIS	0,17	5,70E-09
II	B11l	aldehyde dehydrogenase (ALDH6)	0,14	3,46E-06
III	A01h	BONE MARROW STROMAL ANTIGEN 2 (BST-2)	0,14	9,29E-09
I	A11h	cyclin A1 (CCNA1)	0,10	4,38E-10
III	C02b	MICROFIBRIL-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN 2 (MAGP-2)	0,08	7,46E-12

Tabelle 5.9: NS-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

c) CNF-Podozyten vs. DDS- und Kontroll-Podozyten (NN)

Filter	Label	Gen	CNF / NN + DDS	
			FC $\geq 1,5$	p < 0,05
I	F11f	endothelin 2 (ET2)	2,80	8,55E-04
I	E10k	corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR; CRF1)	2,33	4,44E-02
I	C14i	BCL2/adenovirus E1B 19-kDa-interacting protein 3 (BNIP3; NIP3)	2,24	3,16E-02
III	C02c	FIBULIN 1 ISOFORM C	2,15	2,86E-04
I	C05j	death-associated protein kinase 1 (DAPK1)	1,87	2,70E-03
III	F04d	F-ACTIN CAPPING PROTEIN BETA SUBUNIT (CAPZ)	1,72	1,79E-04
I	C12e	zyxin 2 (ZYX)	1,69	5,42E-02
I	F07g	platelet-derived growth factor A subunit (PDGFA; PDGF1)	1,67	2,53E-02
III	E05k	GREMLIN	1,58	3,87E-03
I	C02h	CD40 receptor-associated factor 1 (CRAF1); TRAF3	1,57	3,46E-02
III	B06k	MUCOSAL ADDRESSIN CELL ADHESION MOLECULE 1 (MADCAM-1)	1,56	1,31E-02
I	D06d	GABA-B receptor 2 subunit (GABA-BR2)	1,56	4,34E-02
I	C07m	nibrin (NBS1)	1,56	2,53E-02
I	E13j	platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFRB)	1,51	7,07E-03
II	D08a	tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3)	0,58	3,81E-02
I	F08g	leukemia inhibitory factor (LIF)	0,58	1,84E-02
I	A10c	c-jun proto-oncogene	0,55	1,67E-03
I	F05h	inhibin beta A subunit (INHBA)	0,55	8,55E-04
III	C01n	fibrillin 2	0,46	1,79E-04
I	A13k	sprouty 2 (SPRY2)	0,46	8,21E-05
I	A03h	G1/S-specific cyclin D1 (CCND1); bcl-1 oncogene	0,41	7,04E-04
I	D01b	growth arrest & DNA damage-inducible protein (GADD45)	0,41	8,55E-04
I	F12e	small inducible cytokine subfamily A member 2 (SCYA2)	0,23	1,04E-05
I	E10a	early growth response protein 1 (EGR1)	0,21	1,74E-08
I	D14k	activating transcription factor 3 (ATF3)	0,21	1,33E-07
I	F14g	interleukin 8 (IL8)	0,14	6,83E-05
I	F10g	macrophage inflammatory protein 2 alpha (MIP2A); CXCL2	0,10	3,64E-11
I	F13i	interleukin 6 (IL6); interferon beta 2 (IFNB2)	0,08	1,76E-08

Tabelle 5.10: CNF-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

d) Podozyten vs. Mesangium

Bei dem Vergleich der Podozyten mit den Mesangiumzellen sind insgesamt 40 Gene ($FC \geq 3,0$; $p < 0,001$) differentiell exprimiert. Davon sind 12 in den Podozyten und 28 in den Mesangiumzellen höher exprimiert. Die in Tabelle 5.11 aufgeführten Gene wurden nach den größten Expressionsunterschieden und schon bekannter Lokalisation in der Niere ausgewählt.

Filter	Label	Gene	Podozyten/ Mesangium	
			FC $\geq 3,0$	p < 0,001
I	F14l	Kunitz-type serine protease inhibitor 2 (SPINT2)	9,47	1,38E-08
I	E13h	integrin beta 3 (ITGB3)	6,37	1,44E-04
II	B05j	natural killer cells protein 4 (NK4)	6,21	7,82E-06
I	D14n	paired box protein 8 (PAX8)	5,83	6,49E-07
II	C14e	annexin III (ANX3)	4,60	3,94E-07

Filter	Label	Gene	Podozyten/ Mesangium	
			FC \geq 3,0	p < 0,001
II	C02f	secreted phosphoprotein 1 (SSP1); osteopontin (OPN)	3,66	9,88E-04
II	A02j	endoglin (ENG; END)	0,29	9,60E-07
I	F03g	vascular endothelial growth factor C (VEGFC)	0,28	2,14E-06
III	B06b	INTEGRIN BINDING PROTEIN DEL-1	0,27	3,03E-07
I	F13m	cathepsin D (CTSD)	0,26	3,28E-05
I	E13j	platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFRB)	0,25	7,68E-06
III	C01m	collagen VI alpha 1 subunit (COL6A1)	0,21	3,55E-07
III	B05m	OSTEOBLAST SPECIFIC FACTOR 2 (OSF2)	0,21	2,14E-08
I	F08f	fibroblast growth factor 7 (FGF7)	0,18	6,51E-06
II	E14j	regulator of G protein signaling 4 (RGS4; RGP4)	0,17	2,32E-09
III	B06d	NIDOGEN 2 (NID2) (OSTEONIDOGEN)	0,17	1,23E-06
I	E08i	fibronectin receptor alpha subunit (FNRA); integrin alpha 5 (ITGA5)	0,17	6,27E-05
I	F06n	tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2)	0,16	5,23E-08
II	C02j	Lumican (LUM)	0,16	4,13E-07
I	A11g	matrix metalloproteinase 11 (MMP11)	0,15	6,08E-07
I	F05n	tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1)	0,14	2,99E-05
III	E05k	GREMLIN	0,12	1,72E-06
I	E11g	Decorin (DCN)	0,11	2,00E-06
I	F03m	matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	0,08	4,29E-06
I	F06d	insulin-like growth factor II (IGF2)	0,06	8,10E-11
I	E01g	osteoblast specific factor 2 (OSF2)	0,05	2,36E-11

Tabelle 5.11: Expressionsunterschiede zwischen Podozyten und Mesangiumzellen. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

5.3.2 Affymetrix Arrays

Mit Hilfe des hier verwendeten GeneChip Human Genome U133A-Array können die Expressionslevel von 18400 Transkripten und deren Varianten analysiert werden, die ca. 14500 gut bekannte humane Gene repräsentieren. Ein Array besteht aus mehr als 22000 „Probe Sets“, deren Oligonukleotid-Länge 25 Basen beträgt und eine multiple Bestimmung jedes Transkriptes erlaubt. Zusätzlich ist eine große Zahl an Kontroll-Sequenzen vorhanden, die in Tabelle 5.12 zusammengefasst sind.

Kontrollsequenzen	
Hybridisierungs-Kontrollen	bioB, bioC, bioD, cre
Poly-A-Kontrollen	dap, lys, phe, thr
Normalisierungs-Kontrollset	100 „Probe-Sets“
Houskeeping-/Kontrollgene	GAPDH, beta-Aktin, ISGF-3 (STAT1)

Tabelle 5.12: Kontrollsequenzen der GeneChip Human Genome Arrays (Affymetrix). Die Funktion wird im Text erklärt (siehe Seite 84f).

Der Ablauf der Untersuchung ist kurz in Abbildung 5.14 dargestellt und näher im Methodenteil unter 4.5.2 beschrieben.

Es wurden die Expressionsprofile zweier Podozytenkulturen nicht erkrankter Personen (NN, = Kontroll-Podozyten), dreier DDS-Kulturen (DDS) und einer CNF-Kultur (CNF) erstellt. In Tabelle 5.13 sind die verwendeten Proben zusammengefasst.

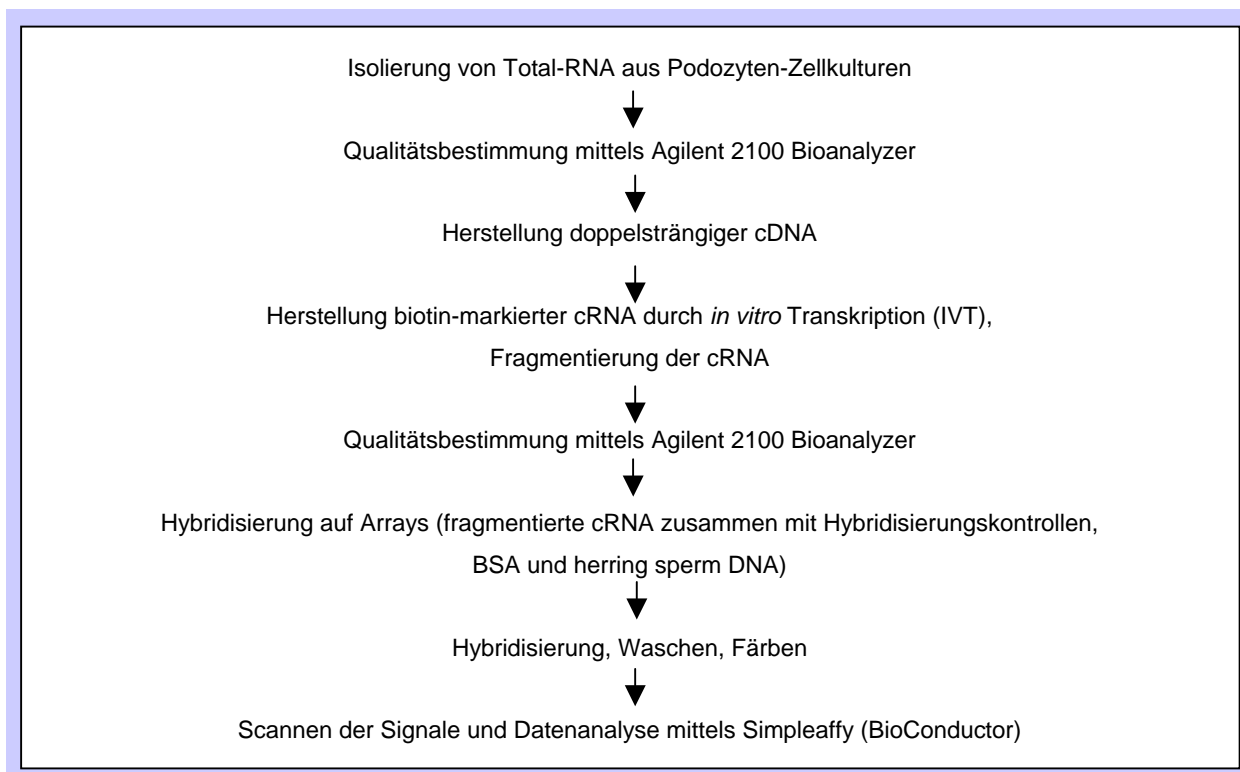


Abbildung 5.14: Ablauf der Array-Analyse nach der Affymetrix-Methode.

Zellen	Passage	
NN	N13	P19
	MD283r	P4
CNF	97-1	P3
DDS	N90	P3
	N100/2	P2
	DDS16	P2

Tabelle 5.13: Zellkulturmaterial für Affymetrix-Arrays. NN = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten von einem Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Die Qualität der RNAs wurde mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer bestimmt (siehe Abbildung 5.15, vergleiche Ergebnisse 5.3.1).

Da viele der Podozyten-Zellkulturen nur sehr schlecht proliferierten, wurde von allen Zellkulturen nur je eine IVT-Reaktion durchgeführt und ein Chip hybridisiert. Im Gegensatz zu den Clontech-Arrays standen hier aber die Podozytenkulturen von zwei Kontrollen, drei DDS-Patienten sowie eines CNF-Patienten zur Verfügung. In die Erststrang-Synthese wurden zwischen 4 und 8 µg Total-RNA eingesetzt und dann, wie im Methodenteil unter 4.5.2 beschrieben, fortgefahren. Um genug Probenmaterial für die Erstellung der Expressionsprofile zu erhalten (15 µg), wurde die RNA mittels der T7-RNA-Polymerase amplifiziert.

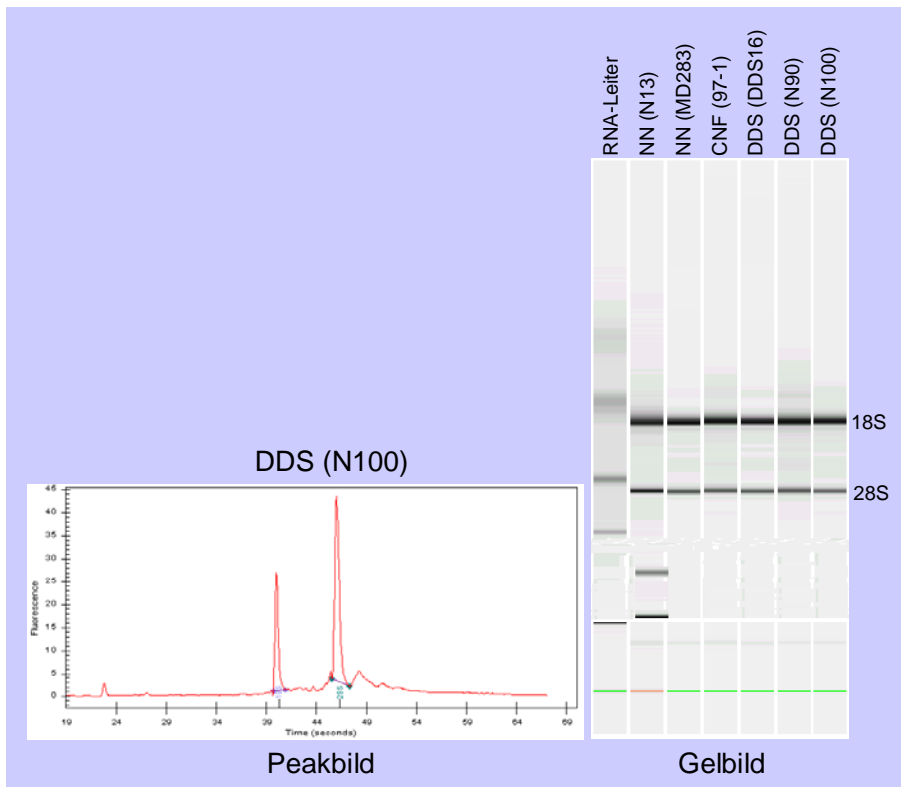


Abbildung 5.15: Qualitätsbestimmung der RNA mittels Bioanalyser. Dargestellt ist das Peakprofil am Beispiel der N100-Podozyten und das Gelbild aller verwendeter Proben. NN = Podozyten von nicht erkrankten Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten von einem Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

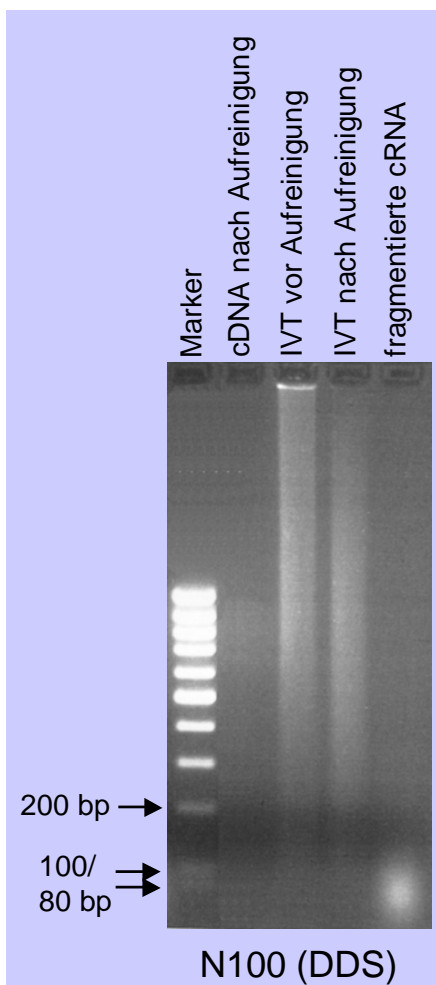


Abbildung 5.16: Qualitätsbestimmung der doppelsträngigen cDNA, der IVT-Produkte und der fragmentierten cRNA am Beispiel der N100-Podozyten auf einem 3 %igen TAE-Agarosegel. DDS = Podozyten eines Denys-Drash Patienten. Größenmarker: MassRuler DNA Ladder, Low Range von MBI Fermentas. Erklärung im Text.

Die Qualität und Größe der aufgereinigten doppelsträngigen cDNA, das nicht-aufgereinigte und das aufgereinigte IVT-Produkt sowie die fragmentierte cRNA wurden anschließend auf einem Gel überprüft (siehe Abbildung 5.16). Die Hauptgröße der fragmentierten RNA lag im Bereich von 35 und 200 Bp, wobei sich der Hauptpeak zwischen 80 und 100 Bp befand.

Zusätzlich wurde die Qualität und die Menge der unfragmentierten cRNA mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker bestimmt. Dabei sollte im Elektropherogramm die Nukleotidgröße ihr Maximum bei 1580 Nukleotiden haben. Das in Abbildung 5.17 dargestellte Elektropherogramm zeigt beispielhaft die Probe der N13-Podozyten. Diese besitzt ein Maximum zwischen 2000 und 6000 Nukleotiden. Aufgrund des Materialmangels konnte die Herstellung dieser Probe nicht wiederholt werden.

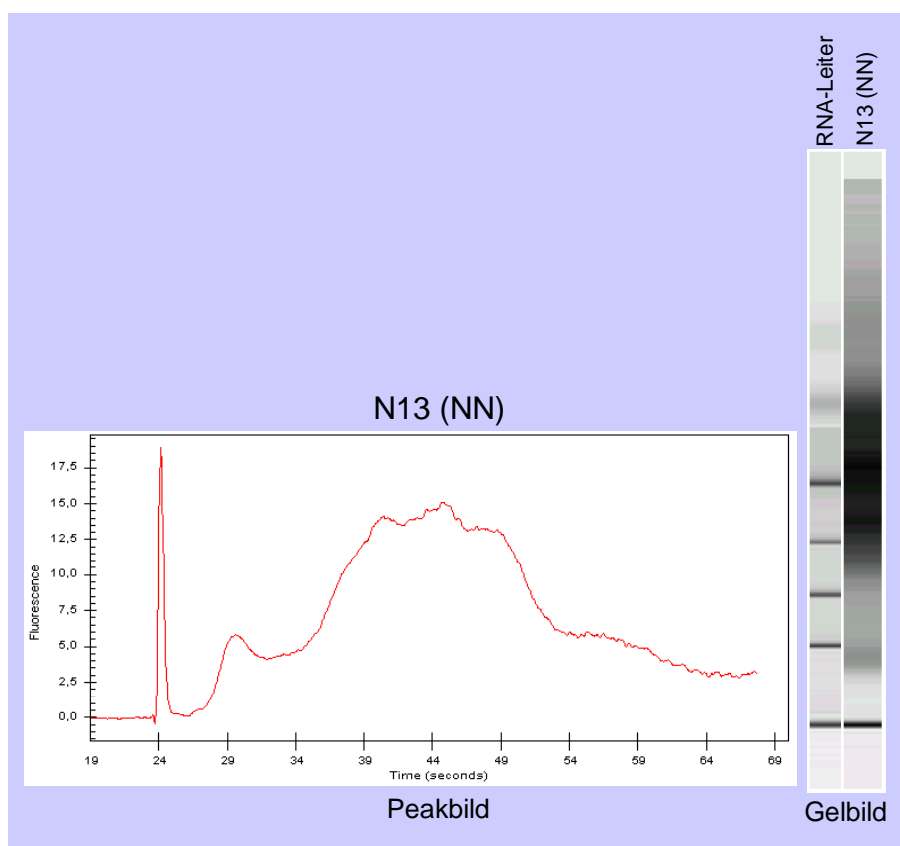


Abbildung 5.17: Qualitätsbestimmung der unfragmentierten cRNA am Beispiel der N13-Podozyten. RNA-Leiter von unten nach oben gelesen: 0,2/0,5/1,0/2,0/4,0/6,0 kB. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person.

Die Reinheit der cRNA wurde über ein Spektrometer bestimmt und lag im Bereich von $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$. Verhältnisse unter 1,8 sprechen für eine Kontamination mit Proteinen und über 2,1 für verkürzte cRNA-Transkripte und/oder freie Nukleotide. Die Bestimmung der Gesamt-cRNA-Menge erfolgte über folgende Formel:

$$\text{cRNA-Menge} = \text{RNA}_m - (\text{Total-RNA}_i) \cdot (y)$$

RNA_m = Menge an cRNA nach IVT (μg)

Total-RNA_i = Start-Menge an Total-RNA (μg)

y = Menge der cDNA-Reaktion, die in die IVT eingesetzt wurde

Es wurden insgesamt 15 µg cRNA in die Fragmentierungsreaktionen eingesetzt. Nach der Fragmentierung erfolgte im Institut für Onkologische Chemie die Hybridisierung der fragmentierten cRNA auf den Chip, sowie das Waschen, Färben und Scannen, da dort die benötigten Geräte und Reagenzien zur Verfügung standen.

Es gibt verschiedene Anhaltspunkte, anhand derer die Qualität der Hybridisierung und der verwendeten RNA-Probe geprüft werden kann (vergleiche Methoden 4.5.3, siehe Tabelle 5.12):

a) Inspektion des Array-Bildes („dat file“)

Zu beachten sind hier Bildartefakte, wie z.B. hohe/geringe Intensitätsspot, Kratzer, hoher regionaler oder gesamter Hintergrund.

b) B2 Oligo-Hybridisierung („dat file“)

Die B2-Oligos werden dem Hybridisierungsmix (d.h. der fragmentierten cRNA) zugemischt und dienen als positive Hybridisierungskontrolle. Eine Hybridisierung findet man entlang des ganzen Arrayrandes, als spezifisches Muster in den Ecken sowie in Form des Array-Namen.

c) Hintergrund/ Rauschen („rpt file“)

Von Affymetrix liegen die vorgeschriebenen Hintergrundswerte zwischen 20 und 100. Arrays, die miteinander verglichen werden, sollten vergleichbare Hintergrundwerte besitzen. Das Rauschen beschreibt die Pixel-Pixel-Variation der sogenannten „probe cells“. Darin fließen das elektrische Rauschen des Scanners sowie die Qualität der Probe ein. Auch hier sollten die Werte der Arrays untereinander vergleichbar sein.

d) Hybridisierungskontrollen *bioB*, *bioC*, *bioD* und *cre* („rpt file“)

Die Gene stammen aus dem Biotin-Synthese-Pathway von *E. coli* und werden dem Hybridisierungsmix in verschiedenen Konzentrationen beigefügt. Sie sind im Gegensatz zu den B2 Oligos unabhängig von der Proben-Präparation und dienen deshalb zur Bestimmung der Hybridisierungseffizienz der Probe auf eukaryotischen Arrays. *BioB*, dessen Konzentration an der unteren Nachweisgrenze liegt, sollte in 50 % aller Arrays vorhanden (=„present“) sein. Die anderen drei, die in höheren Konzentrationen vorliegen, sollten immer detektierbar sein.

e) Interne Kontrollgene („rpt file“)

Mit den Genen *beta-Aktin* und *GAPDH* kann die Qualität der RNA-Probe festgestellt werden. Dazu werden die „signal values“ des 3′-Probensets für *Aktin* und *GAPDH* mit den „signal values“ der dazugehörigen 5′-Probensets verglichen. Das Verhältnis 3′/5′ sollte den Wert 3 nicht überschreiten, da dies ansonsten für degradierte RNA oder für eine ineffiziente Transkription der dsDNA bzw. der biotinylierten cRNA sprechen kann.

f) Anzahl an Genen, die detektierbar (=„present,“) sind („rpt file“)

Die Anzahl der detektierbaren „probe sets“ relativ zur Gesamtzahl der „probe sets“ ist von

vielen Faktoren wie Zell-/Gewebstyp, biologische- oder umweltbedingte Stimuli, Arraytyp und auch der Qualität der RNA abhängig. Der Wert sollte bei allen zu vergleichenden Arrays ähnlich sein. Ein geringer Wert könnte für eine schlechte Qualität der Probe sprechen.

g) Skalierungsfaktoren/ Normalisierungsfaktoren („rpt file“)

Bei der Mehrzahl der Experimente, bei denen sich nur ein kleiner Teil der Transkripte zwischen den Proben ändert, sollte die Gesamtintensität der Arrays ähnlich sein. Unterschiede liegen meist an Pipettierfehlern, Hybridisierung, Waschen und Färben, die alle unabhängig von der relativen Transkriptkonzentration sind. Diese Faktoren sollten zwischen verschiedenen Arrays vergleichbar sein. Größere Diskrepanzen, d. h. > 2-fach, sprechen für eine signifikante Variabilität der Versuche oder für die Degradierung einer Probe, die zu mehr Rauschen führt.

Die in Tabelle 5.14 zusammengefassten Qualitätsmerkmale sprechen für eine sehr gute Qualität der Proben, der Hybridisierung und der Chips. Die in Tabelle 5.12 (siehe Seite 80) aufgeführten Poly-A-Kontrollen, die normalerweise auch dem Hybridisierungsmix beigemischt werden, wurden hier nicht verwendet.

Qualitätsmerkmale Array		NN		CNF	DDS		
		N13	MD283	97-1	N90	N100	DDS16
Bild-Artefakte		nein	nein	nein	nein	nein	nein
B2 Oligo-Hybridisierung	Rand	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
	Ecke	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
	Arrayname	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
Hintergrund		86.18	81.05	57.13	63.27	87.14	86.66
Rauschen		3.170	2.930	2.470	2.670	2.950	3.180
Hybridisierungs-Kontrollen	bioB (5'/M'/3')	P/P/P	P/P/A	P/P/P	P/M/P	P/P/P	P/P/A
	bioC (5'/3')	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P
	bioD (5'/3')	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P
	cre (5'/3')	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P	P/P/P
Interne Kontrollgene (3'/5'-Verhältnis)	beta-Aktin	0.96	1.11	0.85	0.88	0.86	1.02
	GAPDH	0.89	0.80	0.87	0.83	0.86	0.79
% Gene "present"		52.7	50.5	49.9	48.8	48.5	51.1
Skalierungsfaktor		0.405	0.412	0.525	0.500	0.535	0.382
Normalisierungsfaktor		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabelle 5.14: Zusammenfassung der Qualitätsmerkmale der Arrayanalysen. Erklärung im Text. P = „present“. M = „marginal“. A = „absent“. NN = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten von einem Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Die genaue Quantifizierung der Signale, die die Expressionsstärke der Gene darstellen, erfolgte über Simpleaffy, ein Software-Paket von BioConductor. Die p-Werte wurden mit Hilfe des RMA-Algorithmus ermittelt (siehe Methoden 4.5.3), da der in Abbildung 5.18 dargestellte Scatterplot der beiden Podozyten-Zellkulturen N13 und MD283 eine bessere Normalisierung durch den RMA-Algorithmus gegenüber des von Affymetrix verwendeten MAS 5.0 Algorithmus aufzeigte. Erst wenn mindestens ein Unterschied von Faktor zwei in der Signalstärke zwischen den unterschiedlichen Proben zu beobachten war, wurde eine differentielle Genexpression in Erwägung gezogen.

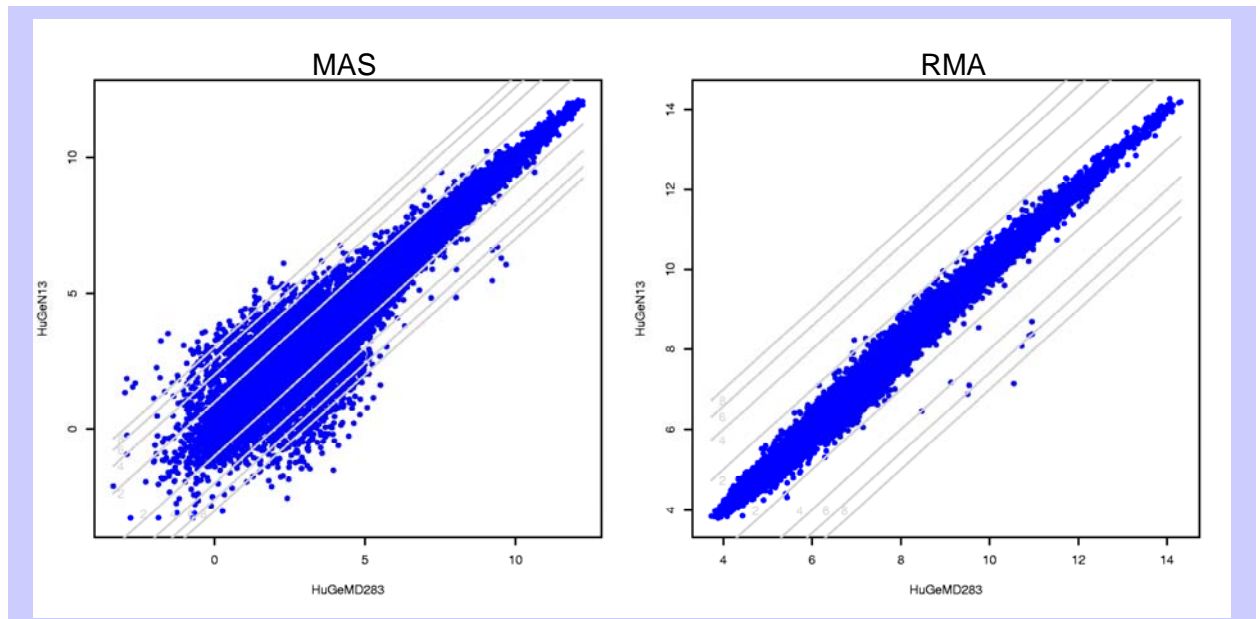


Abbildung 5.18: Scatterplot der beiden Zellkultur-Podozyten N13 und MD283 nach dem MAS- bzw. dem RMA-Algorithmus.

Die Array-Analysen führten zu sehr großen Datenmengen, die deshalb in dieser Arbeit nur in Auszügen wiedergegeben werden können. Listen mit ausgewählten Daten finden sich im Anschluss bei dem Vergleich der folgenden Expressionsdaten (vergleiche auch Seite 75):

- a) DDS-Podozyten vs. CNF- und Kontroll-Podozyten (DDS-spezifische Gene)
- b) Kontroll-Podozyten vs. DDS- und CNF-Podozyten (NS-spezifische Gene)
- c) CNF-Podozyten vs. DDS- und Kontroll-Podozyten (CNF-spezifische Gene)

Der Vergleich der CNF-Podozyten zu den Kontroll- und DDS-Podozyten ist nur bedingt aussagekräftig, da auch hier nur eine CNF-Kultur zur Verfügung stand. Hier zeigen die Ergebnisse wieder nur eine Richtung auf und müssen in Zukunft durch die Analyse weiterer Proben vervollständigt bzw. mit den Ergebnissen der Clontech-Arrays verglichen werden.

Die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene bei den einzelnen Vergleichen ist in Abbildung 5.19 zusammengefasst. Insgesamt wurden 142 DDS-spezifische ($FC \geq 2,0$;

$p < 0,05$), 111 CNF-spezifische ($FC \geq 2,0$) und 917 NS-spezifische ($FC \geq 2,0$; $p < 0,05$) Gene gefunden, wobei es auch hier zwischen den einzelnen Auswertungen aufgrund der Festlegung

der p-Wert-Grenze zu Überschneidungen kommt.

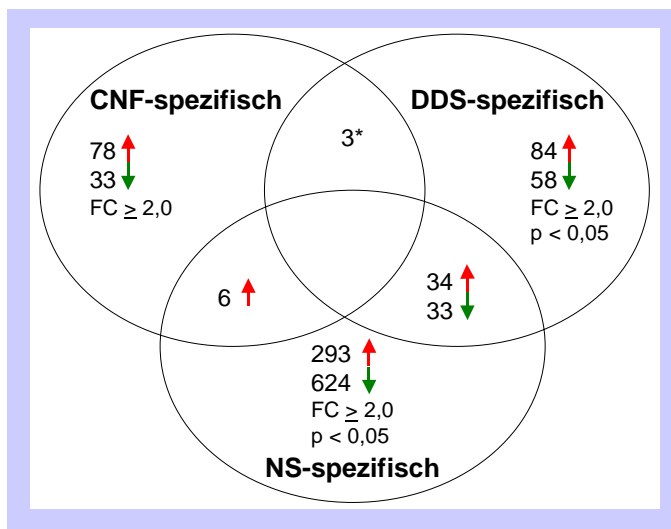


Abbildung 5.19: Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene der Affymetrix-Array Analysen. Erklärung im Text * = die drei Gene, die sich in der CNF- und DDS-Auswertung überschneiden, sind in unterschiedliche Richtungen exprimiert. FC = Expressionsunterschied. $p = p$ -Wert.

In den folgenden stark gekürzten Listen (siehe Tabellen 5.15 – 5.17) wurden die aufgeführten Gene nach den größten Unterschieden und ihrer biologischen Funktion ausgewählt.

a) DDS-Podozyten vs. CNF- und Kontroll-Podozyten (NN)

Probe Set	Gen		DDS / NN + CNF	
			FC ≥ 2	$p < 0,05$
202286_s_at	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	19,36	1,95E-03
202687_s_at	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	10,28	2,80E-02
201839_s_at	TACSTD1	tumor-associated calcium signal transducer 1	8,83	1,18E-02
206336_at	CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	6,01	3,02E-02
205113_at	NEF3	neurofilament 3 (150kDa medium)	4,83	3,64E-02
206758_at	EDN2	endothelin 2	4,66	4,63E-04
213974_at	ADAMTSL3	ADAMTS-like 3	4,11	6,16E-04
33323_r_at	SFN	stratifin	4,08	2,36E-02
208083_s_at	ITGB6	integrin, beta 6	4,02	4,95E-03
207943_x_at	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	3,84	4,37E-02
202510_s_at	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	3,50	6,98E-03
205730_s_at	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3	3,36	2,78E-02
203908_at	SLC4A4	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	3,11	1,36E-02
205207_at	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	2,94	1,73E-02
205799_s_at	SLC3A1	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	2,94	4,03E-03
203120_at	TP53BP2	tumor protein p53 binding protein, 2	2,75	1,22E-02
202638_s_at	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	2,74	3,31E-02
201627_s_at	INSIG1	insulin induced gene 1	2,71	1,01E-02
204803_s_at	RRAD	Ras-related associated with diabetes	2,62	4,52E-03
201428_at	CLDN4	claudin 4	2,57	2,05E-02

Probe Set	Gen		DDS / NN + CNF	
			FC \geq 2	p < 0,05
206421_s_at	SERPINB7	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	2,52	3,25E-03
205234_at	SLC16A4	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	2,43	2,78E-02
210827_s_at	ELF3	E74-like factor 3 (ets domain transcription factor, epithelial-specific)	2,43	3,93E-02
202237_at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	2,39	1,33E-02
204802_at	RRAD	Ras-related associated with diabetes	2,38	6,27E-04
202790_at	CLDN7	claudin 7	2,37	2,14E-02
208650_s_at	CD24	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	2,36	4,99E-02
209499_x_at	TNFSF12- TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12- member 13	2,27	3,25E-02
203139_at	DAPK1	death-associated protein kinase 1	2,26	5,22E-03
203685_at	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	2,26	3,25E-02
221805_at	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	2,25	2,81E-03
221578_at	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4	2,24	2,79E-02
200920_s_at	BTG1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	2,23	2,83E-02
205980_s_at	ARHGAP8	Rho GTPase activating protein 8	2,20	3,34E-02
206167_s_at	ARHGAP6	Rho GTPase activating protein 6	2,14	4,35E-03
207517_at	LAMC2	laminin, gamma 2	2,11	2,32E-02
208460_at	GJA7	gap junction protein, alpha 7, 45kDa (connexin 45)	2,04	1,51E-04
204442_x_at	LTBP4	latent transforming growth factor beta binding protein 4	2,03	4,51E-02
209500_x_at	TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	2,00	4,77E-04
206467_x_at	TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	1,97	1,12E-02
214701_s_at	FN1	fibronectin 1	0,51	3,65E-02
202499_s_at	SLC2A3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	0,50	1,40E-02
210790_s_at	SARA1	SAR1a gene homolog 1 (S. cerevisiae)	0,49	3,79E-02
209094_at	DDAH1	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	0,48	3,21E-03
206157_at	PTX3	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	0,47	1,45E-02
212256_at	GALNT10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	0,46	1,20E-02
203349_s_at	ETV5	ets variant gene 5 (ets-related molecule)	0,46	3,64E-02
204589_at	ARK5	AMP-activated protein kinase family member 5	0,46	2,54E-02
208893_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0,44	4,89E-04
208711_s_at	CCND1	cyclin D1 (PRAD1	0,42	1,63E-02
201565_s_at	ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	0,41	2,44E-02
218585_s_at	RAMP	RA-regulated nuclear matrix-associated protein	0,39	2,52E-02
201508_at	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	0,39	3,10E-02
203417_at	MFAP2	microfibrillar-associated protein 2	0,34	4,03E-04
201069_at	MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	0,34	1,33E-02
205003_at	DOCK4	dedicator of cytokinesis 4	0,34	5,51E-05
209101_at	CTGF	connective tissue growth factor	0,30	8,68E-03
204464_s_at	EDNRA	endothelin receptor type A	0,28	4,80E-03
201667_at	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	0,27	2,81E-02
201150_s_at	TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	0,26	3,16E-02
204612_at	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	0,25	2,42E-02
210605_s_at	MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein	0,25	2,99E-02
218468_s_at	GREM1	gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	0,24	2,09E-02
204475_at	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0,24	2,99E-02
221729_at	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	0,22	2,15E-03
204337_at	RGS4	regulator of G-protein signalling 4	0,22	5,23E-04

Probe Set	Gen		DDS / NN + CNF	
			FC \geq 2	p < 0,05
203889_at	SGNE1	secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein)	0,19	2,71E-02
219935_at	ADAMTS5	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	0,18	2,69E-02
208892_s_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0,17	1,22E-02
207173_x_at	CDH11	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	0,13	7,67E-04

Tabelle 5.15: DDS-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

b) CNF-Podozyten vs. Kontroll (NN)- und DDS-Podozyten

Probe Set	Gen		CNF / NN + DDS	
			FC \geq 2,0	
209990_s_at	GPR51	G protein-coupled receptor 51	12,18	
212488_at	COL5A1	collagen, type V, alpha 1	6,11	
205290_s_at	BMP2	bone morphogenetic protein 2	5,06	
214520_at	FOXC2	forkhead box C2 (MFH-1, mesenchyme forkhead 1)	4,35	
203889_at	SGNE1	secretory granule, neuroendocrine protein 1 (7B2 protein)	4,33	
201438_at	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	4,33	
206204_at	GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	4,24	
218469_at	GREM1	gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (<i>Xenopus laevis</i>)	4,24	
217077_s_at	GPR51	G protein-coupled receptor 51	4,18	
216005_at	TNC	tenascin C (hexabrachion)	3,87	
202404_s_at	COL1A2	collagen, type I, alpha 2	3,81	
221009_s_at	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	3,73	
201667_at	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	3,67	
209765_at	ADAM19	a disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	3,48	
201801_s_at	SLC29A1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	3,38	
201893_x_at	DCN	decorin	3,33	
205990_s_at	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A	3,26	
211003_x_at	TGM2	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	3,16	
212091_s_at	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	3,12	
201744_s_at	LUM	lumican	3,07	
201185_at	PRSS11	protease, serine, 11 (IGF binding)	3,02	
201860_s_at	PLAT	plasminogen activator, tissue	3,00	
209946_at	VEGFC	vascular endothelial growth factor C	2,94	
209763_at	CHRD1	chordin-like 1	2,72	
209884_s_at	SLC4A7	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7	2,62	
209789_at	CORO2B	coronin, actin binding protein, 2B	2,57	
211756_at	PTH1H	parathyroid hormone-like hormone	2,57	
205289_at	BMP2	bone morphogenetic protein 2	2,45	
211876_x_at	PCDHGA11	protocadherin gamma subfamily A, 11	2,38	
204396_s_at	GRK5	G protein-coupled receptor kinase 5	2,37	
216352_x_at	PCDHGA3	protocadherin gamma subfamily A, 3	2,33	
33767_at	NEFH	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	2,31	
204751_x_at	DSC2	desmocollin 2	2,28	
218638_s_at	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	2,15	
204457_s_at	GAS1	growth arrest-specific 1	2,12	
205924_at	RAB3B	RAB3B, member RAS oncogene family	2,09	
217279_x_at	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	2,02	

Probe Set	Gen		CNF / NN + DDS
			FC \geq 2,0
203964_at	NMI	N-myc (and STAT) interactor	0,50
201559_s_at	CLIC4	chloride intracellular channel 4	0,49
213085_s_at	KIBRA	KIBRA protein	0,49
208727_s_at	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	0,48
209267_s_at	SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	0,48
214175_x_at	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4	0,48
203275_at	IRF2	interferon regulatory factor 2	0,46
200864_s_at	RAB11A	RAB11A, member RAS oncogene family	0,45
202085_at	TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	0,43
212445_s_at	NEDD4L	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	0,43
203726_s_at	LAMA3	laminin, alpha 3	0,43
202546_at	VAMP8	vesicle-associated membrane protein 8 (endobrevin)	0,42
200783_s_at	STMN1	stathmin 1/oncoprotein 18	0,42
200706_s_at	LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	0,42
213979_s_at	CTBP1	C-terminal binding protein 1	0,38
209369_at	ANXA3	annexin A3	0,30

Tabelle 5.16: CNF-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied.

c) DDS-und CNF-Podozyten (=NS) vs. Kontroll-Podozyten (NN)

Probe Set	Gen		NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 4,0	p < 0,05
202310_s_at	COL1A1	collagen, type I, alpha 1	57,30	5,30E-04
211959_at	IGFBP5	insulin-like growth factor binding protein 5	23,20	7,15E-03
212143_s_at	IGFBP3	insulin-like growth factor binding protein 3	20,21	1,80E-05
210869_s_at	MCAM	melanoma cell adhesion molecule	17,85	5,14E-04
206924_at	IL11	interleukin 11	12,70	1,08E-02
206336_at	CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (granulocyte chemotactic protein 2)	9,41	3,89E-03
202997_s_at	LOXL2	lysyl oxidase-like 2	9,39	1,44E-03
202833_s_at	SERPINA1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	9,19	1,26E-04
203868_s_at	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	8,68	9,63E-05
207002_s_at	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	8,44	6,26E-04
221950_at	EMX2	empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	8,08	3,91E-03
209098_s_at	JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)	7,40	4,20E-03
214974_x_at	CXCL5	chemokine (C-X-C motif) ligand 5	7,38	7,69E-04
205113_at	NEF3	neurofilament 3 (150kDa medium)	7,18	4,86E-03
201506_at	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	7,03	1,56E-02
203821_at	DTR	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	6,95	3,64E-04
203951_at	CNN1	calponin 1, basic, smooth muscle	6,76	8,94E-03
204933_s_at	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	6,16	1,18E-02
210512_s_at	VEGF	vascular endothelial growth factor	6,14	2,37E-03
206025_s_at	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	5,94	1,84E-04
205646_s_at	PAX6	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)	5,71	8,43E-04
204368_at	SLCO2A1	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	5,30	1,02E-03
202150_s_at	NEDD9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9	4,90	4,04E-05

Probe Set	Gen		NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 4,0	p < 0,05
218574_s_at	LMCD1	LIM and cysteine-rich domains 1	4,79	3,14E-05
204259_at	MMP7	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	4,56	3,40E-03
206893_at	SALL1	sal-like 1 (Drosophila)	4,50	6,63E-04
205730_s_at	ABLIM3	actin binding LIM protein family, member 3	4,23	5,08E-03
200986_at	SERPING1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)	4,20	5,35E-03
205978_at	KL	klotho	4,10	9,61E-04
49306_at	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 4	4,01	5,81E-03
209278_s_at	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	3,89	1,13E-02
212190_at	SERPINE2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	3,84	6,50E-04
202935_s_at	SOX9	SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	3,76	3,41E-03
216627_s_at	B4GALT1	UDP-Gal	3,75	5,10E-04
221748_s_at	TNS	tensin	3,65	3,26E-04
213428_s_at	COL6A1	collagen, type VI, alpha 1	3,60	2,82E-03
207233_s_at	MITF	microphthalmia-associated transcription factor	3,44	1,72E-04
201849_at	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	3,40	2,23E-03
210973_s_at	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)	3,40	1,44E-02
201744_s_at	LUM	lumican	3,17	3,17E-02
207595_s_at	BMP1	bone morphogenetic protein 1	3,07	1,90E-02
209457_at	DUSP5	dual specificity phosphatase 5	3,01	3,80E-03
204200_s_at	PDGFB	platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog)	2,96	5,23E-04
201625_s_at	INSIG1	insulin induced gene 1	2,95	2,89E-02
205799_s_at	SLC3A1	solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	2,87	1,97E-02
202638_s_at	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	2,86	3,77E-02
219911_s_at	SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	2,82	1,63E-02
213843_x_at	SLC6A8	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	2,76	7,82E-04
209260_at	SFN	stratifin	2,72	4,44E-02
222162_s_at	ADAMTS1	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	2,68	2,90E-04
207543_s_at	P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	2,68	1,76E-05
201428_at	CLDN4	claudin 4	2,62	9,56E-03
213258_at	TFPI	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	2,58	3,34E-02
212110_at	SLC39A14	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	2,56	1,05E-04
205234_at	SLC16A4	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 4	2,54	1,85E-02
221479_s_at	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like	2,53	2,04E-03
202733_at	P4HA2	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	2,47	1,94E-04
211981_at	COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	2,45	1,43E-03
204803_s_at	RRAD	Ras-related associated with diabetes	2,44	2,51E-02
201645_at	TNC	tenascin C (hexabrachion)	2,40	1,86E-02
207298_at	SLC17A3	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	2,38	2,82E-03
205975_s_at	HOXD1	homeo box D1	2,34	2,52E-03
213823_at	HOXA11	homeo box A11	2,34	7,24E-04
209499_x_at	TNFSF12- TNFSF13	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12- member 13	2,31	3,77E-02
213260_at	FOXC1	forkhead box C1	2,30	2,59E-04
205366_s_at	HOXB6	homeo box B6	2,27	6,53E-03

Probe Set	Gen		NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 4,0	p < 0,05
208191_x_at	PSG4	pregnancy specific beta-1-glycoprotein 4	2,27	1,64E-02
200827_at	PLOD1	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase (lysine hydroxylase, Ehlers-Danlos syndrome type VI)	2,25	4,93E-02
204983_s_at	GPC4	glypican 4	2,21	1,33E-03
218404_at	SNX10	sorting nexin 10	2,19	2,76E-02
200982_s_at	ANXA6	annexin A6	2,19	3,80E-02
207113_s_at	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	2,18	2,83E-02
221805_at	NEFL	neurofilament, light polypeptide 68kDa	2,17	2,08E-02
202765_s_at	FBN1	fibrillin 1 (Marfan syndrome)	2,16	2,53E-04
207517_at	LAMC2	laminin, gamma 2	2,15	1,90E-02
205409_at	FOSL2	FOS-like antigen 2	2,14	2,58E-02
202403_s_at	COL1A2	collagen, type I, alpha 2	2,13	3,34E-02
218237_s_at	SLC38A1	solute carrier family 38, member 1	2,13	4,81E-03
202856_s_at	SLC16A3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	2,13	3,43E-02
202827_s_at	MMP14	matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)	2,12	1,34E-02
201250_s_at	SLC2A1	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), 1	2,11	9,95E-04
206228_at	PAX2	paired box gene 2	2,10	5,11E-04
204626_s_at	ITGB3	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	2,09	1,44E-03
206237_s_at	NRG1	neuregulin 1	2,08	2,24E-02
203304_at	BAMBI	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (Xenopus laevis)	2,07	1,81E-02
203890_s_at	DAPK3	death-associated protein kinase 3	2,04	1,30E-02
206467_x_at	TNFRSF6B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy	2,04	1,15E-02
33767_at	NEFH	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	2,04	3,04E-02
218638_s_at	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein	2,03	3,83E-02
215812_s_at	SLC6A10	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 10	2,01	1,30E-02
213150_at	HOXA10	homeo box A10	1,99	3,32E-02
214581_x_at	TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	1,98	4,41E-02
213400_s_at	TBL1X	transducin (beta)-like 1X-linked	1,98	1,12E-02
208916_at	SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	1,96	1,71E-02
202284_s_at	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	0,50	4,22E-03
200965_s_at	ABLIM1	actin binding LIM protein 1	0,50	4,04E-02
216973_s_at	HOXB7	homeo box B7	0,50	2,08E-02
208796_s_at	CCNG1	cyclin G1	0,50	3,40E-02
213844_at	HOXA5	homeo box A5	0,48	8,01E-04
203418_at	CCNA2	cyclin A2	0,47	2,11E-02
214587_at	COL8A1	collagen, type VIII, alpha 1	0,47	4,95E-03
205014_at	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	0,47	7,50E-04
208944_at	TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	0,47	2,98E-03
203417_at	MFAP2	microfibrillar-associated protein 2	0,45	3,14E-02
204011_at	SPRY2	sprouty homolog 2 (Drosophila)	0,45	3,78E-04
212907_at	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	0,45	5,46E-03
210674_s_at	PCDHAC2	protocadherin alpha subfamily C, 2	0,44	1,82E-03
212148_at	PBX1	pre-B-cell leukemia transcription factor 1	0,44	2,38E-02
208712_at	CCND1	cyclin D1 (PRAD1)	0,43	1,52E-03
203725_at	GADD45A	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	0,43	1,22E-04
217234_s_at	VIL2	villin 2 (ezrin)	0,42	1,23E-03
201565_s_at	ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	0,42	5,19E-03
219304_s_at	PDGFD	platelet derived growth factor D	0,42	1,69E-03
204422_s_at	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)	0,41	4,17E-02

Probe Set	Gen		NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 4,0	p < 0,05
209364_at	BAD	BCL2-antagonist of cell death	0,40	1,44E-02
203218_at	MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9	0,40	7,14E-04
202803_s_at	ITGB2	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1	0,40	4,20E-02
210118_s_at	IL1A	interleukin 1, alpha	0,39	5,13E-05
221729_at	COL5A2	collagen, type V, alpha 2	0,39	4,61E-02
209101_at	CTGF	connective tissue growth factor	0,38	2,90E-02
212843_at	NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	0,37	1,91E-04
203276_at	LMNB1	lamin B1	0,37	7,38E-04
202535_at	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	0,36	2,80E-05
204404_at	SLC12A2		0,36	2,06E-02
214710_s_at	CCNB1	cyclin B1	0,36	4,73E-03
204345_at	COL16A1	collagen, type XVI, alpha 1	0,35	1,26E-03
206067_s_at	WT1	Wilms tumor 1	0,35	5,22E-03
202704_at	TOB1	transducer of ERBB2, 1	0,35	1,00E-03
204464_s_at	EDNRA	endothelin receptor type A	0,34	1,71E-02
210248_at	WNT7A	wingless-type MMTV integration site family, member 7A	0,34	4,08E-03
208886_at	H1F0	H1 histone family, member 0	0,34	4,08E-02
202095_s_at	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	0,34	7,35E-03
200953_s_at	CCND2	cyclin D2	0,34	6,58E-04
205034_at	CCNE2	cyclin E2	0,33	1,42E-03
206295_at	IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	0,32	4,50E-04
210052_s_at	TPX2	TPX2, microtubule-associated protein homolog (Xenopus laevis)	0,32	2,05E-03
210559_s_at	CDC2	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	0,31	2,14E-03
202580_x_at	FOXM1	forkhead box M1	0,31	3,75E-02
217373_x_at	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	0,31	2,71E-04
209310_s_at	CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	0,31	1,99E-05
204114_at	NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	0,29	1,76E-04
214073_at	CTTN	cortactin	0,29	1,61E-04
205067_at	IL1B	interleukin 1, beta	0,28	5,65E-04
211368_s_at	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	0,28	3,74E-06
209714_s_at	CDKN3	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)	0,28	5,82E-03
204612_at	PKIA	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor alpha	0,27	5,58E-03
211506_s_at	IL8	interleukin 8	0,27	4,16E-04
210143_at	ANXA10	annexin A10	0,27	3,19E-04
210605_s_at	MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein	0,26	5,84E-03
201195_s_at	SLC7A5	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	0,26	2,39E-02
208850_s_at	THY1	Thy-1 cell surface antigen	0,26	2,50E-02
201150_s_at	TIMP3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	0,26	6,53E-03
215719_x_at	TNFRSF6	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	0,26	1,21E-03
204475_at	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0,26	5,77E-03
204082_at	PBX3	pre-B-cell leukemia transcription factor 3	0,25	5,87E-04
220115_s_at	CDH10	cadherin 10, type 2 (T2-cadherin)	0,25	6,89E-05
208891_at	DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0,24	1,12E-02
203493_s_at	KIAA0092	translokin	0,21	1,79E-03
201060_x_at	STOM	stomatin	0,21	2,78E-05
205347_s_at	TMSNB	thymosin, beta, identified in neuroblastoma cells	0,21	7,34E-05
201292_at	TOP2A	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0,20	4,56E-03

Probe Set	Gen		NS (DDS + CNF) / NN	
			FC \geq 4,0	p < 0,05
213110_s_at	COL4A5	collagen, type IV, alpha 5 (Alport syndrome)	0,19	2,71E-04
205399_at	DCAMKL1	doublecortin and CaM kinase-like 1	0,19	1,07E-06
213992_at	COL4A6	collagen, type IV, alpha 6	0,18	1,98E-02
219935_at	ADAMTS5	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	0,18	7,68E-03
217028_at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	0,18	1,06E-02
203184_at	FBN2	fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly)	0,17	9,44E-04
204989_s_at	ITGB4	integrin, beta 4	0,15	4,02E-02
204614_at	SERPINB2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	0,15	4,01E-02
203434_s_at	MME	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase, CALLA, CD10)	0,15	1,75E-03
203661_s_at	TMOD1	tropomodulin 1	0,14	4,75E-02
210538_s_at	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3	0,14	3,78E-03
204969_s_at	RDX	radixin	0,14	5,19E-06
204105_s_at	NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	0,13	2,63E-05
221589_s_at	ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0,12	7,84E-03
206987_x_at	FGF18	fibroblast growth factor 18	0,10	2,11E-04
213921_at	SST	somatostatin	0,10	2,74E-03
209937_at	TM4SF4	transmembrane 4 superfamily member 4	0,09	2,66E-06
211480_s_at	SLCO1A2	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	0,09	2,63E-05
219993_at	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	0,08	1,04E-04
201641_at	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	0,08	1,43E-05
205130_at	RAGE	renal tumor antigen	0,06	1,33E-05
204602_at	DKK1	dickkopf homolog 1 (<i>Xenopus laevis</i>)	0,06	2,10E-05
201858_s_at	PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	0,05	2,33E-03
203074_at	ANXA8	annexin A8	0,05	3,76E-05
205899_at	CCNA1	cyclin A1	0,04	1,74E-02
208131_s_at	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	0,02	2,70E-04
209758_s_at	MFAP5	microfibrillar associated protein 5	0,02	6,28E-05

Tabelle 5.17: NS-spezifische Gene. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert.

5.4 Auffinden putativer WT1-Zielgene

Die Human Focus Arrays (Affymetrix) und Atlas Arrays 3.6 (Clontech) wurden verwendet, um differentiell exprimierte Gene nach *WT1* Knock-down zu finden. Durch dieses Experiment sollten putative *WT1*-Zielgene gefunden werden, die in die frühen Schritte der Erkrankung involviert sind. Durch den Vergleich des Knock-down Experimentes mit den DDS-spezifischen Genen der Podozyten-Arrays sollte zudem die Hypothese eines dominant-negativen Effektes der DDS-Mutationen getestet werden.

5.4.1 Optimierung des siRNA vermittelten *WT1* Knock-downs

Ein erfolgreiches siRNA-Experiment ist zum einen von der Qualität und dem Design der siRNA als auch von den Transfektionsparametern abhängig, die sorgfältig optimiert werden müssen. Die Aufgabe des Designs wurde von der Firma Qiagen übernommen, von der die verwendeten siRNAs bezogen wurden. Als Kontrollen dienten hier

- 1) eine Fluoreszein-markierte Kontrolle zur Bestimmung der Transfektionseffizienz (Affymetrix- und Clontech-Arrays),
- 2) eine Negativkontrolle ohne Homologie zu Säugergenen (Affymetrix-Arrays) und
- 3) eine Positivkontrolle gegen *Lamin A/C* für die Effizienz des Silencing-Effektes (Clontech-Arrays).

Optimierung der Versuchsbedingungen

a) N13T-Podozyten

Begonnen wurden die ersten Transfektionen mit Telomerase immortalisierten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person mit dem RNAiFect-Transfektionsreagenz der Firma Qiagen. Dieses basiert auf einer Lipidformel, die speziell für die Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen entwickelt wurde. Der verwendete RNAi Starter-Kit enthielt das Transfektionsreagenz, eine Fluoreszein-markierte siRNA als Transfektionskontrolle und eine positive (*Lamin A/C*) Kontroll-siRNA.

Variiert wurde die Zellzahl, die Menge an siRNA und Transfektionsreagenz. Außerdem wurde neben dem Wachstumsmedium für die Komplexbildung auch der Puffer EC-R ausgetestet. Da aber der maximal erreichte „Silencing“-Effekt von ca. 70 % unter den angestrebten 80 % lag und sich auch nicht als reproduzierbar herausstellte, wurde deshalb im weiteren Verlauf der Optimierung ein zweites Transfektionsreagenz von Invitrogen ausgetestet: Lipofectamine™ 2000-Reagenz. Die Durchführung erfolgte laut Hersteller-Protokoll. Dabei erwies sich folgender Versuchsansatz als optimal: 24 h vor Transfektion wurden 1×10^4 Zellen pro „well“ (12-„well“-Format) ausgesetzt, um eine 30-50 %ige Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion zu erhalten. Für die Transfektion wurden pro „well“ 1 μ l (= 0,25 μ g) siRNA mit 100 μ l Medium ohne FCS und Antibiotika gemischt. Von dem Transfektionsreagenz wurden 2 μ l/„well“ eingesetzt. 4 h nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszein-markierten siRNA fluorimetrisch ausgewertet (siehe Abbildung 5.20). 48 bzw. 72 h nach Transfektion wurde RNA und Protein isoliert. Der Grad des „Silencings“ wurde durch SYBRgreen Real-time RT-PCR auf mRNA-Ebene und Western-Blot Analyse auf Proteinebene analysiert. Sowohl die Transfektionseffizienz als auch der „Silencing“-Effekt lagen nahe bei 100 %.

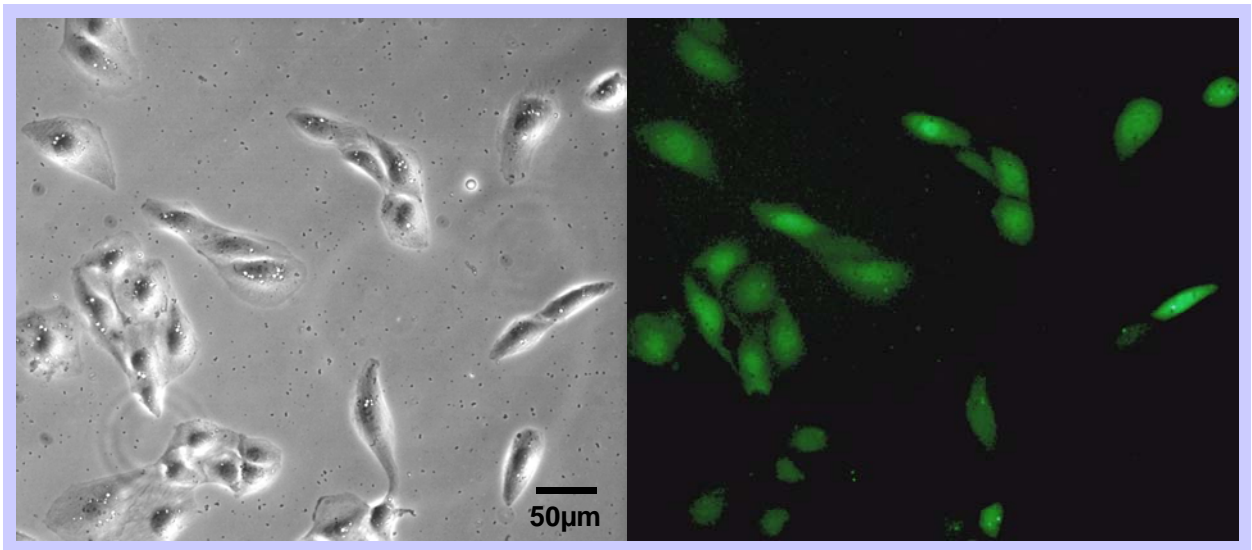


Abbildung 5.20: Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszein-markierten Kontroll-siRNA. Zu sehen ist eine cytoplasmatische Färbung in den mit siRNA transfizierten N13T-Podozyten.

b) HEK293-Zellen

Bei den HEK293-Zellen erwies sich das Transfektions-Protokoll für die Podozyten als nicht optimal. Daher wurde versucht, die Transfektion weiter zu verbessern. Da dies mit dem Lipofectamine™ 2000-Reagenz nicht gelang, wurde die Transfektion mit dem RNAiFect mit den folgenden Parametern erfolgreich optimiert (Protokoll nach Angaben des Herstellers): 24 h vor Transfektion wurden 5×10^5 Zellen pro Zellkulturschale (5 cm Durchmesser) ausgesetzt, um eine 50-80 %ige Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion zu erhalten. Für die Transfektion wurden pro Zellkulturschale 38,5 µl (10 µg) siRNA mit 161,5 µl Vollmedium gemischt. Von dem Transfektionsreagenz wurden 60 µl/Zellkulturschale eingesetzt. 4 h nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszein-markierten siRNA ausgewertet. 24 bzw. 48 h nach Transfektion wurde RNA und Protein isoliert. Der Grad des „Silencings“ wurde wieder durch SYBRgreen Real-time RT-PCR auf mRNA-Ebene und Western-Blot Analyse auf Proteinebene analysiert. Sowohl die Transfektionseffizienz als auch der „Silencing“-Effekt lagen bei >80 %. Problematisch war hier die fotografische Darstellung der Transfektionseffizienz, da trotz gutem Waschens der Zellen mit PBS die überschüssigen Komplexe aus siRNA und Transfektionsreagenz nicht von den Zellen heruntergespült werden konnten. Diese überstrahlten im Mikroskop die eigentliche Fluoreszenz der Zellen, so dass keine Aufnahmen gemacht werden konnten.

5.4.2 Erstellung der Expressionsprofile von Podozyten und HEK293-Zellen, in denen *WT1* über eine spezifische siRNA herunterreguliert wurde

Zur Anfertigung der Expressionsprofile von Podozyten-Zellkulturen und HEK293-Zellen nach einem *WT1* Knock-down wurden Arrays der Firma Clontech und Affymetrix verwendet.

A) Clontech-Arrays

In der vorliegenden Arbeit wurde, wie unter 5.3.1 beschrieben, das Human Atlas-Array-Set 3.6 für die Erstellung der Expressionsprofile verwendet. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 5.21 zusammengefasst.

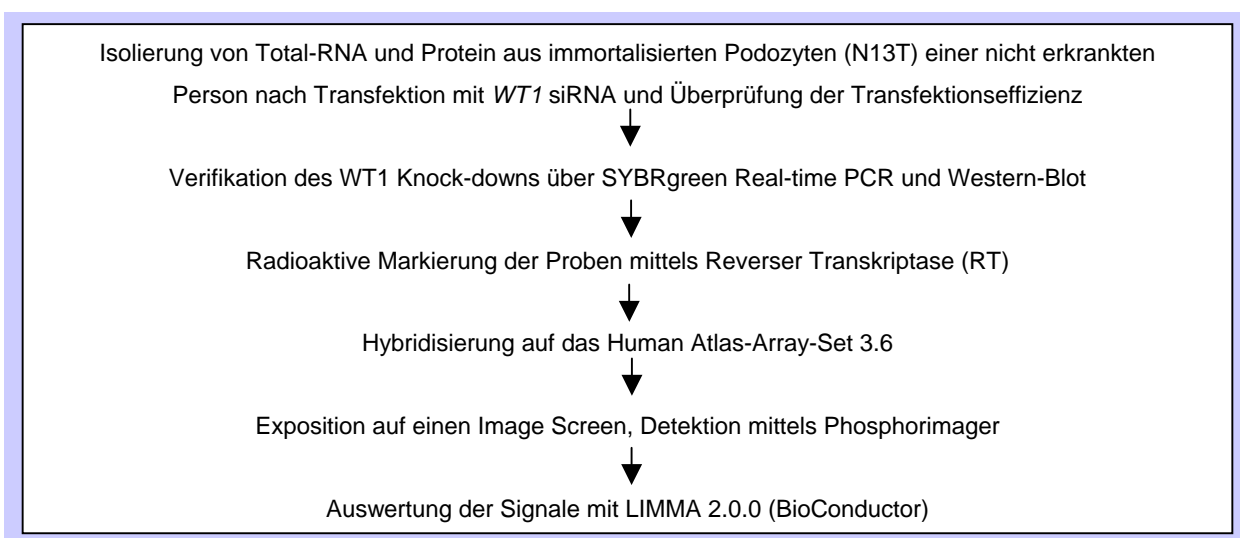


Abbildung 5.21: Versuchsablauf und Probenvorbereitung für die Clontech-Arrays.

Die Transfektion wurde, wie unter 5.4.1 beschrieben, durchgeführt. Als Kontrollen dienen die nur mit Transfektionsreagenz aber ohne siRNA behandelten N13T-Podozyten und die mit *Lamin A/C* transfizierten Podozyten (Positivkontrolle). 4 h nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mit der Fluoreszein-markierten siRNA fluorimetrisch dokumentiert (vergleiche auch Abbildung 5.20), wobei die Transfektionseffizienz deutlich bei >80 % lag. 24 bzw. 48 h nach Transfektion wurde Total-RNA und Protein isoliert (siehe Methoden 4.4.1 und 4.6.1). Die Verifikation des Knock-downs erfolgte dann über SYBRgreen Real-time RT-PCR (vergleiche Methoden 4.4.5) und eine Western-Blot Analyse (siehe Methoden 4.6.4).

Die Real-time RT-PCR Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt, unter Verwendung von 50 ng Total-RNA, die in cDNA umgeschrieben wurde. Zusätzlich zu *WT1* und *Lamin A/C* wurde auch die Expression von *GAPDH* als Housekeeping-Gen untersucht. Tabelle 5.18 zeigt die prozentuale *WT1*- und *Lamin A/C*-Expression in den transfizierten und untransfizierten Podozyten.

Die Abbildungen 5.22 und 5.23 zeigen eine niedrigere Expression von *WT1* und *Lamin A/C* 24 h nach Transfektion. Nach 48 h steigt die Expression auf mRNA-Ebene schon wieder an. Die Schmelzkurvenanalyse der SYBRgreen Real-time RT-PCRs war notwendig, um eventuelle Primerdimere auszuschließen (siehe Abbildung 5.22).

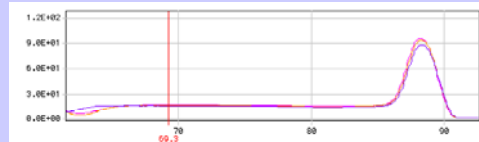
In den Western-Blot Analysen ist mit einem Antikörper gegen *WT1* eine etwa gleichstarke *WT1*-Expression der nur mit Lipofectamine2000 behandelten Kontrollen und der mit *Lamin A/C*-transfizierten Podozyten zu sehen, während 24 h nach Transfektion mit *WT1*-siRNA die *WT1*-Expression stark abnimmt und nach 48 h fast verschwunden ist. Als Housekeeping- Kontrolle diente die Expression von α -Tubulin (siehe Abbildung 5.23).

	Primer	C_T Mittelwert (+/- STDF)	ΔC_T (Gen-GAPDH)	$\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_T$ 24h/48h K)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta C_T - \Delta C_T$ 24h/48h K)	% Expression
Kontrollen ohne siRNA						
24h K	GAPDH	14,49 (+/-0,02)				
	WT1	23,40 (+/-0,05)	8,90	0,00	1,00	100
	Lamin A/C	19,09 (+/-0,04)	4,60	0,00	1,00	100
48h K	GAPDH	14,56 (+/-0,02)				
	WT1	23,27 (+/-0,05)	8,71	0,00	1,00	100
	Lamin A/C	19,88 (+/-0,14)	5,31	0,00	1,00	100
Transfektion mit Lamin A/C siRNA						
24h Lamin A/C	GAPDH	14,56 (+/-0,02)				
	WT1	23,34 (+/- 0,08)	8,79	-0,12	1,09	109
	Lamin A/C	29,39 (+/-0,36)	14,83	10,24	0,0008	0,08
48h Lamin A/C	GAPDH	14,61 (+/-0,01)				
	WT1	23,23 (+/-0,03)	8,62	-0,09	1,06	106
	Lamin A/C	26,43 (+/-0,32)	11,82	6,51	0,01	1
Transfektion mit WT1 siRNA						
24h WT1	GAPDH	14,54 (+/-0,04)				
	WT1	29,16 (+/-0,03)	14,62	5,71	0,02	2
	Lamin A/C	19,60 (+/-0,06)	5,06	0,46	0,73	73
48h WT1	GAPDH	14,50 (+/-0,01)				
	WT1	27,30 (+/-0,08)	12,80	4,09	0,06	6
	Lamin A/C	19,46 (+/-0,02)	4,96	-0,35	1,27	127

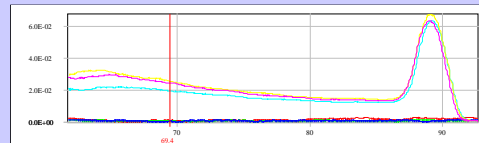
Tabelle 5.18: Berechnung der prozentualen *WT1*- und *Lamin A/C*-Expression im Knock-down nach 24 und 48 Stunden. K = Kontrolle ohne siRNA. STDF = Standardfehler. C_T = „threshold cycle“.

Abbildung 5.22 (siehe nächste Seite): Ergebnisse der Real-time RT-PCR des *WT1*- und *Lamin A/C* Knock-downs nach 24 und 48 Stunden. Größenmarker = 1kb-Leiter (Invitrogen). 0 = Negativkontrolle der PCR mit H_2O . -RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. Lipo = Kontrolle ohne siRNA und nur mit Transfektionsreagenz. Lam = Behandlung der Zellen mit *Lamin A/C* siRNA. WT1 = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. t = Zeitpunkt nach Transfektion. Die Schmelzkurvenanalyse war notwendig, um eventuelle Primerdimere auszuschließen. Die Gelbilder dienen nur zur Bestimmung der richtigen Produktgröße. Die eventuell unterschiedlichen Intensitäten der Banden auf den Gelbildern lassen keine Rückschlüsse auf die Menge des gebildeten Produktes zu, da sich die PCR-Reaktion nicht mehr in der exponentiellen Phase befindet.

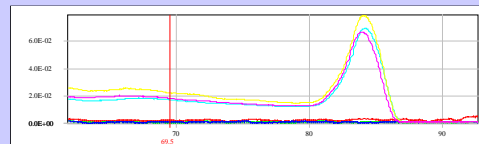
A Schmelzkurven



GAPDH Real-time PCR

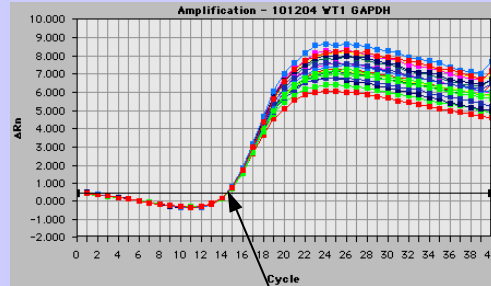


Lamin A/C Real-time PCR

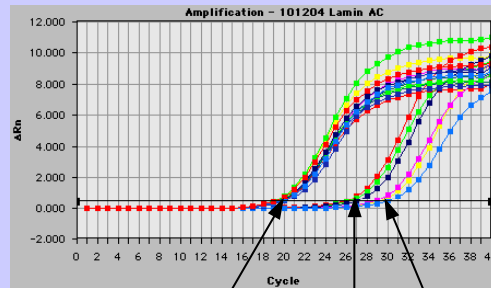


WT1 Real-time PCR

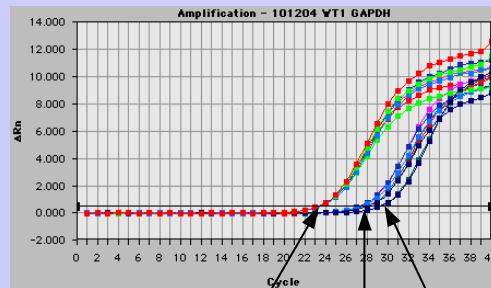
B Amplification-Plots



t = 0h, 24h, 48h

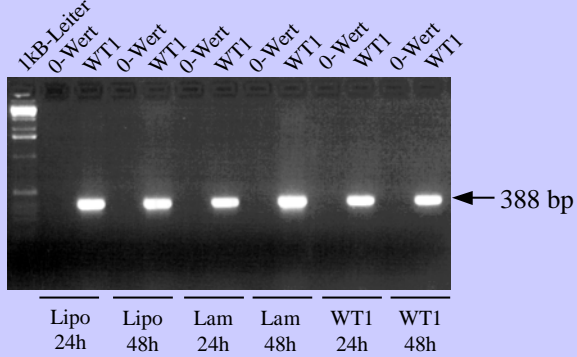
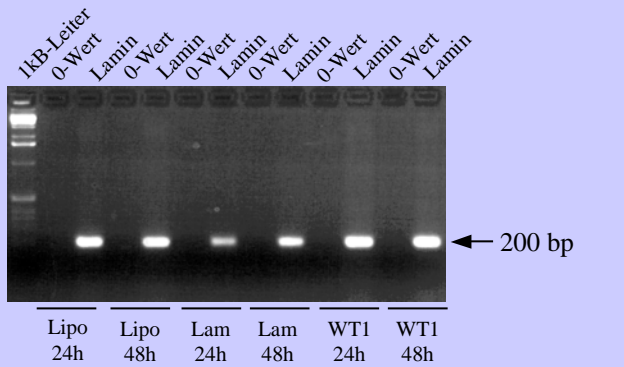
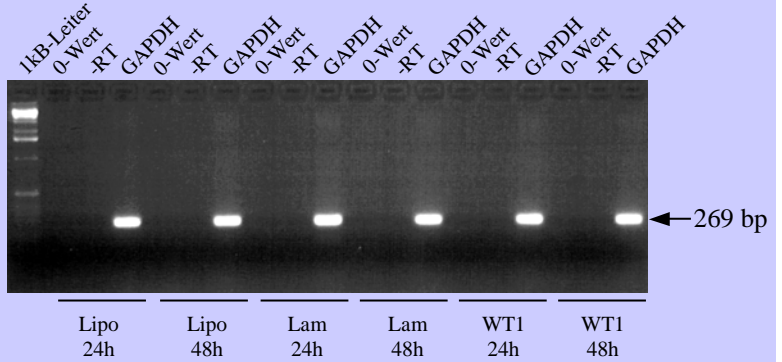


t = 0h t = 48h t = 24h



t = 0h t = 48h t = 24h

C Gele



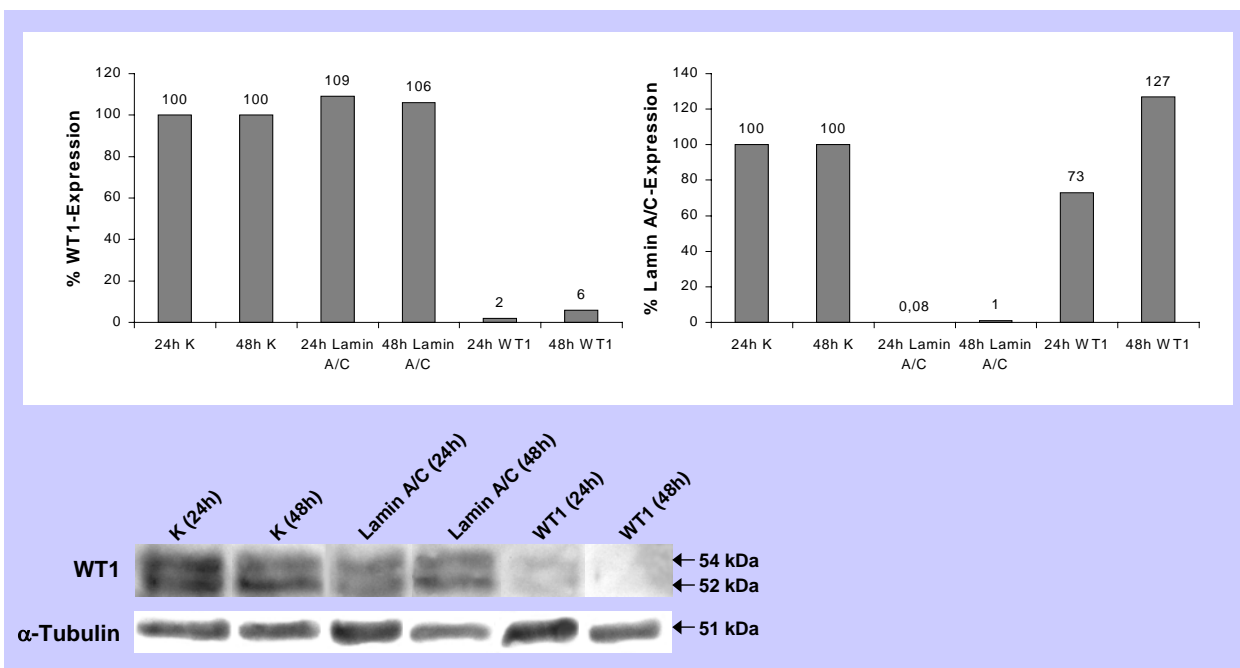


Abbildung 5.23: Grafische Darstellung der prozentualen *WT1*- und *Lamin A/C*-Expression auf mRNA-Ebene sowie der Ergebnisse der Western-Blot Analyse nach 24 und 48 Stunden. Die *WT1*- und *Lamin A/C*-Expression in den Kontrollen wurde als 100% gesetzt. K = Kontrolle ohne siRNA. *Lamin A/C* = Behandlung der Zellen mit *Lamin A/C* siRNA. *WT1* = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. α -Tubulin = Housekeeping-Kontrolle.

Pro Clontech-Filter wurde 3 μ g Total-RNA eingesetzt und, wie schon unter 4.5.1 beschrieben, fortgefahren. Die dazu verwendeten RNAs umfassten die 48 h-Werte der untransfizierten, mit *Lamin A/C*- und mit *WT1* transfizierten Proben, da der *WT1* Knock-down hier auf Proteinebene am stärksten war. Die radioaktiven Signale wurden nach 96 h gemessen. Pro RNA-Probe wurden je zwei Filter hybridisiert.

Die genaue Quantifizierung der radioaktiven Signale erfolgte mit Hilfe der LIMMA 2.0.0-Software (siehe Methoden 4.5.3). Erst wenn mindestens ein Unterschied von Faktor 1,5 in der Signalstärke zwischen den zu vergleichenden Proben zu beobachten war, wurde eine differentielle Genexpression in Erwägung gezogen. Die Sortierung der Daten erfolgte über den p-Wert, wobei zu beachten ist, dass der p-Wert nur eine Aussage über die experimentelle Varianz der Methode zulässt, nicht aber über die Varianz des *WT1* Knock-downs, da dieser kein zweites Mal wiederholt und die Hybridisierung mit keiner neuen RNA durchgeführt werden konnte. Hier zeigen die Ergebnisse nur eine Richtung auf und müssen in Zukunft durch die Analyse neuer siRNA-Experimente vervollständigt bzw. mit den noch folgenden Ergebnissen der Affymetrix-Arrays verglichen werden.

Durch den Vergleich beider Kontrollen (*Lamin A/C* und nur Transfektionsreagenz ohne siRNA) mit den siRNA-transfizierten Zellen wurden insgesamt 96 Gene ($FC > 1,5$; $p < 0,05$) als differentiell exprimiert identifiziert. Davon waren 24 im *WT1* Knock-down höher und 72 niedriger exprimiert. In der folgenden stark gekürzten Liste (siehe Tabelle 5.19) wurden die aufgeführten Gene nach den größten Unterschieden und ihrer biologischen Funktion ausgewählt:

Filter	Label	Gen	WT1 48h/ K 48h	
			FC > 1,5	p < 0,05
III	E05k	GREMLIN xeroderma pigmentosum group C complementing protein	2,13	2,42E-05
I	C13n	(XPC)	1,73	4,48E-03
I	E09f	procollagen IV alpha 2 subunit (COL4A2)	1,71	3,05E-03
I	F05m	matrix metalloproteinase 7 (MMP7); matrilysin	1,65	4,62E-03
I	A03l	prothymosin alpha (PTMA)	1,56	3,50E-02
I	D11m	inhibitor of DNA binding 2 protein (ID2)	1,54	1,31E-02
III	F03a	skeletal muscle tropomyosin alpha subunit	1,54	1,42E-03
I	D08j	hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1 alpha)	1,53	2,63E-02
III	B13m	cellular retinol-binding protein I (RBP1; CRBP1)	1,52	8,56E-03
I	F05e	hepatoma-derived growth factor (HDGF)	1,52	9,92E-03
I	A08k	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDKN3)	1,51	3,32E-02
I	E13e	neu differentiation factor	1,50	1,64E-02
I	A05i	cell division protein kinase 6 (CDK6)	0,66	2,88E-02
I	B12m	transducin beta 1	0,66	8,18E-03
I	A10e	epidermal growth factor receptor (EGFR)	0,65	7,94E-03
I	A13i	cyclin-dependent kinase 10 (CDK10)	0,64	2,75E-02
I	D13m	SWI/SNF related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily a member 1 (SMARCA1)	0,64	1,22E-02
I	C04i	BCL2-binding athanogene 1 (BAG1)	0,64	4,61E-02
I	F11f	endothelin 2 (ET2)	0,64	1,05E-02
I	E14i	integrin alpha L (ITGAL)	0,63	2,03E-02
I	B03k	serine/threonine-protein kinase NRK2; STK2	0,63	2,60E-02
I	C06e	stratifin (SFN)	0,62	2,71E-02
I	B08e	transferrin receptor (TFRC)	0,62	2,20E-02
I	E01l	interleukin 2 receptor alpha subunit (IL2RA)	0,62	1,04E-02
I	A06a	p53-binding mouse double minute 2 homolog (MDM2) tumor necrosis factor receptor superfamily member 5 (TNFRSF5)	0,61	8,79E-03
I	E09k	small inducible cytokine subfamily A member 5 (SCYA5)	0,59	5,08E-03
I	F10e	small inducible cytokine subfamily A member 5 (SCYA5)	0,58	7,93E-03
II	C04m	mannose-binding lectin (LMAN1)	0,57	4,49E-05
I	C11c	activating transcription factor 2 (ATF2); CREBP1	0,57	1,09E-02
I	A03g	n-ras proto-oncogene; transforming protein p21	0,56	1,91E-03
III	C14g	ORNITHINE AMINOTRANSFERASE	0,56	1,79E-03
I	A08a	MOESIN-ezrin-radixin-like protein (MERLIN)	0,54	5,58E-04
I	F12e	small inducible cytokine subfamily A member 2 (SCYA2)	0,53	3,75E-03
I	C13c	signal transducer and activator of transcription 1 alpha/beta (STAT1)	0,52	8,69E-04
II	D04k	cytochrome P450 VIII A1 (CYP8A1)	0,52	1,33E-05
I	C09e	transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP)	0,48	2,79E-04
I	C12e	zyxin 2 (ZYG)	0,47	1,07E-02
I	C02h	CD40 receptor-associated factor 1 (CRAF1)	0,47	2,62E-02
I	C13h	calpain 1 large (catalytic) subunit	0,44	3,01E-03
I	C04a	protein-tyrosine phosphatase 2C (PTP-2C)	0,43	6,77E-05
I	E10a	early growth response protein 1 (EGR1)	0,40	3,60E-05
I	F12f	hepatocyte growth factor-like protein	0,36	4,52E-02
I	C11h	caspase 10 (CASP10)	0,34	3,66E-05
III	F03d	TROPOMYOSIN, FIBROBLAST NON-MUSCLE TYPE (TM30- PL)	0,33	8,32E-06
I	F14g	interleukin 8 (IL8)	0,31	4,62E-04

Tabelle 5.19: Differentiell exprimierte Gene im *WT1* Knock-down nach 48 Stunden. FC = Expressionsunterschied. p = p-Wert. K = Kontrollen ohne siRNA und mit *Lamin A/C* siRNA transfiziert.

B) Affymetrix-Arrays

Mit Hilfe des Human Focus-Arrays können die Expressionslevel von 8500 Transkripten analysiert werden, die ca. 8400 gut bekannte humane Gene repräsentieren. Der Array besteht aus mehr als 8700 „Probe Sets“ und verschiedenen Kontroll-Sequenzen (siehe Tabelle 5.12, Seite 80). Der Ablauf der Untersuchung ist in Abbildung 5.24 dargestellt und im Methodenteil unter 4.5.2 beschrieben.

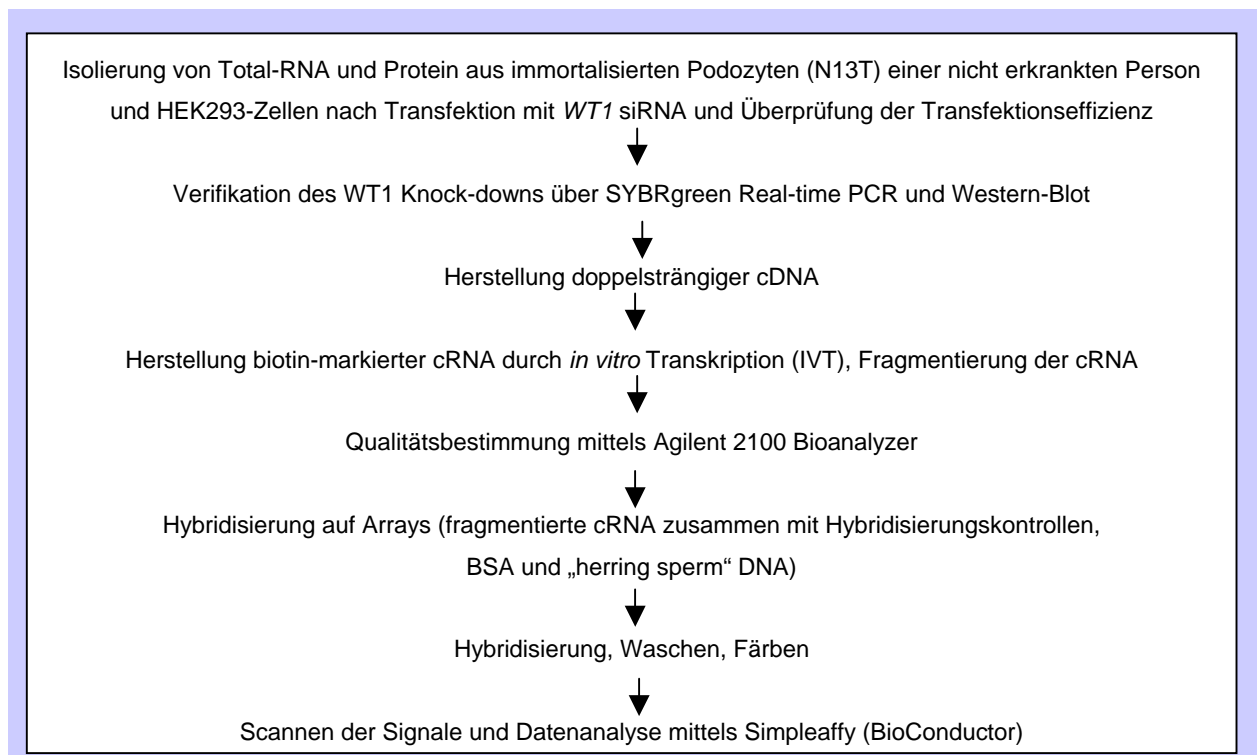


Abbildung 5.24: Versuchsablauf und Probenvorbereitung für die Affymetrix-Arrays

Die Transfektion der N13T-Podozyten und der HEK293-Zellen erfolgte wie unter 5.4.1 beschrieben. Als Kontrollen dienten die mit einer Negativkontrolle (keine Homologie zu bekannten Säugergenen) transfizierten HEK293-Zellen und N13T-Podozyten. Bei den Podozyten wurde die Transfektion zweimal durchgeführt. 4 h nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz mit der Fluoreszein-markierten siRNA fluorimetrisch dokumentiert. Sowohl bei den Podozyten als auch bei den HEK293-Zellen lag die Transfektionseffizienz deutlich bei >80 %. Zusätzlich wurde Wachstum und Aussehen der Zellen vor Transfektion und nach den verschiedenen Stundenwerten dokumentiert (siehe Abbildung 5.25). Auffällig war bei den mit der *WT1* siRNA transfizierten Podozyten, im Gegensatz zu der Kontrolle, bei der die Zellen mehr kopfsteinpflasterförmig aussahen, die spindelförmige Form 72 h nach Transfektion. Auch waren größere Bereiche der Kulturschale der mit *WT1* siRNA transfizierten Podozyten

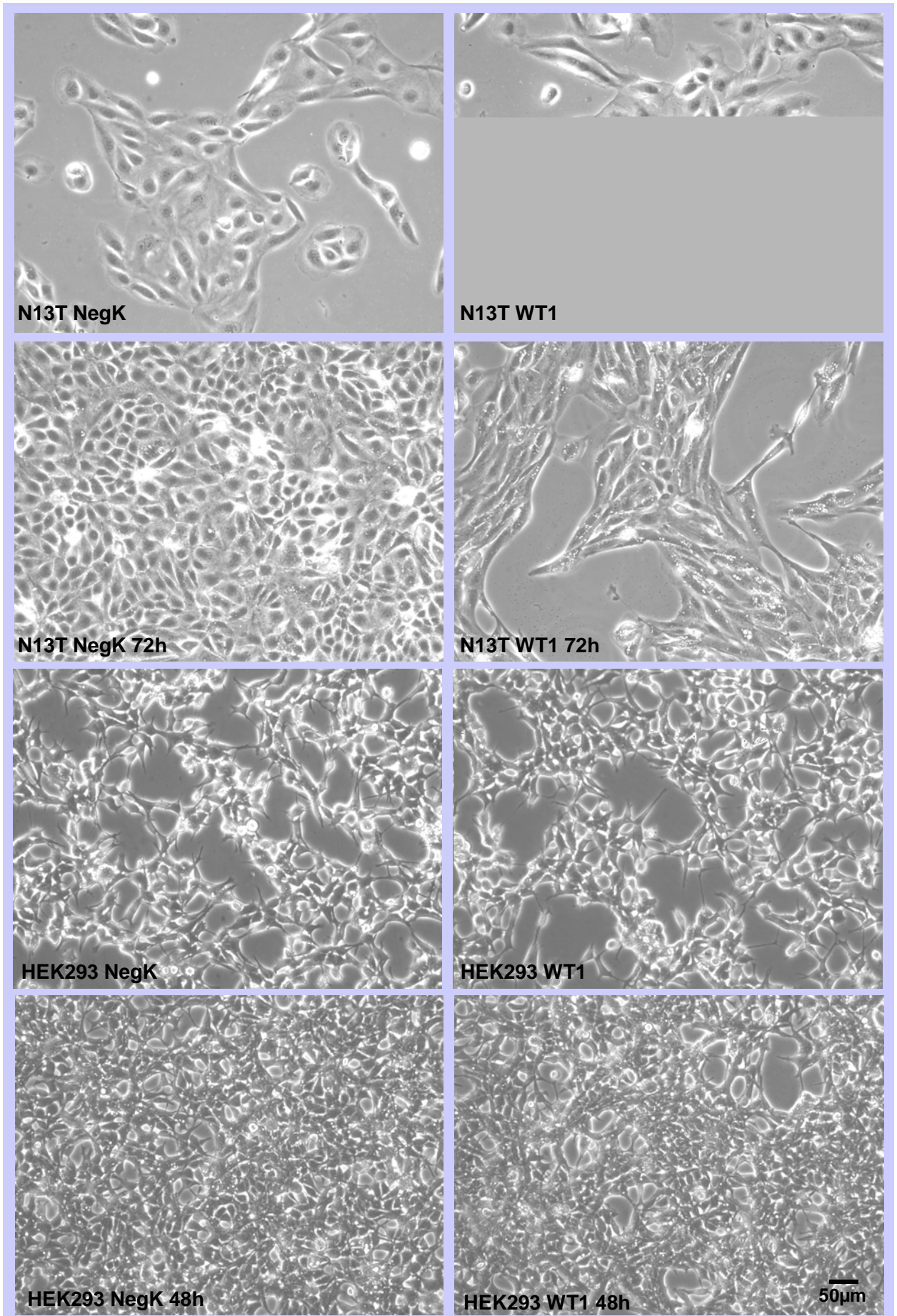


Abbildung 5.25 (siehe vorherige Seite): Dokumentation der HEK293-Zellen und N13T-Podozyten vor und nach Transfektion mit *WT1* siRNA. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = mit *WT1* siRNA transfizierte Zellen.

nicht bewachsen, während die Kontrollen keine Lücken mehr zeigten. Bei den HEK293-Zellen waren hingegen bezüglich Form und Wachstum keine Unterschiede zu erkennen.

	Primer	C _T Mittelwert (+/- STDF)	ΔC _T (Gen-GAPDH)	ΔΔC _T (ΔC _T -ΔC _T 24h/48h K)	2 ^{-ΔΔCT} (ΔC _T -ΔC _T 24h/48h K)	% Expression
N13T A						
48h NegK	GAPDH	17,29 (+/-0,05)				
	WT1	22,14 (+/-0,04)	4,85	0,00	1,00	100
48h WT1	GAPDH	17,16 (+/-0,06)				
	WT1	27,65 (+/-0,13)	10,49	5,64	0,02	2
72h WT1	GAPDH	17,26 (+/-0,06)				
	WT1	27,49 (+/- 0,10)	10,21	5,36	0,02	2
N13T B						
48h NegK	GAPDH	17,55 (+/-0,04)				
	WT1	21,87 (+/-0,04)	4,26	0,00	1,00	100
48h WT1	GAPDH	17,51 (+/-0,12)				
	WT1	27,57 (+/-0,17)	10,06	5,80	0,02	2
72h WT1	GAPDH	17,94 (+/-0,10)				
	WT1	27,80 (+/- 0,06)	9,85	5,59	0,02	2

Tabelle 5.20: Prozentuale *WT1*-Expression nach *WT1* Knock-down in den N13T-Podozyten nach 48 und 72 Stunden. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. STDF = Standardfehler. A und B = Ergebnisse zweier unabhängiger Transfektionen. C_T = „threshold cycle“.

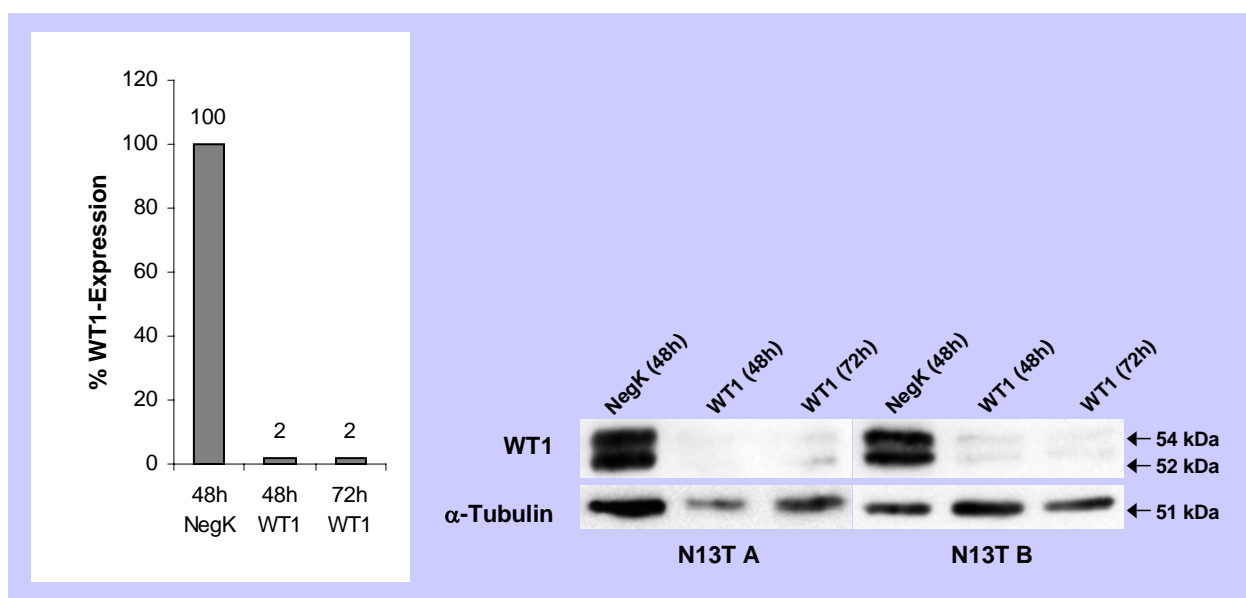


Abbildung 5.26: Grafische Darstellung der prozentualen *WT1*-Expression auf mRNA-Ebene sowie der Ergebnisse der Western-Blot Analyse der N13T-Podozyten nach 48 und 72 Stunden. Der *WT1* Knock-down wurde zweimal durchgeführt (A und B). Die *WT1*-Expression in den Kontrollen wurde als 100% gesetzt. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. α -Tubulin = Housekeeping-Kontrolle.

48 bzw. 72 h nach Transfektion wurde Total-RNA und Protein der N13T-Podozyten isoliert. Bei den HEK293 Zellen wurde schon nach 24 und 48 h RNA und Protein isoliert, da sich die Zellen aufgrund des sehr schnellen Wachstums bereits nach 72 h ablösten. Die Verifikation des Knock-downs erfolgte dann wie bei den Clontech-Arrays über SYBRgreen Real-time RT-PCR (siehe Tabellen 5.20 und 5.21) und eine Western-Blot Analyse (siehe Abbildungen 5.26 und 5.27).

HEK293	Primer	C_T Mittelwert (+/- STDF)	ΔC_T (Gen-GAPDH)	$\Delta\Delta C_T$ ($\Delta C_T - \Delta C_T_{24h/48h K}$)	$2^{-\Delta\Delta C_T}$ ($\Delta C_T - \Delta C_T_{24h/48h K}$)	% Expression
24h NegK	GAPDH	15,23 (+/-0,05)				
	WT1	23,53 (+/-0,09)	8,30	0,00	1,00	100
24h WT1	GAPDH	15,24 (+/-0,03)				
	WT1	26,33 (+/-0,05)	11,08	2,78	0,15	15
48h WT1	GAPDH	15,47 (+/-0,07)				
	WT1	27,89 (+/- 0,39)	12,41	4,11	0,06	6

Tabelle 5.21: Prozentuale *WT1*-Expression nach *WT1* Knock-down in den HEK293-Zellen nach 24 und 48 Stunden. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. STDF = Standardfehler. C_T = „threshold cycle“.

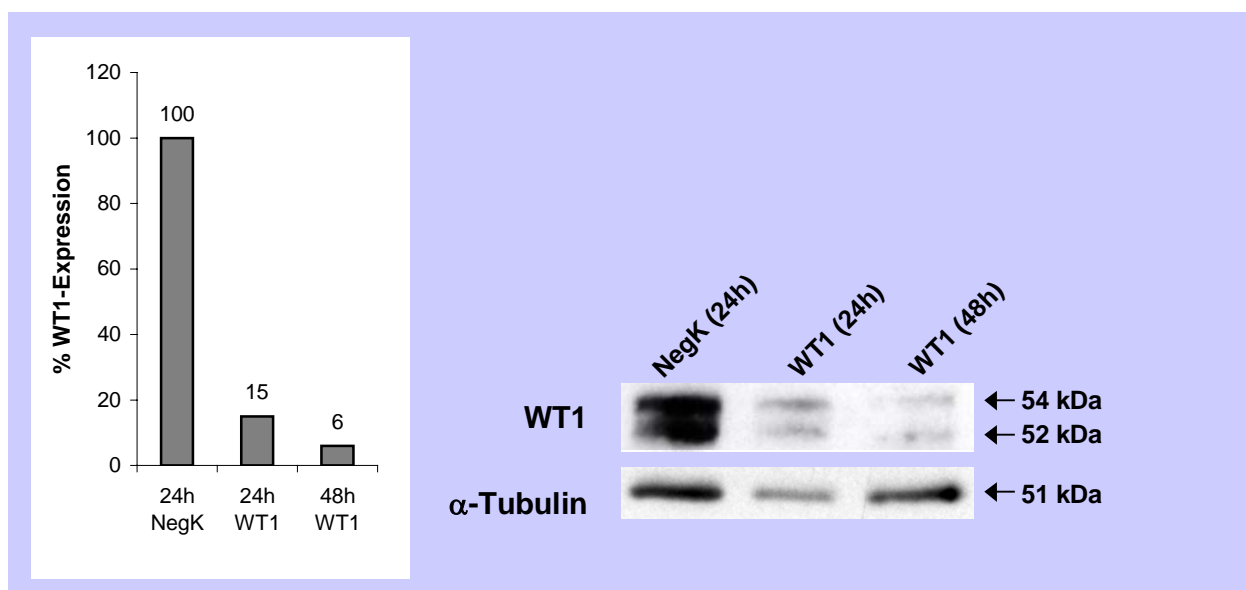


Abbildung 5.27: Grafische Darstellung der prozentualen *WT1*-Expression auf mRNA-Ebene sowie der Ergebnisse der Western-Blot Analyse der HEK293-Zellen nach 24 und 48 Stunden. Die *WT1*-Expression in den Kontrollen wurde als 100% gesetzt. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. α -Tubulin = Housekeeping-Kontrolle.

Die Real-time RT-PCR Reaktionen wurden in Duplikaten durchgeführt, wobei 50 ng Total-RNA, die in cDNA umgewandelt wurde, eingesetzt wurde. Zusätzlich zu *WT1* wurde auch die Expression von *GAPDH* als Housekeeping-Gen untersucht. Die Tabellen 5.20 und 5.21 zeigen die prozentuale *WT1*-Expression in den mit *WT1* siRNA transfizierten und mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen. Bei den Podozyten ist die *WT1*-Expression 48 und 72 h

nach Transfektion gleich schwach (siehe Abbildung 5.26). Die Abbildung 5.27 zeigt in den HEK293-Zellen stetig abnehmende mRNA *WT1*-Level 24 bzw. 48 h nach Transfektion.

Auch auf Proteinebene ist zu sehen, dass die Menge von *WT1* nach Transfektion mit *WT1* siRNA sowohl in den HEK293-Zellen als auch in den N13T-Podozyten dramatisch abnimmt (siehe Abbildungen 5.26 und 5.27).

Im Rahmen der Arbeit konnte von allen RNA-Proben nur je eine IVT-Reaktion durchgeführt und ein Chip hybridisiert werden. In die Erststrang-Synthese wurden 7 µg Total-RNA eingesetzt und dann, wie im Methodenteil unter 4.5.2 beschrieben, fortgefahren. Die Qualität und Größe der aufgereinigten doppelsträngigen cDNA, das nicht-aufgereinigte und das aufgereinigte IVT-Produkt sowie die fragmentierte cRNA wurden anschließend auf einem Gel überprüft (Beispiel siehe Abbildung 5.28). Die Hauptgröße der fragmentierten RNA lag im geforderten Bereich von 35 und 200 Bp, wobei sich der Hauptpeak zwischen 80 und 100 Bp befand. Zusätzlich wurde die Qualität und die Menge der unfragmentierten cRNA mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker bestimmt (vergleiche auch Abbildung 5.17). Die Reinheit der cRNA wurde über ein Spektrometer bestimmt und lag im Bereich von $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$. Die Berechnung der Gesamt-cRNA-Menge erfolgte wie unter 5.3.2 (siehe Seite 83) beschrieben.

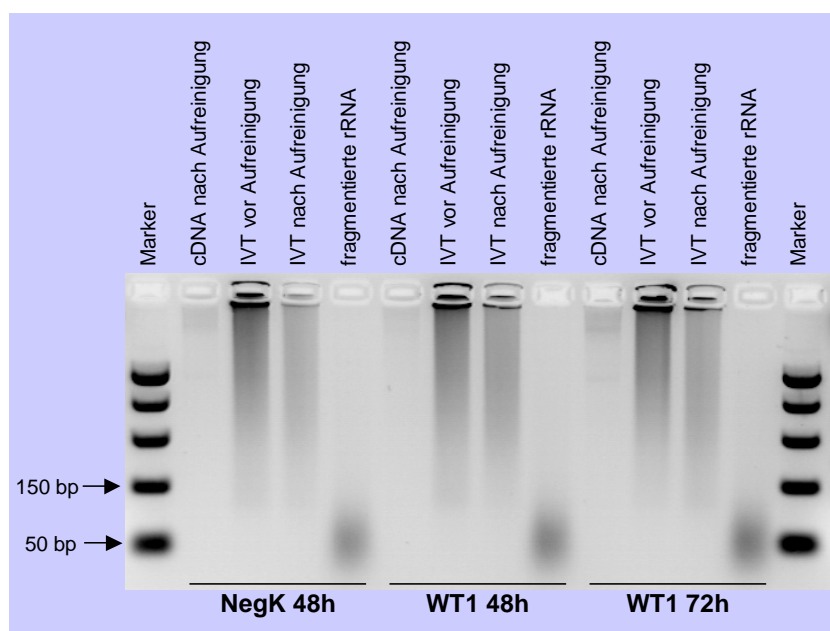


Abbildung 5.28: Qualitätsbestimmung der doppelsträngigen cDNA, der IVT-Produkte und der fragmentierten cRNA am Beispiel der N13T-Podozyten-RNA 48 und 72 Stunden nach Transfektion mit siRNA auf einem 3 %igen TAE-Agarosegel. Größenmarker: PCR-Marker (New England Biolabs). Gelbild invertiert. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA.

Bei den Podozyten wurde von beiden Transfektionen je eine unabhängige IVT-Reaktion durchgeführt. Für die Fragmentierung wurden die beiden Proben gepoolt. Es wurden insgesamt 13 µg cRNA in die Fragmentierungsreaktionen eingesetzt und hybridisiert. Die Datenanalyse erfolgte wie unter 5.3.2 beschrieben.

Die Qualität der Hybridisierung und der verwendeten RNA-Probe wurden überprüft (siehe Tabelle 5.12, nähere Beschreibung Seite 84f). Wie in Tabelle 5.22 zu sehen ist, ist die Qualität der Proben N13T *WT1* 48h und HEK293 *WT1* 48h bezüglich der Hybridisierung nicht optimal.

Problematisch ist hier die Tatsache, dass die Hybridisierungskontrollen bioC und bioD sowie cre nicht immer vorhanden sind (vergleiche Seite 84). Die Auswertung erfolgte hauptsächlich für die anderen Proben. Die beiden problematischen Arrays wurden nur zum Vergleich hinzugezogen.

Qualitätsmerkmale Array		Podozyten (N13T)			HEK293-Zellen		
		NegK 48h	WT1 48h	WT1 72h	NegK 24h	WT1 24h	WT1 48h
Bild-Artefakte		nein	nein	nein	nein	nein	nein
B2 Oligo-Hybridisierung	Rand	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
	Ecke	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
	Arrayname	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.	vorh.
Hintergrund		73.32	70.09	65.45	62.3	59,36	64.81
Rauschen		2.680	2.540	2.440	2.360	2.290	2.350
Hybridisierungs-Kontrollen	bioB (5'/M'/3')	A/P/A	A/A/A	A/A/A	M/P/A	P/P/A	A/A/A
	bioC (5'/3')	P/P	P/A	P/P	P/P	P/P	P/A
	bioD (5'/3')	P/M	A/A	P/P	P/P	P/P	P/A
	cre (5'/3')	P/P	P/P	P/P	P/P	P/P	A/P
Interne Kontrollgene (3'/5'-Verhältnis)	beta-Aktin	0.96	0.98	1.02	1.04	1.16	0.76
	GAPDH	0.88	0.95	0.98	0.78	0.91	1.17
% Gene "present"		46.4	38.4	46.9	52	52.5	33.2
Skalierungsfaktor		0.790	1.466	0.774	0.726	0.719	2.130
Normalisierungsfaktor		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabelle 5.22: Zusammenfassung der Qualitätsmerkmale der Arrayanalysen (vergleiche 5.3.2). P = „present“. M = „marginal“. A = „absent“. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = Behandlung der Zellen mit WT1 siRNA.

Die genaue Quantifizierung der Signale, die die Expressionsstärke der Gene darstellen, erfolgte über Simpleaffy (siehe Methoden 4.5.3). Erst wenn mindestens ein Unterschied von Faktor 1,5 in der Signalstärke zwischen den unterschiedlichen Proben zu beobachten war, wurde eine differentielle Genexpression in Erwägung gezogen. Ein T-Test war aufgrund der einzelnen Datenpunkte nicht möglich. Deshalb zeigen die Ergebnisse hier nur eine Richtung auf und müssen in Zukunft durch die Analyse weiterer Proben vervollständigt bzw. mit den Ergebnissen der Clontech-Arrays verglichen werden.

Die Array-Analysen ergaben sehr große Datenmengen, die deshalb in dieser Arbeit nur in Auszügen wiedergegeben werden können. In den folgenden stark gekürzten Listen (siehe Tabelle 5.23 und 5.24) wurden die aufgeführten Gene nach den größten Unterschieden und ihrer biologischen Funktion ausgewählt. Verglichen wurden folgende Expressionsdaten:

- a) N13T NegK48 (Negativkontrolle) vs. N13T WT1 48 (*WT1* Knock-down nach 48 h)
N13T NegK48 (Negativkontrolle) vs. N13T WT1 72 (*WT1* Knock-down nach 72 h)

Es wurden insgesamt 158 Gene ($FC \geq 1,5$) differentiell exprimiert. Davon waren 14 im *WT1* Knock-down höher und 144 niedriger exprimiert.

- b) HEK293 NegK24 (Negativkontrolle) vs. HEK293 WT1 24 (*WT1* Knock-down nach 24 h)
 HEK293 NegK24 (Negativkontrolle) vs. HEK293 WT1 48 (*WT1* Knock-down nach 48 h)
 Es wurden insgesamt 148 Gene ($FC \geq 1,5$) differentiell exprimiert. Davon waren 25 im *WT1* Knock-down höher und 123 niedriger exprimiert.

Im Folgenden wurden dann nur die Gene angesehen, die einen $FC \geq 1,5$ bei beiden Stundenwerten zeigten.

a) *WT1* Knock-down in den N13T-Podozyten

Podozyten			FC $\geq 1,5$	
Probe-Set	Gen		WT 48*/ NegK 48	WT 72/ NegK 48
218469_at	GREM1	gremlin 1 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	1,73	4,84
204083_s_at	TPM2	tropomyosin 2 (beta)	2,24	3,45
210305_at	PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	2,11	3,24
202237_at	NNMT	nicotinamide N-methyltransferase	1,69	2,53
208937_s_at	ID1	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	2,14	2,20
205547_s_at	TAGLN	transgelin	3,17	2,13
207826_s_at	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	2,59	2,12
212481_s_at	TPM3	tropomyosin 3	1,64	2,03
208131_s_at	PTGIS	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	0,22	0,66
204470_at	CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	0,29	0,65
203531_at	CUL5	cullin 5	0,44	0,65
203075_at	SMAD2	SMAD, mothers against DPP homolog 2 (Drosophila)	0,43	0,64
201034_at	ADD3	adducin 3 (gamma)	0,36	0,63
39402_at	IL1B	interleukin 1, beta	0,45	0,63
210130_s_at	TM7SF2	transmembrane 7 superfamily member 2	0,43	0,62
202088_at	SLC39A6	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6	0,46	0,62
209875_s_at	SPP1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	0,37	0,62
203243_s_at	PDLIM5	PDZ and LIM domain 5	0,49	0,62
203476_at	TPBG	trophoblast glycoprotein	0,44	0,62
209921_at	SLC7A11	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	0,37	0,61
202658_at	PEX11B	peroxisomal biogenesis factor 11B	0,50	0,61
201859_at	PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	0,46	0,61
202733_at	P4HA2	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	0,45	0,60
212586_at	CAST	calpastatin	0,49	0,60
202076_at	BIRC2	baculoviral IAP repeat-containing 2	0,44	0,60
33304_at	ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	0,48	0,59
209016_s_at	KRT7	keratin 7	0,46	0,59
204614_at	SERPINB2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2	0,29	0,58
201315_x_at	IFITM2	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	0,41	0,57
200600_at	MSN	moesin	0,32	0,55
219935_at	ADAMTS5	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	0,39	0,53
202688_at	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0,40	0,53

Podozyten			FC \geq 1,5	
			WT 48*/ NegK 48	WT 72/ NegK 48
Probe-Set	Gen			
209272_at	NAB1	NGFI-A binding protein 1 (EGR1 binding protein 1)	0,45	0,53
210143_at	ANXA10	annexin A10	0,48	0,53
214988_s_at	SON	SON DNA binding protein	0,30	0,53
203313_s_at	TGIF	TGFB-induced factor (TALE family homeobox)	0,29	0,53
211506_s_at	IL8	interleukin 8	0,14	0,53
203473_at	SLCO2B1	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1	0,43	0,52
204070_at	RARRES3	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	0,34	0,52
202041_s_at	FIBP	fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein	0,40	0,51
205014_at	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1	0,52	0,49
204608_at	ASL	argininosuccinate lyase	0,64	0,48
206157_at	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	0,48	0,48
219564_at	KCNJ16	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 16	0,43	0,46
201010_s_at	TXNIP	thioredoxin interacting protein	0,49	0,46
201502_s_at	NFKBIA	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	0,42	0,46
213348_at	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	0,38	0,45
212508_at	MOAP1	modulator of apoptosis 1	0,34	0,45
201798_s_at	FER1L3	fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	0,31	0,45
202510_s_at	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	0,44	0,45
212203_x_at	IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U)	0,35	0,44
206332_s_at	IFI16	interferon, gamma-inducible protein 16	0,39	0,44
204747_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	0,53	0,42
205476_at	CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0,48	0,42
202644_s_at	TNFAIP3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	0,40	0,42
208029_s_at	LAPTM4B	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	0,24	0,41
202446_s_at	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	0,30	0,41
203595_s_at	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	0,36	0,40
217846_at	QARS	glutaminyl-tRNA synthetase	0,37	0,40
207339_s_at	LTB	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	0,46	0,39
211564_s_at	PDLIM4	PDZ and LIM domain 4	0,29	0,37
202855_s_at	SLC16A3	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	0,29	0,37
200887_s_at	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	0,23	0,36
204981_at	SLC22A18	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 18	0,39	0,36
204158_s_at	TCIRG1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 protein a isoform 3	0,28	0,35
204475_at	MMP1	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	0,30	0,35
201599_at	OAT	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)	0,22	0,33
205552_s_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0,38	0,32
204439_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	0,33	0,30
204679_at	KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1	0,27	0,29
201641_at	BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	0,35	0,28
209774_x_at	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0,32	0,28
204415_at	G1P3	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	0,27	0,26
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	0,34	0,25
208436_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	0,29	0,25
218400_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	0,43	0,24
204972_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	0,29	0,21
205483_s_at	G1P2	interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	0,24	0,16
202411_at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	0,12	0,14
214022_s_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	0,20	0,13

Podozyten			FC $\geq 1,5$	
			WT 48*/ NegK 48	WT 72/ NegK 48
Probe-Set	Gen			
203153_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0,20	0,12
202086_at	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	0,17	0,12

Tabelle 5.23: Differentiell exprimierte Gene nach *WT1* Knock-down in N13T-Podozyten nach 48 und 72 Stunden. FC = Expressionsunterschied. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. WT1 = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. * = Dieser Array wurde aufgrund der teilweise fehlenden Hybridisierungskontrollen nur zum Vergleich hinzugezogen.

b) *WT1* Knock-down in den HEK293-Zellen

HEK293			FC $\geq 1,5$	
			WT 24/ NegK 24	WT 48*/ NegK 24
Probe-Set	Gen			
201111_at	CD33	CD33 antigen (gp67)	1,71	3,61
208616_s_at	SIX3	sine oculis homeobox homolog 3 (Drosophila)	1,50	3,52
201599_at	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	2,25	3,41
203403_s_at	ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	1,62	3,00
201088_at	MYL7	myosin, light polypeptide 7, regulatory sarcoglycan, alpha (50kDa dystrophin-associated glycoprotein)	1,52	2,93
208319_s_at	SGCA	glycoprotein)	1,53	2,87
221841_s_at	THBS4	thrombospondin 4	1,71	2,60
200608_s_at	INHBA	inhibin, alpha	1,66	2,13
213139_at	GABRP	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	1,63	2,12
213262_at	CCR8	chemokine (C-C motif) receptor 8	1,53	2,11
212449_s_at	ANXA9	annexin A9	1,57	2,09
214651_s_at	ONECUT2	one cut domain, family member 2	1,60	2,08
204165_at	SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,51	0,47
203531_at	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	0,32	0,46
214636_at	INVS	inversin	0,63	0,46
214988_s_at	IFIT5	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5	0,62	0,45
200020_at	SLC1A4	solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	0,56	0,45
202446_s_at	PHLDA2	pleckstrin homology-like domain, family A, member 2	0,64	0,45
213313_at	SPOP	speckle-type POZ protein	0,51	0,43
202107_s_at	MEIS2	Meis1, myeloid ecotropic viral integration site 1 homolog 2 (mouse)	0,51	0,42
203130_s_at	PEX1	peroxisome biogenesis factor 1	0,29	0,42
221523_s_at	PIK3R3	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (p55, gamma)	0,57	0,42
218649_x_at	PEX11B	peroxisomal biogenesis factor 11B	0,60	0,41
202265_at	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3	0,57	0,40
222011_s_at	SERPINE2	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2	0,58	0,39
202418_at	CAPZA2	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	0,66	0,39
208822_s_at	LEMD3	LEM domain containing 3	0,54	0,39
215498_s_at	TOB1	transducer of ERBB2, 1	0,57	0,38
205122_at	SPG7	spastic paraplegia 7, paraplegin (pure and complicated autosomal recessive)	0,54	0,34
202911_at	BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic	0,51	0,34
209185_s_at	ING3	inhibitor of growth family, member 3	0,61	0,34
200733_s_at	SYNJ1	synaptojanin 1	0,60	0,32
212990_at	PTP4A1	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	0,52	0,32

HEK293			FC \geq 1,5	
Probe-Set	Gen		WT 24/	WT 48*/
			NegK 24	NegK 24
39966_at	LIN7C	lin-7 homolog C (C. elegans)	0,47	0,31
205070_at	IRS2	insulin receptor substrate 2	0,60	0,30
202104_s_at	TMEFF1	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	0,65	0,29
202704_at	MAP2K3	mitogen-activated protein kinase kinase 3	0,66	0,29
218604_at	DAP3	death associated protein 3	0,57	0,29
209054_s_at	FOXG1B	forkhead box G1B	0,67	0,27
204407_at	CSNK1G3	casein kinase 1, gamma 3	0,63	0,26
221168_at	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	0,58	0,25
204873_at	KIF5C	kinesin family member 5C	0,55	0,24
209803_s_at	PLSCR1	phospholipid scramblase 1	0,61	0,22
203595_s_at	SON	SON DNA binding protein	0,63	0,21
205051_s_at	CUL5	cullin 5	0,54	0,20
216841_s_at	WASF1	WAS protein family, member 1	0,40	0,20
203791_at	ADAM9	a disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	0,44	0,19
207676_at	HOXA9	homeo box A9	0,53	0,17
213409_s_at	NEK4	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 4	0,41	0,16
220050_at	PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)	0,54	0,16
203673_at	ADD3	adducin 3 (gamma)	0,65	0,14
208527_x_at	GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa (connexin 43)	0,62	0,11
216598_s_at	OAT	ornithine aminotransferase (gyrate atrophy)	0,58	0,10
206634_at	PTP4A2	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	0,64	0,09

Tabelle 5.24: Differentiell exprimierte Gene nach *WT1* Knock-down in HEK293-Zellen nach 24 und 48 Stunden. FC = Expressionsunterschied. NegK = mit einer Negativkontrolle transfizierte Zellen. *WT1* = Behandlung der Zellen mit *WT1* siRNA. * = Dieser Array wurde aufgrund der teilweise fehlenden Hybridisierungskontrollen nur zum Vergleich hinzugezogen.

5.5 Validierung der differentiell exprimierten Gene aus den Array-Analysen

Zur Validierung der differentiell exprimierten Gene aus den gesamten Arrayexperimenten standen fünf Methoden zur Auswahl: die semiquantitative RT-PCR und die Real-time RT-PCR für die Verifikation auf mRNA-Ebene sowie die immunhistochemische-, immunfluorimetrische- und die Western-Blot Analyse für die Verifikation auf Protein-Ebene.

5.5.1 Auswahl der zu verifizierenden Gene

Zur Eingrenzung des Sets an differentiell exprimierten Genen, für die Verifikation mit anderen Methoden, wurden erstens die Ergebnisse der Podozyten-Arrays von Clontech und Affymetrix und zweitens die DDS-spezifischen Gene der Podozyten-Arrays mit den *WT1* Knock-down Ergebnissen der N13T-Podozyten verglichen. Bei der Auswahl der zu verifizierenden Gene wurde der biologische Zusammenhang zwischen den differentiell exprimierten Genen aus

bekanntes Literaturdaten erstellt. Dabei lag ein besonderer Schwerpunkt auf Genen der extrazellulären Matrix (*MMPs*), Entwicklungsgenen (*Gremlin*, *SOX9*, *EMX2*, *PAX2*), Genen die zu Akkumulation von extrazellulärer Matrix führen (*TNFA*, *IGFBP3*) und Genen, die mit Angiogenese in Verbindung stehen (*VEGFA*). Ausgehend von vier ausgesuchten Genen (*Gremlin*, *TNFA*, *IGFBP3* und *VEGFA*), die aufgrund von Literaturdaten eine wichtige Rolle bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms spielen könnten, wurden Signaltransduktionswege mit Hilfe einzelner Literaturdaten zusammengestellt (siehe Abbildungen I-IV).

Im Folgenden sind für einige differentiell exprimierte Gene die in der Literatur bereits beschriebenen Funktionen mit ihren mutmaßlichen Wirkungen aufgeführt. Auch hier handelt es sich um Gene, die aufgrund ihrer biologischen Funktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms spielen könnten. Diese Gene wurden ausgewählt, um deren differentielle Expression in den durchgeführten Arrayexperimenten mit verschiedenen Methoden zu verifizieren:

Collagen IV alpha 2 (COL4A2) wird während der Nephrogenese zusammen mit COL4A1 im frühen Glomerulus exprimiert und ab dem „capillary-loop“ Stadium durch COL4A3-5 ersetzt (Miner, 1998).

Collagen IV alpha 5 (COL4A5) ist ein Bestandteil der reifen glomerulären Basalmembran (Gunwar et al., 1998) und wird von den Podozyten synthetisiert. Mutationen in COL4A5 führen zum Alport-Syndrom (Heidet et al., 2000).

Early growth response 1 (EGR1) wird als direktes Target von WT1 negativ reguliert (Madden et al., 1991).

EMX2: EMX2 spielt als Homeoboxgen eine wichtige Rolle in der Nierenentwicklung und reguliert die Interaktionen zwischen dem metanephrischen Mesenchym und der sich verzweigenden Ureterknospe (Miyamoto et al., 1997). Es wird während der Nierenentwicklung von epithelialen Komponenten exprimiert.

Endothelin 2 (ET2)-transgene Ratten zeigen eine starke Färbung von ET2 in den Glomeruli, gekoppelt an die Entwicklung von Glomerulosklerose und eine signifikant erhöhte Protein-Exkretion (Hochoer et al., 1996).

Gremlin (GREM1): Der BMP-Antagonist Gremlin spielt eine Schlüsselrolle während der Nierenentwicklung, indem er Ureterwachstum und -verzweigung induziert (Michos et al., 2004). Knock-out Mäuse sterben schon postnatal an renaler Aplasie (Dolan et al., 2005). Bei der diabetischen Nephropathie findet man eine Überexpression von Gremlin (Lappin et al., 2002).

Abbildungen I-IV (siehe nächste Seiten): Zusammengestellte Signaltransduktionswege mit Hilfe von Literaturdaten anhand von vier ausgesuchten Genen (grüne Kästen): I = Gremlin, II = IGFBP3, III = TNFA und IV = VEGF. Ergebnisse der Array-Analysen = gelbe Kästen: (A) = Ergebnisse der Affymetrix-Arrays, (C) = Ergebnisse der Clontech-Arrays, Roter Pfeil = in den Arrays hochreguliert, Grüner Pfeil = in den Arrays herunterreguliert. DDS = in den Denys-Drash Patienten fehlreguliert, NS = in den DDS- und CNF-Patienten fehlreguliert, KO = im *WT1* Knock-down fehlreguliert. Kästen mit rotem Rand = Funktion der Gene.

Expressionsunterschiede bestimmter *Laminine*, *Collagene*, *Integrine* und von *Fibronektin*

LAMA3 CNF(A) ↓	ITGA5 NS(C) ↑
LAMC2 DDS(A) ↑	ITGA6 DDS(C) ↑
COL4A2 NS(C) ↑	NS(C) ↑
KO(C) ↓	ITGB4 NS(A) ↓
COL1A1 NS(A) ↑	DDS(C) ↓
COL4A1 NS(A) ↑	ITGB6 DDS(A) ↑
COL5A1 CNF(A) ↑	DDS(C) ↓
COL6A3 CNF(A) ↑	ITGB3 NS(A) ↑
COL1A2 CNF(A) ↑	NS(C) ↓
NS(A) ↓	ITGB2 NS(A) ↓
COL6A1 CNF(A) ↑	ITGB1 NS(C) ↓
NS(A) ↓	(FNRB) ↓
COL5A2 DDS(A) ↓	ITGAL KO(C) ↓
NS(A) ↓	
COL8A1 NS(A) ↓	
COL16A1 NS(A) ↓	
COL4A6 NS(A) ↓	
COL4A5 NS(A) ↓	
	FN1 DDS(A) ↓

Verbindung der Regulation des Cytoskeletts mit dem extrazellulären Signaling

Regulation von epithelialen Zell-Matrix-Interaktionen

Zell-Zell-Interaktionen

Veränderung der Interaktion von Mikrofilamenten mit der Zelloberfläche (während der Entwicklung und Differenzierung)

Hemmung des Fibrillen-Wachstums

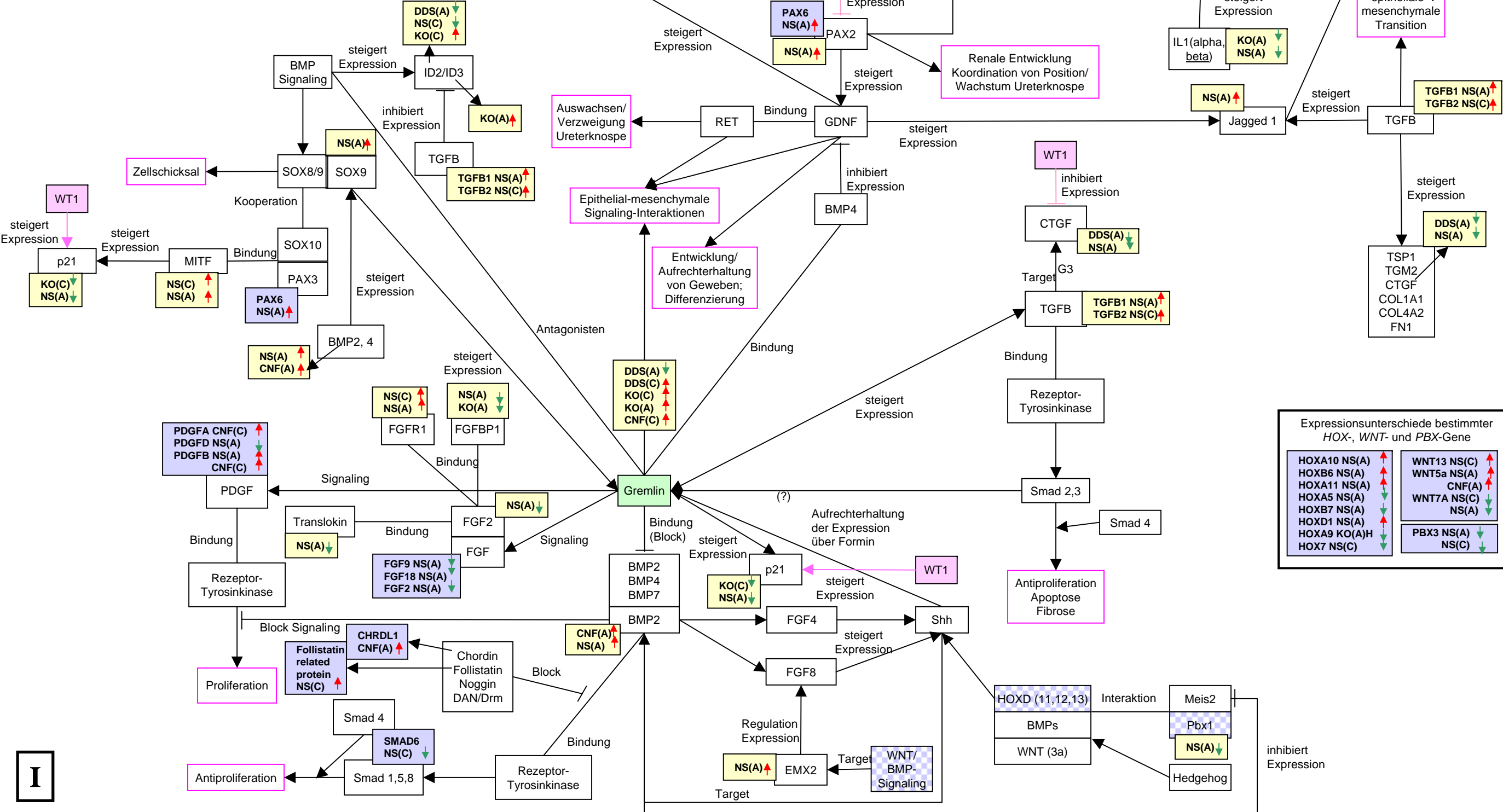
Renale Entwicklung
Koordination von Position/
Wachstum Ureterknospe

Auswachsen/
Verzweigung Ureterknospe

Epithelial-mesenchymale
Signaling-Interaktionen

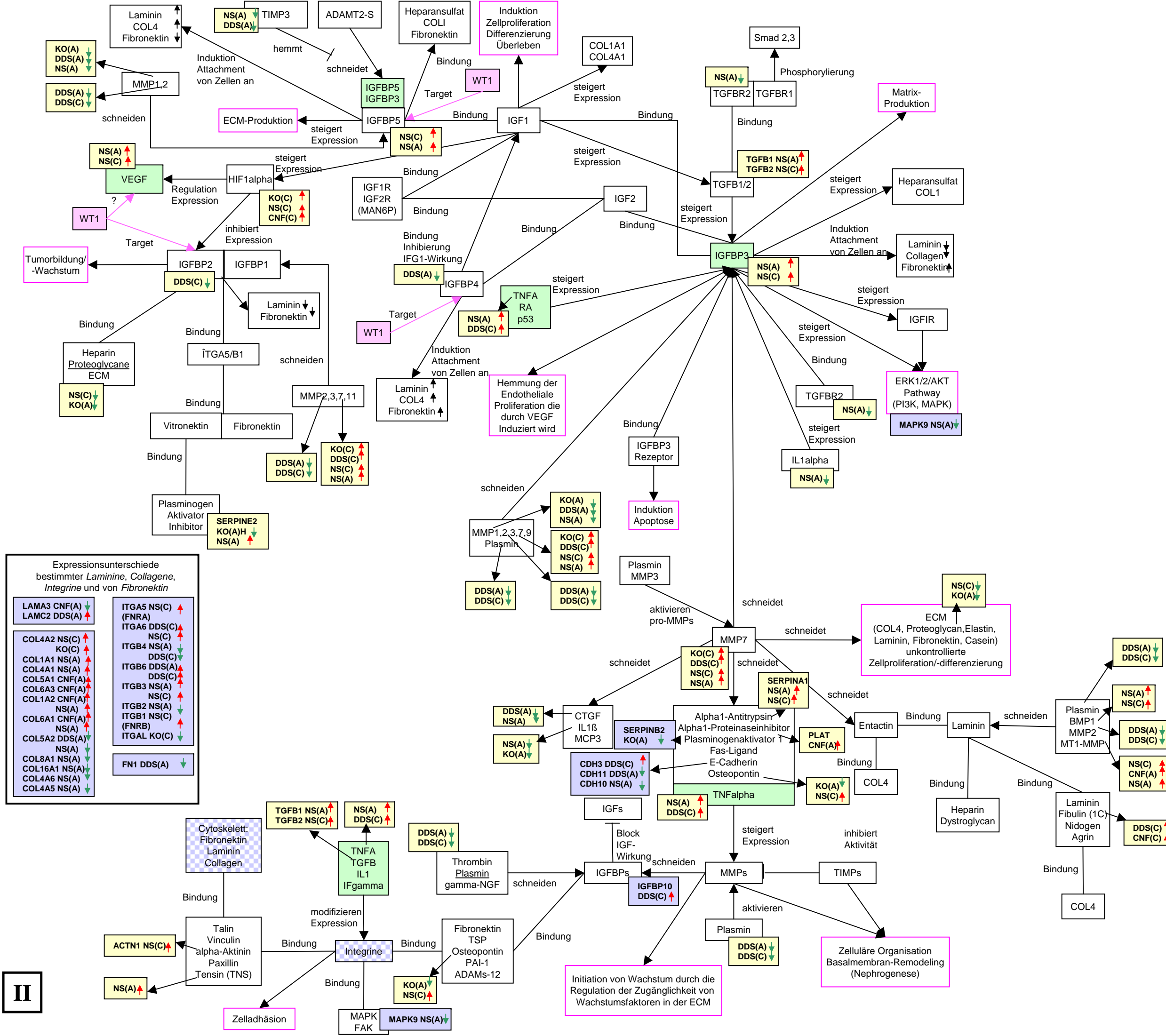
Entwicklung/
Aufrechterhaltung von Geweben;
Differenzierung

epitheliale
mesenchymale
Transition



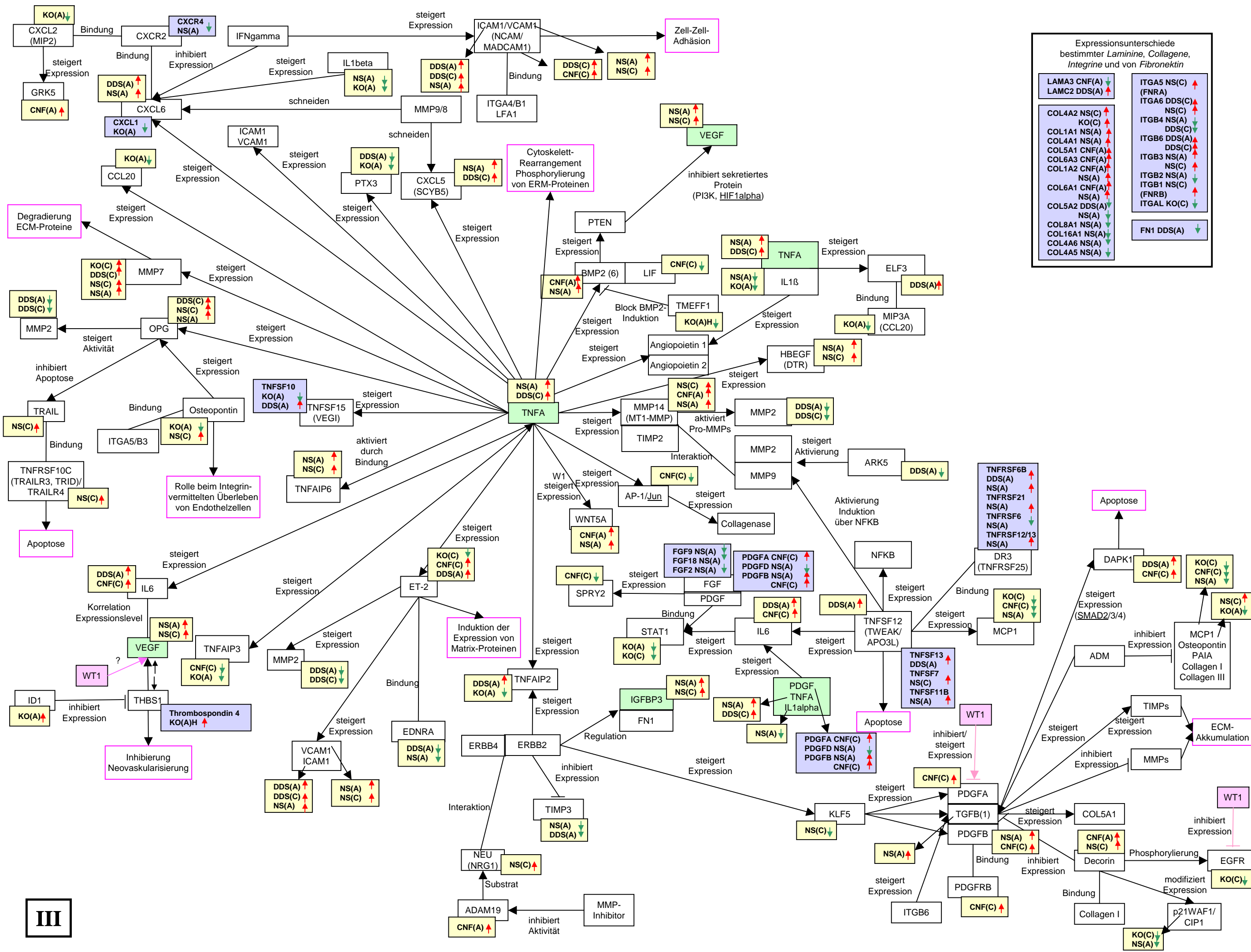
Expressionsunterschiede bestimmter *HOX*-, *WNT*- und *PBX*-Gene

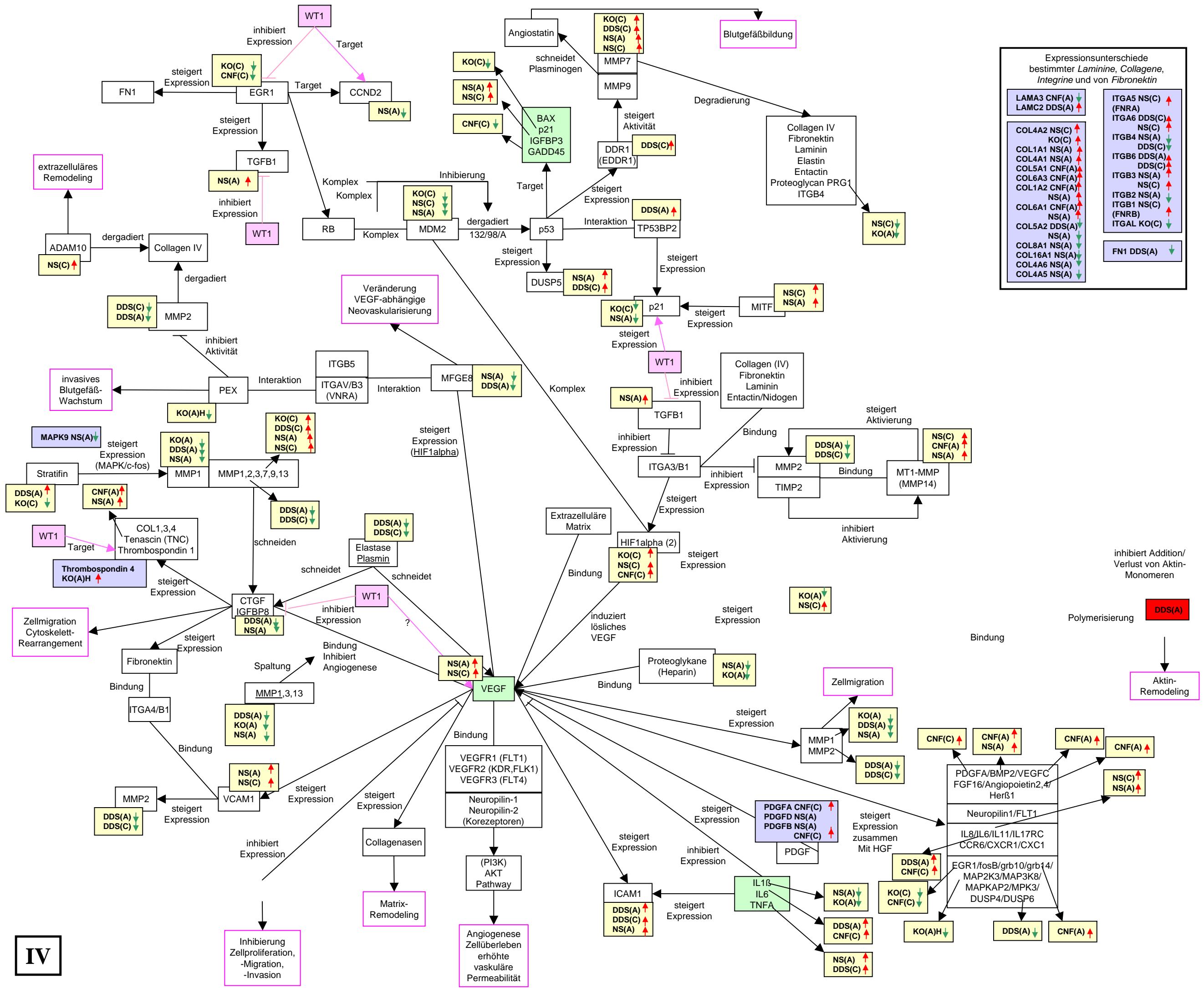
HOXA10 NS(A) ↑	WNT13 NS(C) ↑
HOXB6 NS(A) ↑	WNT5a NS(A) ↑
HOXA11 NS(A) ↑	CNF(A) ↑
HOXA5 NS(A) ↑	WNT7A NS(C) ↓
HOXB7 NS(A) ↑	NS(A) ↓
HOXD1 NS(A) ↑	
HOXA9 KO(A)H ↓	PBX3 NS(A) ↓
HOX7 NS(C) ↓	NS(C) ↓



Expressionsunterschiede bestimmter Laminine, Collagene, Integrine und von Fibronektin

LAMA3 CNF(A) ↓	ITGA5 NS(C) ↑
LAMC2 DDS(A) ↑	ITGA6 DDS(C) ↓
COL4A2 NS(C) ↑	ITGB4 NS(A) ↓
COL1A1 NS(A) ↓	ITGB6 DDS(A) ↓
COL4A1 NS(A) ↓	ITGB3 NS(A) ↓
COL5A1 CNF(A) ↑	ITGB2 NS(A) ↓
COL6A3 CNF(A) ↑	ITGB1 NS(C) ↓
COL1A2 CNF(A) ↑	ITGAL KO(C) ↓
NS(A) ↓	
COL6A1 CNF(A) ↑	
NS(A) ↓	
COL5A2 DDS(A) ↓	
NS(A) ↓	
COL8A1 NS(A) ↓	
COL16A1 NS(A) ↓	
COL4A6 NS(A) ↓	
COL4A5 NS(A) ↓	
	FN1 DDS(A) ↓





Expressionsunterschiede bestimmter Laminine, Collagene, Integrine und von Fibronektin

LAMA3 CNF(A) ↓	ITGA5 NS(C) ↑
LAMC2 DDS(A) ↑	(FNRA)
	ITGA6 DDS(C) ↑
	NS(C)
	ITGB4 NS(A) ↓
	DDS(C) ↓
	ITGB6 DDS(A) ↑
	NS(C)
	ITGB3 NS(A) ↓
	DDS(C) ↓
	ITGB2 NS(A) ↓
	NS(A)
	ITGB1 NS(C) ↓
	(FNRB)
	ITGAL KO(C) ↓
	FN1 DDS(A) ↓

Hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1A) ist ein Transkriptionsfaktor, der z.B. VEGFA als Angiogenesefaktor aktiviert (Kamura et al., 2000).

Inhibin alpha (INHA) (ein Wachstumsfaktor) ist ein direktes transkriptionelles Target von WT1 (Sim et al., 2002) und wird von WT1 negativ reguliert (Hsu et al., 1995). Es wurde in den Gonaden als Hormon identifiziert, das die FSH-Sekretion reguliert (Bremner, 1989).

Insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2)-Expression wird zu Beginn der frühen epithelialen Induktion eingeleitet und ist auf die sich entwickelnden Podozyten im reifenden Glomerulus beschränkt (Matsell et al., 1994).

Insulin like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) moduliert die mitogenen und metabolischen Effekte der IGFs (Cubbage et al., 1990). Adulte Glomeruli exprimieren kein IGFBP3. Diabetische Glomeruli zeigen jedoch eine erhöhte Expression von IGFBP3, auch begleitet von einer erhöhten IGFBP5-Expression (Park et al., 1998). Zudem kann IGFBP3 zur Produktion von extrazellulärer Matrix wie Collagen I und Fibronectin führen (Pilewski et al., 2005).

Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1), ein Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, findet man *in vivo* auf renalem Gefäßendothel (Pober und Cotran, 1991; Müller et al., 1991). Eine Induktion von ICAM1 wurde auf Mesangiumzellen bei FSGS (Del Canton et al., 1992) und parietalem und tubulärem Epithel bei der proliferativen Glomerulonephritis beschrieben (Bruijn und Dinklo, 1993; Adler und Brady, 1999; Arrizabalaga et al., 1998).

Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP2) ist für die Degradierung der Komponenten der extrazellulären Matrix von Bedeutung (Woessner, 1991; Matrisian, 1992 und 1994). Die MMP2-Expression ist während der Entwicklung im „capillary-loop“ Stadium auf die sich entwickelnden Podozyten und Parietalzellen beschränkt. Im adulten Glomerulus verschwindet die Expression ganz (Tanney et al., 1998).

Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7): Das Enzym MMP7 degradiert Heparansulfat-Proteoglycane der ECM und spielt eine Rolle bei Wundheilungsprozessen. MMP7 kommt bei physiologischen Prozessen in der Embryonalentwicklung oder bei Gewebe-Neuorganisation vor (Shiozawa et al., 2000; Obermüller et al., 2001).

Osteoprotegerin (OPG) schützt Endothelzellen vor Apoptose. Durch die Induktion von Apoptose in endothelialen Zellen kommt es normalerweise zur Inhibierung von alpha5beta3-Integrinen und damit zur Hemmung der Angiogenese (Malyankar et al., 2000).

p21 wird als Target von WT1 positiv reguliert (Englert et al., 1997). Bei experimenteller Glomerulonephritis ist ein Wiedereinstieg der Podozyten in den Zellzyklus mit einem Verlust der WT1- und p21-Expression assoziiert (Kim et al., 1999).

PAX2: PAX2 ist ein früher Regulator des sich entwickelnden Urogenitalsystems. Homozygot mutanten Mäusen fehlen die Nieren und der gesamte Genitaltrakt (Torres et al., 1995). Die Expression während der Nierentwicklung beschränkt sich auf das induzierte nephrogene Mesenchym. PAX2 wird als Target von WT1 negativ reguliert (Ryan et al., 1995).

SOX9 spielt als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle bei der männlichen Geschlechtsdifferenzierung von Säugern. Defekte in SOX9 sind mit einer XY Geschlechtsumkehr verbunden (Houston et al., 1983).

Tumor necrosis factor alpha (TNFA) ist ein wichtiger Vermittler von Apoptose, Inflammation und Immunität und ist in die Pathogenese vieler humaner Krankheiten, wie z. B. Diabetes und Krebs, involviert (Chen und Goeddel, 2002). Bei der experimentellen und humanen Glomerulonephritis findet man eine Erhöhung von TNFA. (Ortiz et al., 1995). Patienten mit FSGS und MCNS zeigen eine Korrelation von TNFA im Blut und dem Grad der Proteinurie, mesangialer Hyperzellularität und Glomerulosklerose (Bakr et al., 2003).

Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1) findet man als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül im Glomerulus auf den Parietalzellen exprimiert (Seron et al., 1991).

Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) ist ein Vermittler von Angiogenese und Vaskulogenese (Carmeliet, 2000). VEGFA induziert die Proliferation und die Verbreitung von adulten Endothelzellen und erhöht auch die glomeruläre Permeabilität von Kapillaren, teilweise durch die Fenestrierung (Roberts und Palade, 1995; Esser et al., 1998).

Mit verschiedensten Methoden wurden die oben beschriebenen Gene exemplarisch verifiziert (siehe Tabelle 5.25). In Abbildung 5.29 ist der biologische Zusammenhang der untersuchten Gene dargestellt.

Gen	SQ RT-PCR	Real-time RT-PCR (SYBRgreen)	Immun- histochemie (Paraffingewebe)	Immun- fluoreszenz (Zellen)	Western-Blot (Zellkultur- überstände)
COL4A2		x			
COL4A5	x				
EGR1		x [*]			
EMX2		x			
ENDT2	x				
Gremlin		x	x		
HIF1A		x			
ICAM1	x		x		
IGFBP2		x			
IGFBP3				x	x
INHA		x [*]			
MMP2		x			
MMP7			x		
OPG	x				
p21		x			
PAX2	x				
SOX9	x		x		
TNFA		x			
VCAM1	x		x		
VEGFA		x			

Tabelle 5.25: Zusammenfassung der Methoden zur Verifikation differentiell exprimierter Gene. * = Assay on demand Real-time RT-PCR (Applied Biosystems). SQ RT-PCR = semiquantitative RT-PCR.

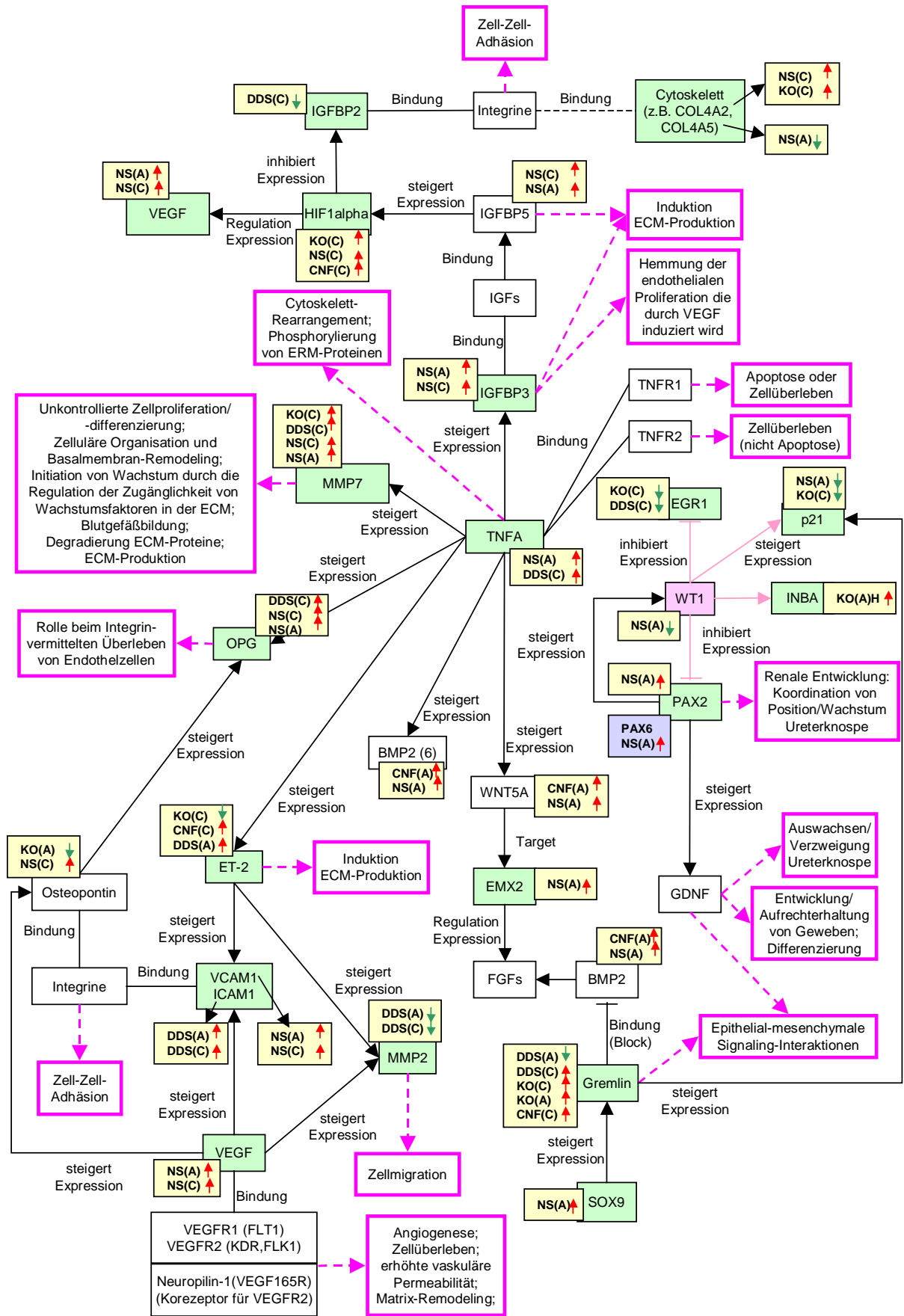


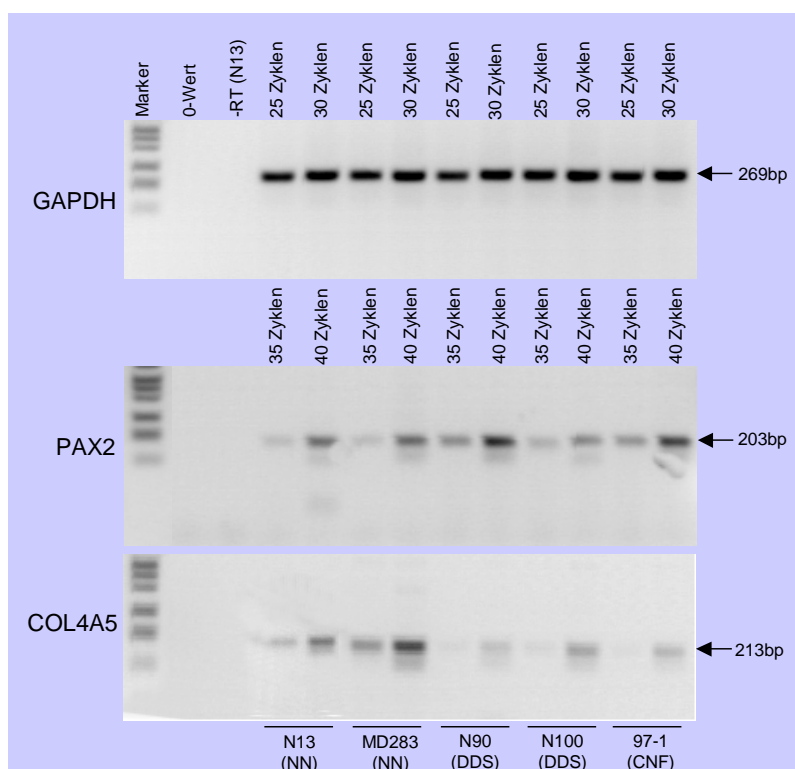
Abbildung 5.29 (siehe vorherige Seite): Verifizierte Gene (grüne Kästen) und deren biologischer Zusammenhang/biologische Funktion (Zusammenfassung der Abbildungen I-IV, siehe Seite 112ff) Ergebnisse der Array-Analysen = gelbe Kästen: (A) = Ergebnisse der Affymetrix-Arrays, (C) = Ergebnisse der Clontech-Arrays, Roter Pfeil = in den Arrays hochreguliert, Grüner Pfeil = in den Arrays herunterreguliert. DDS = in den Denys-Drash Patienten fehlreguliert, NS = in den DDS- und CNF-Patienten fehlreguliert, KO = im *WT1* Knock-down fehlreguliert. Funktion der Gene = Kästen mit rotem Rand.

5.5.2 Verifikation auf mRNA-Ebene

Verifikation differentiell exprimierter Gene mittels semiquantitativer RT-PCR

Für die semiquantitativen RT-PCRs wurden dieselben RNA-Extrakte wie für die Expressionsanalysen benutzt. Es wurden in die cDNA-Synthese ca. 500 ng Total-RNA eingesetzt. Im Anschluss an die cDNA-Synthese wurden direkt die verschiedenen PCRs durchgeführt. Dazu wurde jeweils 1/10 des cDNA-Ansatzes (50ng) auf die PCR-Reaktionen verteilt. Für *GAPDH* wurde nur 0,5 ng cDNA eingesetzt. Um auf Kontaminationen durch genomische DNA zu testen, wurde immer eine –RT-Kontrolle mitgeführt. Die optimierten RT-PCR-Programme und –Reaktionsansätze für die einzelnen Gene sind im Methodenteil 4.4.5 aufgelistet. Nach unterschiedlichen Zyklen wurde jeweils ein Aliquot (5-15 µl) der PCR-Produkte entnommen und auf ein 2- oder 3 %iges TAE-Agarosegel, je nach Produktgröße, aufgetragen. Zusätzlich zu den Genen *OPG*, *ICAM1*, *SOX9*, *PAX2*, *ENDT2*, *VCAM1* und *COL4A5* wurde auch die Expression von *GAPDH* als Housekeeper untersucht. Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte mit der AIDA Image Analysis 2.11-Software (Raytest) (siehe Methoden 4.4.5).

In Abbildung 5.30 sind beispielhaft die semiquantitativen RT-PCR-Analysen von *PAX2*



und *COL4A5* dargestellt.

Abbildung 5.30: Semiquantitative RT-PCRs am Beispiel von *PAX2* und *COL4A5*. *GAPDH* = Housekeeping-Gen. Größenmarker = DNA Molecular Weight Marker IV (Roche Applied Science). *PAX2* und *COL4A5*: 15µl PCR-Produkt nach 35 und 40 Zyklen entnommen. *GAPDH*: 10µl PCR-Produkt nach 25 und 30 Zyklen entnommen. –RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. 0 = 0-Wert der PCR-Reaktion. Bilder invertiert.

Dabei zeigt *PAX2* eine erhöhte Expression in den DDS- und CNF-Podozyten gegenüber den Kontroll-Podozyten (NN), während *COL4A5* in den Kontroll-Podozyten stärker exprimiert wird.

Alle untersuchten Gene zeigen die gleiche Expressionstendenz wie in den Arrays, wobei der Faktor aufgrund der unterschiedlich verwendeten Methoden variiert. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse ist in Tabelle 5.26 dargestellt.

	Arrays		SQ	Real-time RT-PCR		IHC	IF	WB
	Clontech	Affymetrix	RT-PCR	SYBRgreen	AOD	(Paraffin)	(Zellen)	(ZK-Überstände)
höher in NS/DDS/KO								
COL4A2	KO: 1,7	NS: 2,9		NS: 4,2				
EMX2		NS: 8,1			NS: 5,2			
ENDT2	KO: 1,6 ; CNF: 2,8	DDS: 4,7						
Gremlin	DDS: 1,6; KO: 2,1	KO: 1,7/ 4,8; DDS: 4,1	DDS: 4,0	NS: 2,0				
HIF1A	KO: 1,5; NS: 2,1			NS: 3,3; KO: 3,0				
ICAM1	DDS: 2,8	DDS: 2,7; NS: 2,9	DDS: 41,0			DDS hoch		
IGFBP3	NS: 14,4	NS: 20,2					NS hoch	NS hoch
INBA		KO(HEK): 1,7/ 2,1		KO: 2,9/ 18,6				
MMP7	NS: 3,7 ; KO: 1,7	NS: 4,6				DDS hoch		
OPG	NS: 2,8	NS: 6,2	DDS: 4,3					
PAX2		NS: 2,1	NS: 2,4					
SOX9		NS: 3,8	DDS: 4,8			DDS hoch		
TNFA	DDS: 6,9	NS: 2,2		DDS: 3,0				
VCAM1	NS: 4,6	NS: 8,7	NS: 3,1			DDS hoch		
VEGF	NS: 3,9	NS: 6,1		NS: 3,1				
niedriger in NS/DDS/KO								
COL4A5		NS: 5,2	NS: 5,4					
EGR1	DDS: 4,7 , KO: 2,5			KO: 20,5				
IGFBP2	DDS: 2,8			DDS: 4,4				
MMP2	DDS: 2,2	DDS: 2,9			DDS: 10,0			
p21	KO: 1,8	NS: 2,0		KO: 7,8				

Tabelle 5.26: Zusammenstellung aller Expressionsdaten aus unterschiedlichen Experimenten. Rot = in NS/DDS/KO niedriger exprimierte Gene. KO = Knock-down. SQ RT-PCR = semiquantitative RT-PCR. IHC = Immunhistochemie. IF = Immunfluoreszenz. WB = Western-Blot. AOD = Assay on demand. Angegeben sind die Faktoren der Expressionsunterschiede. NS = fehlregulierte Gene bei beiden nephrotischen Syndromen (DDS und CNF). DDS = fehlregulierte Gene bei Denys-Drash-Patienten. KO = fehlregulierte Gene im *WT1* Knock-down.

Verifikation differentiell exprimierter Gene mittels Real-time RT-PCR

Zur Verifikation der Arrays wurden einige Gene, die einen Expressionsunterschied ≥ 2 zeigten, mit Hilfe der Real-time RT-PCR untersucht. Zwei unterschiedliche Anwendungen standen hier zur Auswahl: zum einen die SYBRgreen Real-time RT-PCR (Sigma) und zum anderen die Assay on demand-Produkte (*EMX2*, *MMP2*) der Firma Applied Biosystems (siehe Methoden 4.4.5). Die Real-time RT-PCR Reaktionen wurde in Duplikaten, Triplikaten oder Quadruplikaten durchgeführt, wobei 50 ng Total-RNA in cDNA umgewandelt wurde. Zusätzlich zu den Genen *Gremlin*, *EMX2*, *TNFA*, *MMP2*, *VEGFA*, *HIF1A*, *IGFBP2* und *COL4A2* wurde auch die Expression von *GAPDH* oder *18S rRNA* als Housekeeping-Gen untersucht.

Die Abbildungen 5.31 und 5.32 zeigen als Beispiel der SYBRgreen- und Assay on demand Real-time RT-PCRs die Expression von *VEGFA* und *MMP2*. *VEGFA* zeigt dabei eine höhere Expression und *MMP2* eine niedrigere Expression in den DDS-Podozyten. Die Schmelzkurvenanalysen der SYBRgreen Real-time RT-PCRs waren notwendig, um eventuelle Primerdimere auszuschließen.

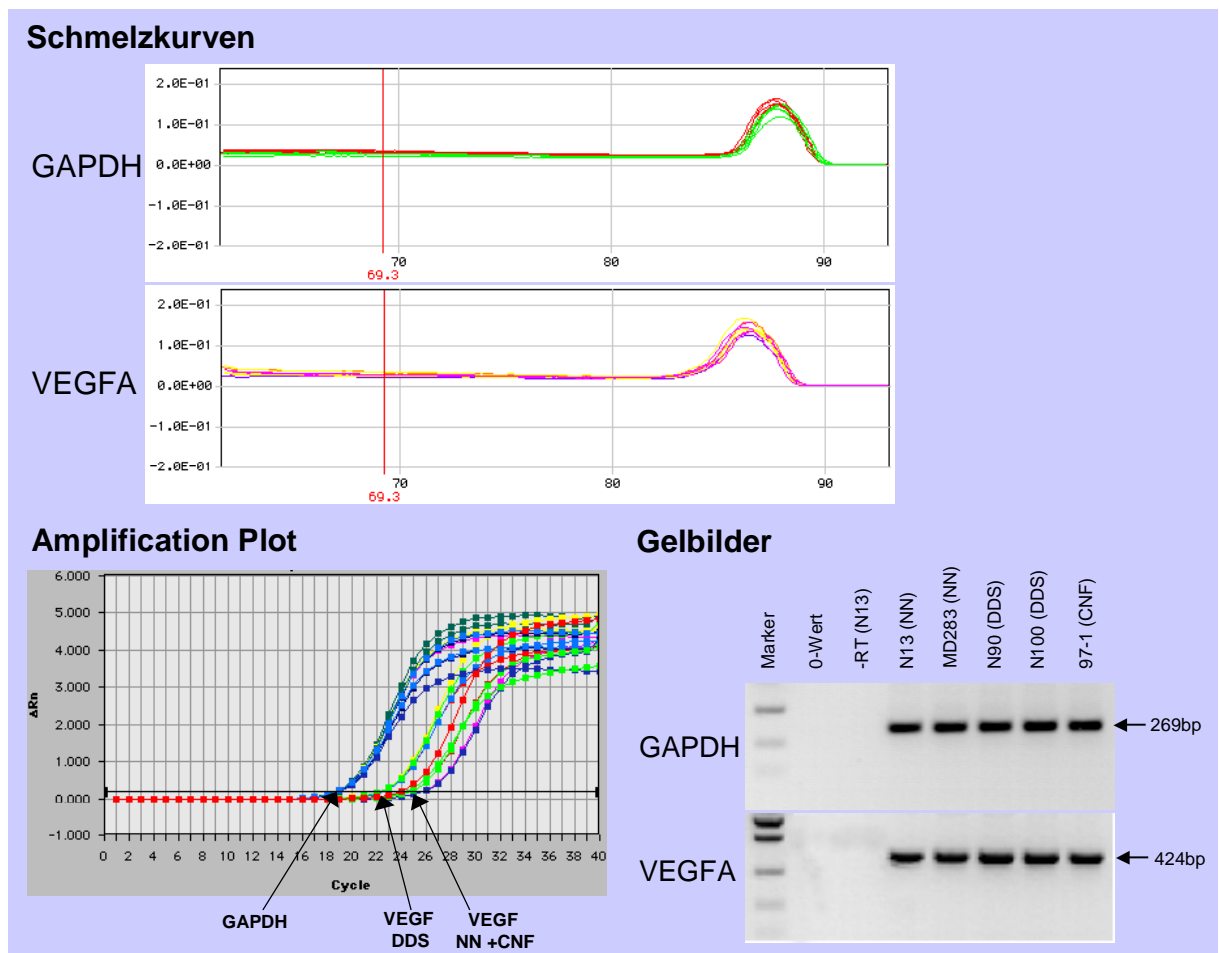


Abbildung 5.31: Ergebnisse der SYBRgreen Real-time RT-PCR für *VEGFA* und *GAPDH* als Housekeeping-Gen. Größenmarker = Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 0 = 0-Wert der PCR-Reaktion. –RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. Gelbilder invertiert. DDS = Podozyten der Denys-Drash Patienten. NN = Podozyten von Nieren nicht erkrankter Personen. CNF = Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ. Die Gelbilder dienen nur zur Bestimmung der richtigen Produktgröße. Unterschiede zwischen den Proben können hier nicht identifiziert werden, da sich die PCR-Reaktionen schon in der Plateau-Phase befinden.

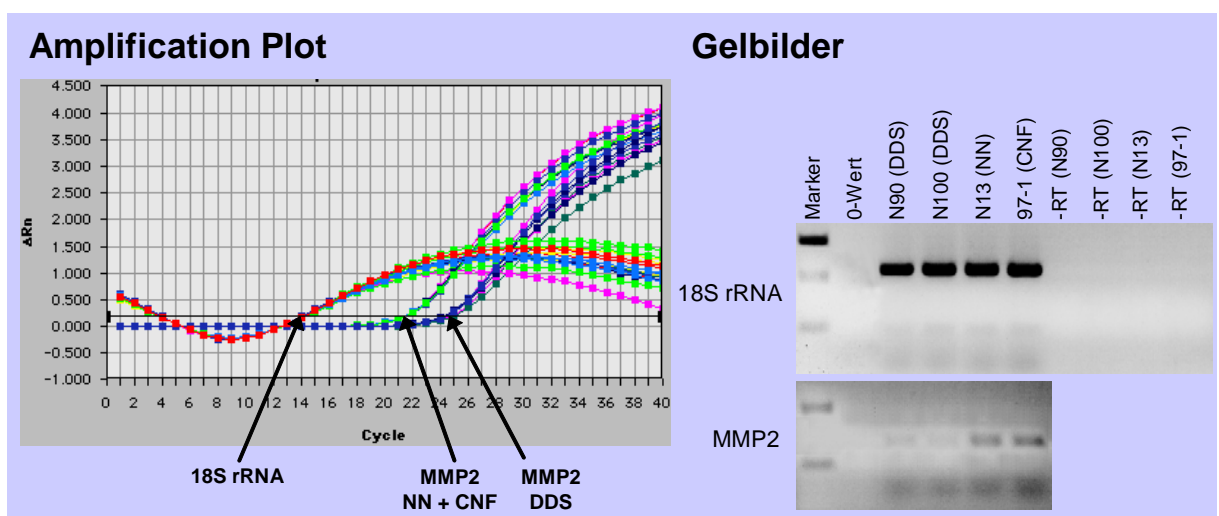


Abbildung 5.32: Ergebnisse der Assay on demand Real-time RT-PCR für *MMP2* und *18S rRNA* als Housekeeping-Gen. Größenmarker = PCR-Marker (New England Biolabs). 0 = 0-Wert der PCR-Reaktion. –RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. DDS = Podozyten der Denys-Drash Patienten. NN = Podozyten von Nieren nicht erkrankter Personen. CNF = Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ. Gelbilder invertiert. Die Gelbilder dienen nur zur Bestimmung der richtigen Produktgröße.

Die Ergebnisse aller Real-time RT-PCRs sind in Tabelle 5.26 zusammengestellt. Auch hier stimmten die Expressionstendenzen weitgehend mit denen der Arrayergebnisse überein, wobei auch hier der Faktor zwischen den beiden Methoden variierte.

Die einzige Ausnahme betraf die Verifikation von *Gremlin*. Während die DDS-Podozyten in den Affymetrix-Arrays eine 4,1-fach schwächere Expression zeigten, wiesen sie bei der Verifikation eine 2-fach höhere Expression auf. In Tabelle 5.27 sind alle *Gremlin*-Ergebnisse aus den Verifikationen der Expressionsanalysen, sowohl die der Zellkultur- als auch die der Knock-down Experimente, prozentual zusammengefasst. Die Berechnung ist im Methodenteil 4.4.5 beschrieben.

Gen	Zellkultur	C _T Mittelwert (+/-SDTF)	ΔC _T (C _T Gen - C _T GAPDH)	ΔΔC _T (ΔC _T - ΔC _T TK)	2 ^{-ΔCT}	% Expression
<u>WT1 Knock-down in N13T (Clontech)</u>						
GAPDH	K 48h	14,76(+/-0,04)				
	Lamin A/C 48h	14,87(+/-0,05)				
	WT1 48h	14,85(+/-0,06)				
Gremlin	K 48h	22,20(+/-0,07)	-7,43	0,00	1,00	100
	Lamin A/C 48h	22,16(+/-0,01)	-7,30	0,13	0,91	91
	WT1 48h	18,97(+/-0,15)	-4,12	3,31	0,10	10
<u>WT1 Knock-down in N13T (Affymetrix)</u>						
GAPDH	NegK 48h	17,55(+/-0,04)				
	WT1 48h	17,51(+/-0,12)				
	WT1 72h	17,94(+/-0,10)				
Gremlin	NegK 48h	20,39(+/-0,12)	2,84	0,00	1,00	100
	WT1 48h	18,11(+/-0,04)	0,61	-2,24	4,72	472
	WT1 72h	17,29(+/-0,02)	-0,65	-3,94	11,24	1124
<u>WT1 Knock-down in HEK293 (Affymetrix)</u>						
GAPDH	NegK 24h	15,23(+/-0,05)				
	WT1 24h	15,24(+/-0,03)				
	WT1 48h	15,47(+/-0,07)				
Gremlin	NegK 24h	28,96(+/-0,16)	13,73	0,00	1,00	100
	WT1 24h	28,84(+/-0,13)	13,60	-0,13	1,09	109
	WT1 48h	28,13(+/-0,25)	12,66	-1,07	2,10	210
<u>Gremlin-Expression in primären Podozyten-Kulturen (Affymetrix)</u>						
GAPDH	N13 (NN)	18,73(+/-0,01)				
	MD283 (NN)	18,83(+/-0,20)				
	N90 (DDS)	18,66(+/-0,08)				
	N100 (DDS)	18,73(+/-0,11)				
	97-1 (CNF)	18,76(+/-0,15)				
Gremlin	N13 (NN)	25,10(+/-0,66)	6,37	0,00	1,00	100
	MD283 (NN)	25,52(+/-0,23)	6,69	0,33	0,80	80
	N90 (DDS)	24,37(+/-0,28)	5,72	-0,65	1,57	157
	N100 (DDS)	24,39(+/-0,03)	5,66	-0,71	1,64	164
	97-1 (CNF)	23,92(+/-0,23)	5,16	-1,20	2,30	230

Tabelle 5.27: Berechnung der prozentualen *Gremlin*-Expression in primären Podozyten-Kulturen und nach *WT1* Knock-down. SDTF = Standardfehler. C_T = „threshold cycle“. Bei den Clontech-Filtern war *Gremlin* in DDS-Podozyten erhöht, wurde aber hier nicht verifiziert. NegK = Negativkontrolle mit *Lamin A/C* siRNA. K = Kontrolle ohne siRNA. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. NN = Podozyten von Nieren nicht erkrankter Personen. CNF = Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 5.33 (nur WT1 Knock-down) zeigt auf den Clontech-Filtern eine abnehmende Expression von *Gremlin* in den N13-Podozyten nach *WT1* Knock-down, während auf den Affymetrix-Arrays sowohl für die N13T-Podozyten als auch HEK293-Zellen die Expression ansteigt. Vergleicht man dieses konträre Ergebnis mit den Arrays der primären Podozytenzellkulturen, stellt man folgendes fest:

- Die erhöhte *Gremlin*-Expression in den DDS-Podozyten auf den Clontech-Arrays (wurde hier nicht verifiziert) sowie die Verifikation der Affymetrix-Arrays mit Real-time RT-PCR bestätigt die erhöhte Expression auf den Affymetrix-Arrays nach *WT1* Knock-down.
- Die niedrigere *Gremlin*-Expression in den DDS-Podozyten auf den Affymetrix-Arrays bestätigt die niedrigere Expression auf den Clontech-Filtern nach *WT1* Knock-down.

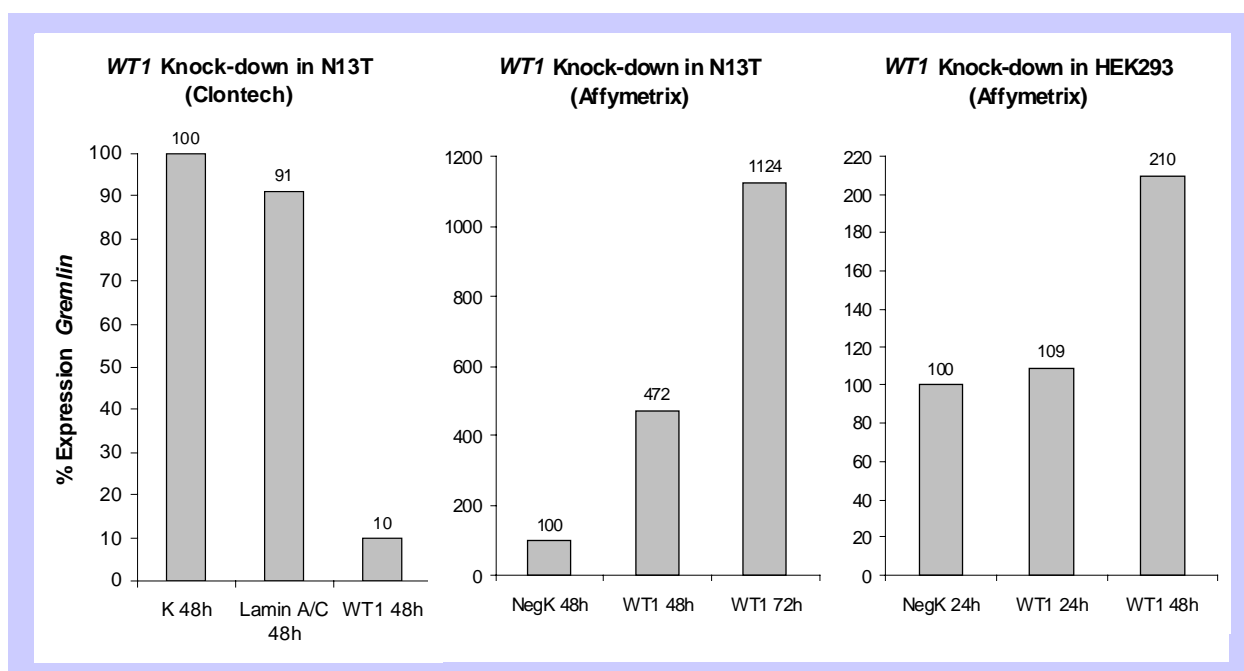


Abbildung 5.33: Darstellung der prozentualen *Gremlin*-Expression in den verschiedenen Knock-down Experimenten. K = Kontrolle ohne siRNA. NegK = Negativkontrolle mit *Lamin A/C* siRNA.

Einfluss von TNFA und IGFBP3 auf primäre Podozyten- und Mesangium-Zellkulturen

Aufgrund der erhöhten Expression von *TNFA* und *IGFBP3* in den DDS- bzw. NS-Podozyten (siehe Arrayergebnisse) wurde untersucht, wie sich die Expression von Matrixgenen unter TNFA- und IGFBP3-Gabe in Podozyten- und Mesangiumkulturen nicht erkrankter Personen ändert.

Dazu wurden Mesangiumzellen und die mit Telomerase transfizierten N13T-Podozyten in normalem Wachstumsmedium mit 10 % FCS gezüchtet, 24 h danach die Zellen mit HBSS gewaschen und in ein Medium mit 0,5 % FCS aufgenommen. Nach 72 h wurde wieder mit HBSS gewaschen und die Zellen entweder mit 10 ng/ml TNFA oder mit 100 ng/ml IGFBP3 in

	Gen	C _T Mittelwerte (+/- STDF)	ΔC _T (C _{T(Gen)} -C _{T(GAPDH)})	ΔΔC _T (ΔC _{TK} -ΔC _T)	2 ^{-ΔΔC_T}	% Expression	
<u>Mesangium</u>							
Kontrolle	GAPDH	15,18 (+/-0,04)					
	FN1	14,61 (+/-0,03)	-0,57	0,00	1,00	100	
	COL1A1	15,55 (+/-0,07)	0,38	0,00	1,00	100	
	Laminin beta 1	18,28 (+/-0,02)	3,12	0,00	1,00	100	
TNFA 48h	GAPDH	15,29 (+/-0,05)					
	FN1	14,68 (+/-0,06)	-0,61	0,04	0,97	97	
	COL1A1	15,46 (+/-0,06)	0,17	0,21	0,86	86	
	Laminin beta 1	18,38 (+/-0,14)	3,09	0,03	1,02	102	
TNFA 72h	GAPDH	15,25 (+/-0,06)					
	FN1	14,51 (+/-0,05)	-0,74	0,17	0,89	89	
	COL1A1	15,27 (+/-0,06)	0,02	0,35	0,78	78	
IGFBP3 48h	Laminin beta 1	18,23 (+/-0,11)	2,99	0,13	1,09	109	
	GAPDH	15,34 (+/-0,03)					
	FN1	14,73 (+/-0,18)	-0,62	0,04	0,97	97	
	COL1A1	16,12 (+/-0,25)	0,77	-0,40	1,32	132	
IGFBP3 72h	Laminin beta 1	18,60 (+/-0,19)	3,26	-0,15	0,90	90	
	GAPDH	15,47 (+/-0,15)					
	FN1	14,67 (+/-0,01)	-0,80	0,23	0,85	85	
	COL1A1	15,55 (+/-0,03)	0,08	0,30	0,81	81	
	Laminin beta 1	18,73 (+/-0,04)	3,26	-0,15	0,90	90	
<u>Podozyten</u>							
Kontrolle	GAPDH	15,37 (+/-0,14)					
	FN1	14,33 (+/-0,01)	-1,04	0,00	1,00	100	
	COL1A1	24,85 (+/-0,16)	9,48	0,00	1,00	100	
	COL6A1	29,45 (+/-0,05)	14,08	0,00	1,00	100	
	COL4A4	34,25 (+/-0,06)	18,88	0,00	1,00	100	
	LAMB1	18,94 (+/-0,10)	3,57	0,00	1,00	100	
TNFA 48h	GAPDH	15,29 (+/-0,02)					
	FN1	14,36 (+/-0,03)	-0,93	-0,11	1,08	108	
	COL1A1	24,84 (+/-0,31)	9,56	-0,08	0,93	93	
	COL6A1	31,28 (+/-0,11)	15,99	-1,91	3,76	376	
	COL4A4	34,32 (+/-0,13)	19,04	-0,16	0,90	90	
	LAMB1	19,02 (+/-0,04)	3,74	-0,17	0,89	89	
TNFA 72h	GAPDH	15,68 (+/-0,02)					
	FN1	14,26 (+/-0,06)	-1,42	0,38	0,77	77	
	COL1A1	24,66 (+/-0,05)	8,98	0,49	0,81	81	
	COL6A1	31,91 (+/-0,37)	16,24	-2,16	4,47	447	
	COL4A4	34,78 (+/-0,14)	19,10	-0,22	0,86	86	
	LAMB1	19,06 (+/-0,14)	3,38	0,19	1,14	114	
	IGFBP3 48h	GAPDH	15,25 (+/-0,05)				
		FN1	14,49 (+/-0,02)	-0,76	-0,28	1,21	121
COL1A1		25,71 (+/-0,04)	10,46	-0,98	1,97	197	
COL6A1		29,99 (+/-0,03)	14,74	-0,66	1,58	158	
COL4A4		34,74 (+/-0,29)	19,50	-0,62	0,65	65	
LAMB1		19,16 (+/-0,02)	3,91	-0,34	0,79	79	
IGFBP3 72h	GAPDH	15,51 (+/-0,12)					
	FN1	14,38 (+/-0,04)	-1,13	0,09	0,94	94	
	COL1A1	24,95 (+/-0,07)	9,44	0,04	0,97	97	
	COL6A1	31,22 (+/-0,07)	15,71	-1,63	3,10	310	
	COL4A4	35,03 (+/-0,03)	19,52	-0,64	0,64	64	
	LAMB1	19,07 (+/-0,02)	3,56	0,01	1,01	101	

Tabelle 5.28: Berechnung der prozentualen Expression von *FN1*, *COL1A1*, *COL6A1*, *COL4A4* und *LAMB1* in den mit TNFA und IGFBP3 behandelten N13T-Podozyten und Mesangiumzellen nach 48 und 72 Stunden. SDTF = Standardfehler. Kontrolle = unbehandelte Zellen. C_T = „threshold cycle“.

Medium mit 0,5 % FCS gezüchtet. Als Kontrolle dienten die Zellen ohne Zugabe der beiden Wachstumsfaktoren. 48 bzw. 72 h danach wurde RNA mit dem Micro-Prep Kit (Qiagen) isoliert.

In die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt. Zusätzlich wurden auch –RT-Kontrollen mitgeführt, um auf Kontaminationen mit genomischer DNA zu testen. Eine Quantifizierung erfolgte für Gene, die für Matrix-Proteine kodieren: *FN1*, *COL1A1*, *COL6A1*, *COL4A4*, *LAMB1* und *GAPDH* als Housekeeper mit Hilfe der SYBRgreen Real-time RT-PCR (siehe Methoden 4.4.5). Dazu wurden 40 ng cDNA in die PCR-Reaktion eingesetzt. In Tabelle 5.28 sind die Ergebnisse zusammengestellt.

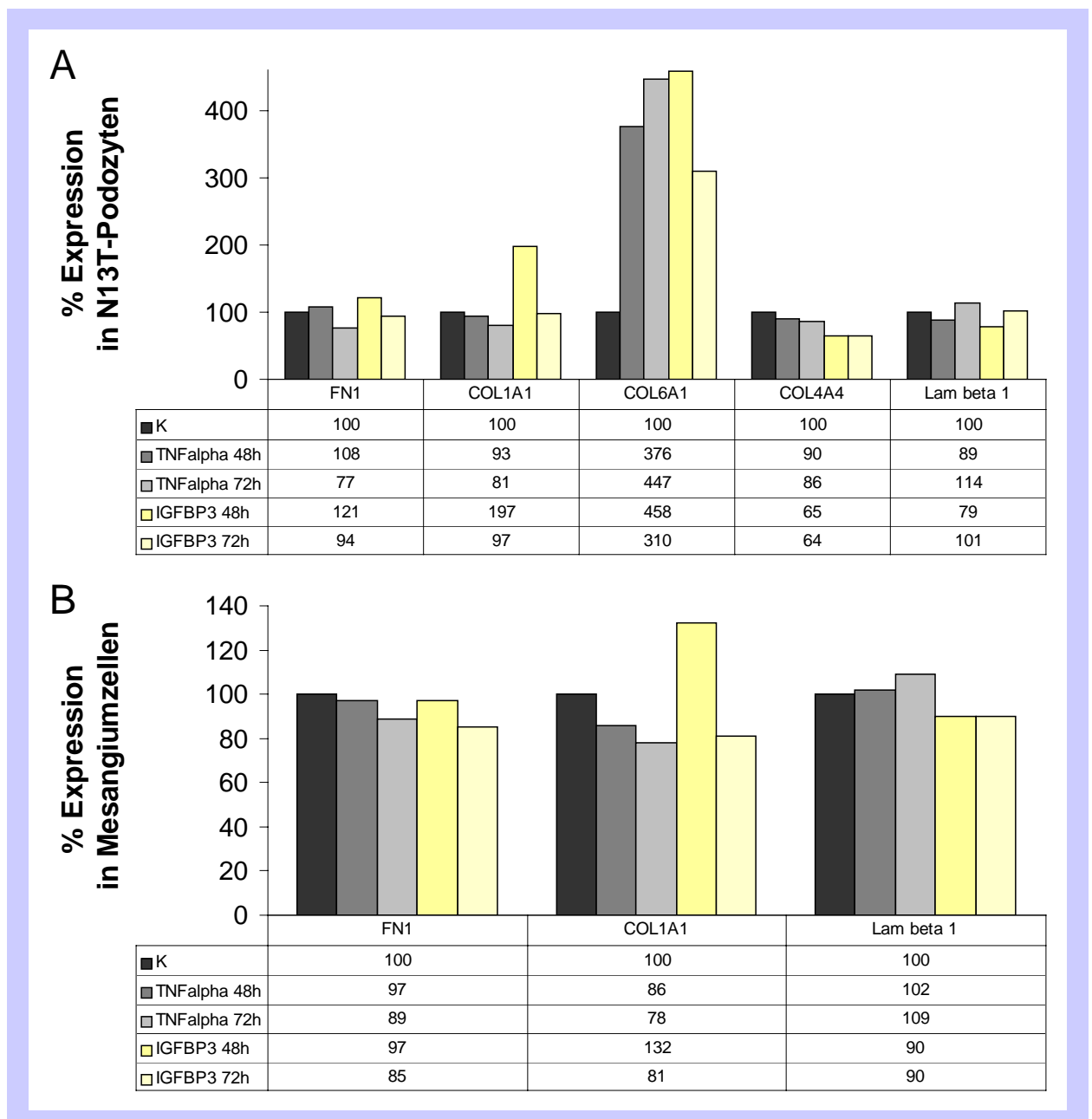


Abbildung 5.34: Prozentuale Expression von *FN1*, *COL1A1*, *COL6A1*, *COL4A4* und *LAMB1* in den mit TNFA und IGFBP3 behandelten N13T-Podozyten und Mesangiumzellen nach 48 und 72 Stunden. K = unbehandelte Zellen, deren Expression gleich 100% gesetzt wurde.

Bei den Mesangiumzellen konnten nur *FN1*, *COL1A1* und *LAMB1* untersucht werden, da eine Expression von *COL6A1* und *COL4A4* nicht nachgewiesen wurde. Wie in Abbildung 5.34 zu erkennen ist, konnten weder TNFA noch IGFBP3 bei den Mesangiumzellen die Expression der Gene *Fibronektin 1*, *COL1A1* und *Laminin beta 1* steigern. Lediglich 48 h nach Gabe von IGFBP3 findet man eine leicht erhöhte Expression von *COL1A1* (132 %) gegenüber der Kontrolle (100 %), die nach 72 h schon wieder verschwunden ist. Bei den Podozyten hingegen findet man eine starke Steigerung der Expression von *COL6A1* durch TNFA (376 bzw. 447 %) und IGFBP3 (158 bzw. 310 %) und auch eine Steigerung von *COL1A1* (197 %) durch die Gabe von IGFBP3. IGFBP3 konnte jedoch keine Steigerung der Expression von *FN1*, *COL4A4* und *LAMB1* bewirken.

Expression der beiden TNFA-Rezeptoren *TNFR1* und *TNFR2* auf Mesangiumzellen und Podozyten

Aufgrund der stark erhöhten Expression von *TNFA* in den DDS-Podozyten (siehe Clontech-Arrays) und der unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden, die TNFA durch die beiden Rezeptoren *TNFR1* und *TNFR2* auslösen kann, wurde untersucht, ob es bei DDS-Podozyten eine veränderte Verteilung dieser Rezeptoren gegenüber Podozyten nicht erkrankter Personen gibt (Chen und Goeddel, 2002; Al-Lamki et al., 2005). Als Kontrolle dienten Mesangiumzellen, die beide Rezeptoren exprimieren.

In die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA von Mesangiumzellen, Podozyten einer nicht erkrankten Person (N13) sowie von DDS (N90, N100)- und CNF-Podozyten (97-1) eingesetzt. Für die PCR-Reaktionen wurden 40 ng cDNA verwendet, für *GAPDH* nur 1/20 (siehe Methoden 4.4.5).

In Abbildung 5.35 ist zu sehen, dass *TNFR2* nur auf Mesangiumzellen zu finden ist, während *TNFR1* von Mesangiumzellen und Podozyten exprimiert wird.

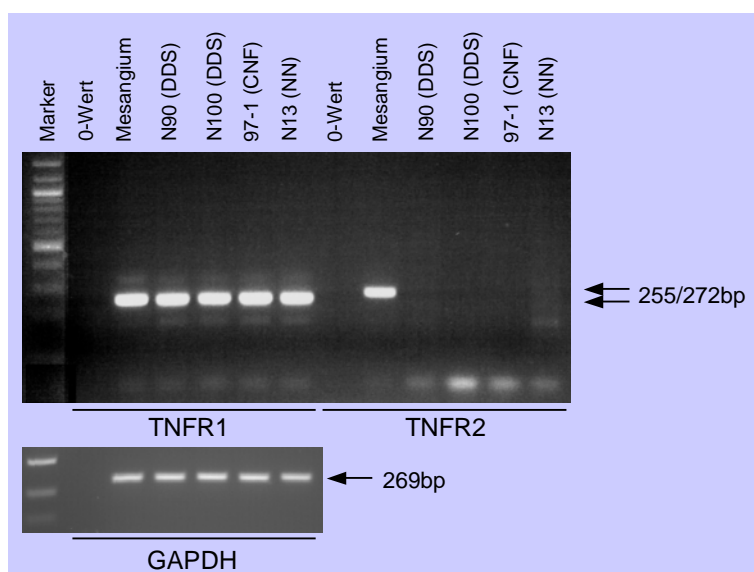


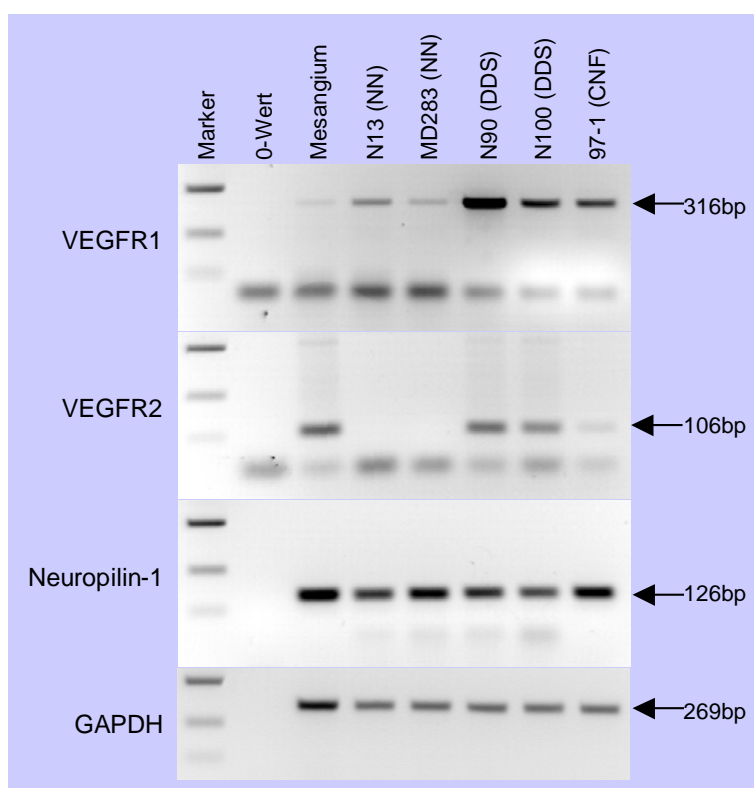
Abbildung 5.35: Ergebnisse der RT-PCR für *TNFR1* und *TNFR2* von Mesangiumzellen und Podozyten-Zellkulturen. Größenmarker für *TNFR1* und *TNFR2*: 100 Bp-Leiter (Biolabs). Größenmarker für *GAPDH*: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 0-Wert: Negativkontrolle der PCR mit H₂O. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Expression verschiedener VEGF-Rezeptoren auf Mesangiumzellen und Podozyten

Aufgrund der stark erhöhten Expression von *VEGFA* in den Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom (DDS und CNF) (siehe Clontech- und Affymetrix-Arrays) wurde untersucht, ob sich die Verteilung der Rezeptoren *VEGFR1*, *VEGFR2* und *Neuropilin-1* für *VEGFA* auf erkrankten Podozyten von den Kontrollen unterscheidet.

Für die semiquantitative RT-PCR wurde 1 µg RNA von Mesangiumzellen, Podozyten nicht erkrankter Personen (N13, MD283) sowie von DDS (N90, N100)- und CNF-Podozyten (97-1) in die cDNA-Synthese eingesetzt. In die PCR-Reaktionen wurden 40 ng cDNA eingesetzt, für *GAPDH* nur 1/20 (siehe Methoden 4.4.5).

Abbildung 5.36 zeigt das Ergebnis der RT-PCRs auf einem 2 %igen TAE-Agarosegel. Auffällig ist, dass *VEGFR1* und *Neuropilin-1* von allen Podozyten und Mesangiumzellen



exprimiert wird, während die *VEGFR2*-Expression auf die Mesangiumzellen und Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom beschränkt ist.

Abbildung 5.36: Ergebnisse der RT-PCR für *VEGFR1*, *VEGFR2* und *Neuropilin-1* von Mesangiumzellen und Podozyten-Zellkulturen. Größenmarker: Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). 0-Wert: Negativkontrolle der PCR mit H₂O. Bilder invertiert. NN = Podozyten nicht erkrankter Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

5.5.3 Verifikation auf Protein-Ebene

Immunhistochemische Analysen an Kryo- und Paraffinschnitten und Immunfluoreszenz an Podozyten-Zellkulturen

Die immunhistochemischen Analysen konnten mit Antikörpern gegen MMP7, SOX9, ICAM1 und VCAM1 an DDS- und adulten Nieren-Paraffinschnitten (Kontrolle) durchgeführt werden (siehe Methoden 4.6.5). Ziel dieser IHC-Analysen war, festzustellen, ob sich die Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene auch auf Protein-Ebene nachweisen lassen. Es ist

bekannt, dass Expressionsunterschiede auf mRNA-Ebene nicht immer mit der auf Protein-Ebene korrelieren (Spirin et al., 1999).

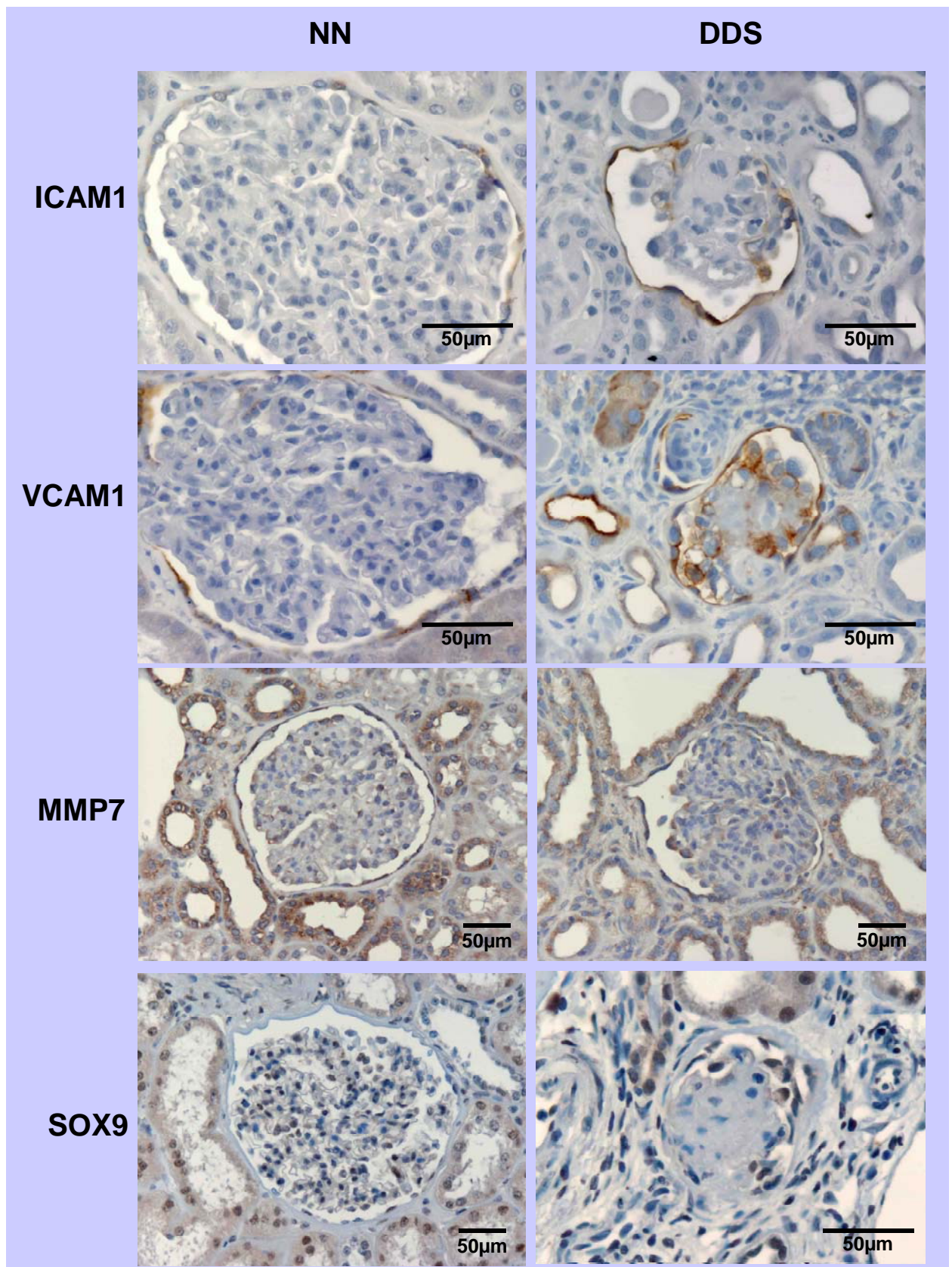


Abbildung 5.37: Immunohistochemische Untersuchungen von ICAM1, VCAM1, MMP7 und SOX9 am Beispiel einer nicht erkrankten (NN)- und einer DDS-Niere (DDS).

Abbildung 5.37 zeigt die Ergebnisse der Immunhistochemie, exemplarisch an jeweils einer nicht erkrankten- und einer DDS-Niere.

Die Expression für VCAM1 und ICAM1 ist in den adulten Glomeruli auf das Cytoplasma und vor allem die Membran der Parietalzellen beschränkt, während bei den DDS-Glomeruli eine deutliche Anfärbung auch in den Podozyten zu erkennen ist (laut Aussage von Dr. J. Becker, Pathologie Essen). Die Untersuchung für das MMP7-Protein bei den adulten- und DDS-Glomeruli zeigt eine intensivere cytoplasmatische Braunfärbung in den Podozyten der DDS-Gewebe. Auch bei der SOX9-Immunhistochemie kann man eine stärkere Kernfärbung der DDS-Podozyten gegenüber den Podozyten der adulten Niere erkennen.

Die Ergebnisse der Array-Analysen von *VCAM1*, *ICAM1*, *MMP7* und *SOX9* konnten hier somit auch auf Proteinebene bestätigt werden (vergleiche Tabelle 5.26, Seite 117).

Zusätzlich wurde die Expression von IGFBP3 an nicht erkrankten (= Kontrolle)-, CNF- und DDS-Podozyten in Kultur immunfluorimetrisch untersucht (siehe Methoden 4.6.5), da eine Färbung an Gewebe nicht erzielt werden konnte. Als Sekundäntikörper wurden FITC-konjugierte (Fluorescein Isothiocyanat) Antikörper benutzt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI.

Abbildung 5.38 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Auffällig ist eine starke cytoplasmatische Reaktivität in den CNF- und DDS-Podozyten gegenüber den Kontroll-Podozyten.

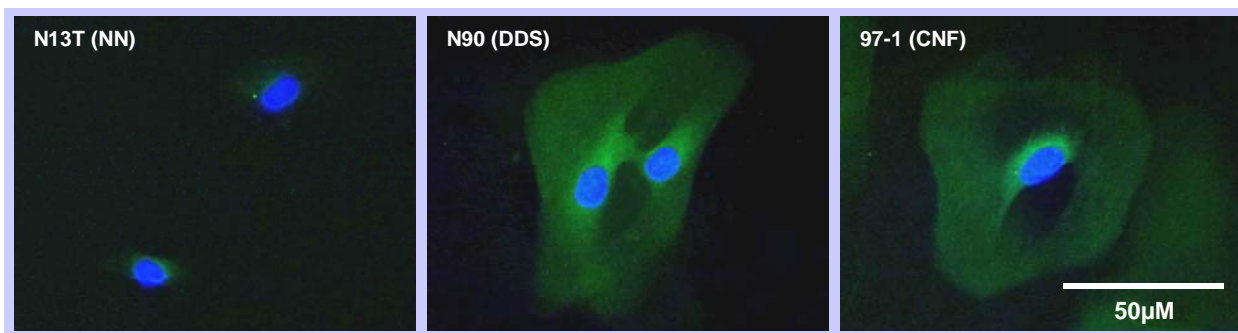


Abbildung 5.38: Immunfluoreszenz von IGFBP3 an Zellkultur-Podozyten. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person. DDS = Podozyten eines Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Die Array-Ergebnisse für *IGFBP3* konnten hier also auch auf Proteinebene bestätigt werden (vergleiche Tabelle 5.26, Seite 117).

Western-Blot-Analysen

Zusätzlich zu den immunfluorimetrischen Daten wurde mit einem Antikörper gegen IGFBP3 die Menge an sekretiertem IGFBP3 in den Zellkulturüberständen von DDS-, CNF- und nicht erkrankten Podozyten (= Kontrolle) bestimmt.

Da es sich um Zellkulturüberstände handelte, war α -Tubulin als cytoplasmatisches Protein als Standard ungeeignet. Für die Western-Blot-Analyse wurde deshalb ein Protein-Extrakt von zwei Kontroll-, zwei DDS- und einer CNF-Zellkultur hergestellt, indem der Zellkulturüberstand bezogen auf $0,5 \times 10^4$ Zellen mit TCA gefällt, in 3 x Ladepuffer aufgenommen und auf ein Proteingel geladen wurde (siehe Methoden 4.6.2). Als Positivkontrolle diente ein Proteinextrakt von Blutplasma (Herstellung siehe Methoden 4.6.1).

In Abbildung 5.39 ist das Ergebnis des IGFBP3-Nachweises dargestellt. Unter Einbeziehung des mitgeführten Größenmarkers, konnten die Signale IGFBP3 (40 und 44 kDa) zugewiesen werden, wobei die 44 kDa-Form dem glykosylierten Protein entspricht. In den zwei Kontroll-Podozyten-Zellkulturen N13T und MD283 liegt die Proteinmenge unter der Nachweisgrenze. Demgegenüber zeigen die beiden DDS- und die CNF-Zellkulturen deutliche Signale, wenn auch recht unterschiedlich starke. Dabei zeigt die 40 kDa-Form immer eine sehr viel stärkere Expression als die 44 kDa-Form, während in der Plasmakontrolle beide Formen gleich stark exprimiert werden.

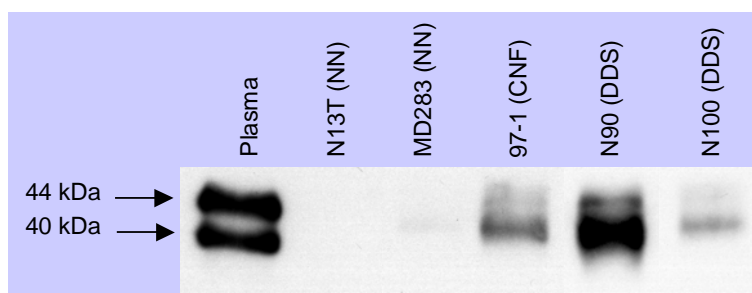


Abbildung 5.39: Ergebnisse der Western-Blot Analyse von Podozyten-Zellkulturen mit anti-IGFBP3. Plasma = Positivkontrolle. NN = Podozyten von nicht erkrankten Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Auch diese Ergebnisse bestätigen die Array-Untersuchungen und die oben beschriebene Verifikation mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Methode (vergleiche Tabelle 5.26, Seite 117)

Zusammenfassung der Array-Verifikationen

Die mittels fünf unterschiedlicher Untersuchungsmethoden gemessenen Expressionslevel sind in Tabelle 5.26 zusammengefasst (siehe Seite 117). Im Vergleich dazu sind auch die Daten der Array-Untersuchungen mit aufgeführt.

Die Arraydaten (Clontech und Affymetrix) konnten auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR für die Gene *COL4A2*, *EMX2*, *ENDT2*, *HIF1A*, *ICAM1*, *INBA*, *PAX2*, *VCAM1*, *VEGFA*, *COL4A5*, *EGR1*, *IGFBP2*, *MMP2* und *p21* tendenziell bestätigt werden. Dagegen zeigten sich *OPG*, *SOX9* und *TNFA*, die in den Affymetrix-Arrays als NS-spezifische Gene (= DDS und CNF) detektiert wurden, in den Verifikationen als DDS-spezifisch.

Bei *Gremlin* zeigte sich als einziges Gen ein Unterschied zwischen dem Ergebnis der Affymetrix-Analysen, bei denen es in den DDS-Podozyten um den Faktor 4,1 herunterreguliert war und der RT-PCR, bei der es in den NS-Podozyten (= DDS und CNF) um den Faktor zwei hochreguliert war.

Auf Protein-Ebene konnten die Array-Daten für IGFBP3, ICAM1 und SOX9 bestätigt werden. Auch die Daten für MMP7 und VCAM1 konnten zumindest für DDS bestätigt werden. CNF-Patienten wurden hier nicht untersucht.

5.5.4 Verifikation podozytärer und mesangialer Marker

Zusätzlich zu den zu Beginn der Arbeit schon feststehenden Podozytenmarkern sollten durch den Vergleich der Genexpression in Podozyten- und Mesangiumzellen mit Hilfe der Clontech-Arrays weitere Marker zur Charakterisierung der beiden Zelltypen gefunden werden, um in Zukunft noch besser zwischen den beiden Zelltypen unterscheiden zu können und um weitere Proteine zu finden, die in der Biologie der Podozyten- bzw. Mesangiumzellen eine wichtige Rolle spielen. Die Auswahl der zu verifizierenden Gene mittels semiquantitativer RT-PCR wurde aufgrund des hohen Expressionsunterschieds und deren schon bekannter Funktion oder Lokalisation getroffen (siehe Beschreibung der Gene unten).

Untersucht wurde die Expression der Gene *Osteopontin*, *NK4*, *ITGB3* als potentielle Podozytenmarker und *Decorin*, *IGF2*, *MMP2*, *Lumican*, *ITGA5* und *Endoglin* als eventuelle Mesangiummarker:

Osteopontin wird im Glomerulus von Podozyten und Parietalzellen exprimiert (Endlich et al., 2002).

NK4 und ITGB3 wurden aufgrund der hohen Expression in Podozyten (6,2-fach und 6,4-fach höher) ausgewählt.

Decorin gehört zur Gruppe der Proteoglycane und wird in Kultur von humanen glomerulären Mesangiumzellen exprimiert (Davies et al., 1992).

IGF2 wurde aufgrund der hohen Expression in den Mesangiumzellen (16-fach) ausgewählt.

MMP2 (eine Matrixmetalloproteinase) wird von Mesangiumzellen sekretiert (Martin et al., 1994).

Lumican gehört auch zu den Proteoglycanen und wird auch von Mesangiumzellen exprimiert (Schaefer et al., 2001).

ITGA5 wurde in Kolokalisation mit Tensin gefunden, das von humanen Mesangiumzellen exprimiert wird (Yamashita et al., 2004).

Endoglin wird in kultivierten humanen Mesangiumzellen exprimiert und spielt bei der Regulation der ECM-Level von Collagenen eine Rolle (Diez-Marques et al., 2002).

In die PCR wurden ca. 50 ng cDNA eingesetzt, für *GAPDH* als Housekeeping-Gen nur 1/20. Nach unterschiedlichen Zyklen wurden 5-15 µl PCR-Produkt entnommen und auf ein 2- oder 3 %iges TAE-Agarosegel, je nach Produktgröße, aufgetragen. Die semiquantitative Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels der AIDA 2.11-Software der Firma Raytest nach

Angaben des Herstellers. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR sind in Tabelle 5.29 dargestellt.

		Kontroll-Podozyten			DDS-Podozyten		CNF-Podozyten		
		MD283r	N13Tel	N13	N90	N100	97/1	HEK293	Mesangium
Podozyten-Marker	Osteopontin	+	+	+	+	+	+	-	-*
	NK4	+	+	+	+	+	+	-*	-*
	ITGB3	+	+	+	+	+	+	+	-*
Mesangium-Marker	Decorin	-	-	-*	-	-	-	-*	+
	IGF2	-	-	-	-	-	-	-	+
	MMP2	-	-	-	-	-	-*	-	+
	Lumican	-	-	-	-	-	-	-	+
	ITGA5	n.a.	n.a.	-*	-	-	+	-	+
	Endoglin	n.a.	n.a.	-*	+	+	-*	-*	+

Tabelle 5.29: Charakterisierung von Podozyten- und Mesangiumzellmarkern mittels semiquantitativer RT-PCR. + = RNA wird exprimiert. - = RNA wird nicht exprimiert. n.a. = nicht analysiert. * = PCR-Produkt erst bei Zyklus 40. Kontrollen = Podozyten von nicht erkrankten Personen. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Abbildung 5.40 zeigt exemplarisch die Gelbilder der semiquantitativen RT-PCR am Beispiel von *GAPDH* (als Housekeeper), *Osteopontin* (als Podozytenmarker) und *Decorin* (als Mesangiummarker).

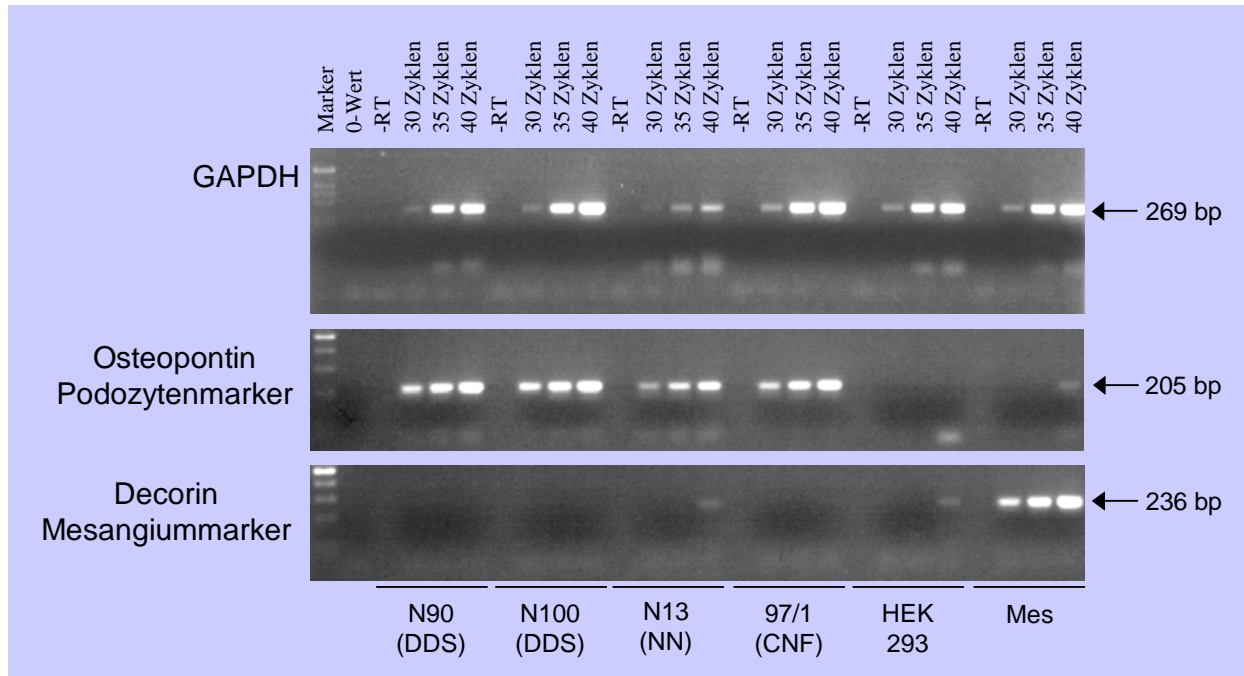


Abbildung 5.40: Gelbilder der semiquantitativen RT-PCR zur Charakterisierung von Podozyten- und Mesangiumzellmarkern am Beispiel von *GAPDH*, *Osteopontin* und *Decorin*. Größenmarker (*GAPDH*): 1 kB-Leiter von Invitrogen. Größenmarker (*Osteopontin*, *Decorin*): 100bp DNA Ladder von New England Biolabs. -RT = Ansatz ohne Reverse Transkriptase. 0-Wert = Negativkontrolle der PCR-Reaktion mit H₂O. NN = Podozyten einer nicht erkrankten Person. DDS = Podozyten von Denys-Drash Patienten. CNF = Podozyten eines Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ.

Alle untersuchten Podozyten-Zellkulturen zeigten eine spezifische Expression der Marker *Osteopontin* und *NK4*, die in den Mesangium- bzw. HEK293-Zellen nicht oder erst bei Zyklus 40 der PCR-Reaktion detektiert wurden und deshalb als typische podozytäre Marker angesehen werden können. Der untersuchte Marker *ITGB3* hingegen wurde sowohl bei Podozyten als auch bei den HEK293-Zellen nachgewiesen. Deshalb ist dieser nicht zur eindeutigen Charakterisierung von Podozyten geeignet.

Die untersuchten Marker *Decorin*, *IGF2*, *MMP2* und *Lumican* wurden nur bei den Mesangiumzellen nachgewiesen, während *ITGA5* und *Endoglin* auch in einem Teil der Podozyten nachgewiesen werden konnte. Sie sind deshalb nicht zur eindeutigen Charakterisierung von Mesangiumzellen geeignet.

6 Diskussion

Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass eine heterozygote Missense-Mutation im *WT1*-Gen eine diffuse mesangiale Sklerose (DMS) bei Denys-Drash Patienten (DDS) verursacht (Pelletier et al.; 1991, Smeets et al., 1996; Schumacher et al.; 1998, Yang et al., 1999). Die Mechanismen, die schließlich zu dem beobachteten dramatischen Phänotyp führen, sind jedoch weitgehend unbekannt.

Mittlerweile sind verschiedene Zielgene von *WT1* *in vitro* beschrieben worden: *IGFBP5* (Baudry et al., 2002), *TGFB1*, *PDGFA*, *IGF2* (Miyoshi et al., 2002), *Pax2*, *EGR1*, *WT1*, *CTGF*, *INHA*, *EGFR* (Sim et al., 2002), *GLEPP1*, *Vimentin*, *Synaptopodin* (Yang et al., 2002), *BCL2*, *Amphiregulin*, *p21* (Hastie, 2001) und viele mehr. Ob es sich dabei auch um physiologische Zielgene handelt, ist oft nicht bekannt. Die oben genannten Gene sind an Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben beteiligt. Die Fehlregulation dieser Gene könnte für die Wilms'-Tumor Entstehung und die Entstehung der diffusen mesangialen Sklerose verantwortlich sein. Bei einem anderen Teil der Zielgene handelt es sich um Proteine der extrazellulären Matrix und der Podozytenfußfortsätze, deren fehlgesteuerte Transkription direkt zu einer fehlerhaften glomerulären Filtrationsbarriere führen kann.

Es wird davon ausgegangen, dass es beim Denys-Drash Syndrom nicht nur 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. Es gibt zwei verschiedene Annahmen, wie das mutierte *WT1*-Protein die Vorgänge in der Zelle beeinflusst:

- a) Das mutierte *WT1*-Protein hemmt bei der Dimerisierung mit einem Wildtyp *WT1*-Protein dessen Funktion (dominant-negativ). Dies führt dazu, dass nahezu überhaupt kein Wildtyp *WT1*-Protein zur Verfügung steht. Wie in einigen Veröffentlichungen postuliert wurde (Moffett et al, 1995; Holmes et al., 1997; Patek et al., 1999), kann mutiertes *WT1* mit wildtypischem *WT1* Heterodimere bilden und somit zu einer Reduktion an funktionellem Protein führen.
- b) Die zweite Möglichkeit ist die Annahme eines *gain of function*. Dies würde bedeuten, dass das mutierte *WT1*-Gen ein Produkt bildet, das aufgrund einer Missensmutation im Zinkfinger-Bereich nicht mehr die üblichen *WT1*-Bindestellen erkennt, sondern an andere oder zusätzliche DNA-Sequenzen sowie auch an andere Protein-Interaktionspartner bindet.

Beide Annahmen gehen grundsätzlich davon aus, dass ein Protein von dem mutierten *WT1*-Allel gebildet wird, was jedoch noch nicht bewiesen wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollten Mechanismen, die bei der Pathogenese des *WT1*-assoziierten Denys-Drash Syndroms eine Rolle spielen, erforscht werden.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *WT1* Missense-Mutationen beim Menschen die terminale glomeruläre Reifung stören. Deshalb wurde zur Untersuchung der glomerulären Entwicklung in DDS-Patienten der Differenzierungsgrad der Podozyten und die Zusammensetzung der glomerulären Basalmembran untersucht.

Eine angenommene veränderte *WT1*-Funktion aufgrund einer DDS-Mutation hat wahrscheinlich wichtige Effekte auf die Expressionslevel von *WT1*-Zielgenen. Ein weiteres Hauptziel war es deshalb, Expressionsprofile von DDS-Podozyten und Kontrollen (Podozyten von Patienten mit nephrotischem Syndrom vom finnischen Typ und Podozyten nicht erkrankter Personen) zu erstellen, um fehlregulierte Gene aufgrund der *WT1*-Mutation zu identifizieren. Ergänzt wurden diese Versuche durch Expressionsprofile von immortalisierten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person und embryonalen immortalisierten Nierenzellen (HEK293) nach *WT1* Knock-down durch RNAi. Durch dieses Experiment sollten putative *WT1*-Zielgene gefunden werden, die in frühe Schritte der Erkrankung involviert sind. Ausgangspunkt war die Überlegung, dass die Expressionsprofile der primären Zellkulturen einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit entsprechen, da diese Zellen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stammten.

Für die Experimente mit den Zellkultur-Podozyten erfolgte dafür zuerst deren Charakterisierung auf RNA- und Protein-Ebene zur Bestätigung ihres podozytären Ursprungs.

Die Verifikation der Arrayergebnisse erfolgte dann mit verschiedensten Methoden auf der Ebene des Transkriptoms und Proteoms.

6.1 *WT1*-Missensemutationen führen zu einer gestörten glomerulären Reifung beim Denys-Drash Syndrom

Während der Nephrogenese führen reziproke Interaktionen zwischen dem metanephrischen Mesenchym und der Ureterknospe über mehrere Differenzierungsschritte („vesicles“, „comma-shaped bodies“, „s-shaped bodies“) zur Bildung von Glomeruli (Saxen und Sariola, 1978). Bei diesen Prozessen spielt *WT1* als Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle (Ribes et al., 2003). Der Glomerulus repräsentiert die Filtrationseinheit der Niere und beinhaltet eine selektive Ultrafiltrationsbarriere aus gefensterten Endothelzellen, der glomerulären Basalmembran (GBM) und den Fußfortsätzen der Podozyten mit ihrer Schlitzmembran. Einige Hauptkomponenten der GBM sind Collagen IV und Laminin, die während der Reifung der Glomeruli einen Wechsel in ihren Isoform-Ketten zeigen (Miner, 1998).

Während der Nierenentwicklung wird *WT1* zellspezifisch und auch zeitlich spezifisch exprimiert, wobei die beginnende Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms unabhängig von *WT1* ist (Donovan et al., 1999). Zum Zeitpunkt des Übergangs von Mesenchym zu Epithel steigt die *WT1*-Expression sehr stark im proximalen Teil der „s-shaped bodies“ an. Diese werden als Podozyten-Vorläuferzellen angesehen. Die Expression ist in der adulten Niere dann nur noch auf die Podozyten beschränkt (Armstrong et al., 1993; Mundlos et al., 1993).

Es gibt verschiedene Maus-Modelle, die vom kompletten Verlust von *WT1* (Kreidberg et al., 1993), reduzierten Mengen von *WT1* (Moore et al., 1999; Guo et al., 2002; Menke et al., 2003), Mäusen, die nur spezifische *WT1*-Isoformen exprimieren (Hammes et al., 2001; Natoli et al., 2002a; Natoli et al., 2002b), einer Maus mit einer heterozygoten Trunkierung (Natoli et al., 2002a; Patek et al., 1999; Patek et al., 2003) bis hin zum mutierten Protein reichen (Gao et al., 2004). All diese Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Nierenentwicklung und/oder Glomerulosklerose. Die verschiedenen Maus- sowie auch Organkultur-Modelle haben eine Kopplung der Nephrogenese und Glomerulogenese an bestimmte *WT1*-Level gezeigt (Kreidberg et al., 1993; Moore et al., 1999; Natoli et al., 2002a; Guo et al., 2002; Menke et al., 2003; Davies et al., 2004). Erstaunlicherweise zeigen Mäuse, die für die DDS Hotspot-Mutation R394W heterozygot sind (Little et al., 1993), keine Beeinträchtigung in der Nierenentwicklung und auch keine Gonadendefekte (Gao et al., 2004). Dagegen entwickeln Maus-Modelle mit reduzierten *WT1*-Mengen häufig eine Glomerulosklerose (Guo et al., 2002; Menke et al., 2003; Natoli et al., 2002a; Patek et al., 1999; Patek et al., 2003; Gao et al., 2004) und können interessante Einblicke in die Pathogenese der Erkrankung zeigen. Die Mechanismen, wie eine *WT1*-Missense-Mutation zur Glomerulosklerose führt, sind noch nicht richtig verstanden. Yang und Mitarbeiter demonstrierten eine anhaltende Expression von *PAX2* in den DDS-Podozyten und diskutierten Ähnlichkeiten zu *Pax2* transgenen Mäusen, die ein nephrotisches Syndrom entwickeln (Yang et al., 1999). Auch fanden sie einen Anstieg von *TGFbeta1* und *PDGFA* und eine abnehmende *GBM*-Expression der Heparansulfat-Ketten des Heparansulfat-Proteoglykans, was eine Verbindung mit der Proteinurie vermuten lässt (Yang et al., 2001). Patek und Mitarbeiter konnten einen Anstieg von *TGFbeta1* in einem „DDS“-Mausmodell zeigen (Patek et al., 2003). Hier handelte es sich aber um eine trunkierende Mutation im Bereich des dritten Zinkfingers und nicht um eine Missense-Mutation. In einem neuen Konzept der DDS-Glomerulopathie implizieren sie einen komplexen Mechanismus, der zur Eliminierung von Podozyten durch Apoptose und deren Ersetzung durch tubuläre und / oder parietale Zellen führt (Yang et al., 2004).

6.1.1 Bestimmung der Podozytenreifung bei Denys-Drash Patienten

A) *WT1* als Marker für die Podozytendifferenzierung

Um herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen *WT1*-Missense-Mutationen in Exon 8 oder 9 und einer fehlerhaften terminalen glomerulären Reifung gibt, wurde das Reifungsstadium von Podozyten und der GBM in fötalen, kindlichen, adulten und DDS-Glomeruli untersucht. In den Podozyten wurden die relativen Mengen und die Verhältnisse der vier *WT1* mRNA-Isoformen quantifiziert. Frühere Arbeiten haben sich schon mit der Quantifizierung des Verhältnisses der vier *WT1*-Isoformen beschäftigt, die allerdings zu unterschiedlichen Ergebnissen aufgrund unterschiedlicher Methoden kamen (Haber et al., 1991; Brenner et al., 1992; Renshaw et al., 1997; Baudry et al., 2000). Auch sind die Verhältnisse der Isoformen der fötalen Nieren dort auf die globale Expression und nicht auf ein spezifisches Entwicklungsstadium, wie z.B. „s-shaped bodies“ oder „capillary-loop“ Stadien, bezogen. Deshalb wurden in dieser Arbeit spezifisch nur die „capillary-loop“ Stadien von zwei verschiedenen fötalen Nieren mikrodisssektiert (16. und 24. SSW) und die *WT1*-Expression dieses Stadiums mit mikrodisssektierten Glomeruli kindlicher, adulter und DDS-Nieren über Real-time RT-PCR verglichen. Zudem wurde auch die *WT1*-Expression in zwei Podozyten-Zellkulturen (nicht erkrankt und DDS) angesehen.

Verglichen mit den kindlichen und erwachsenen Glomeruli zeigen DDS-Glomeruli eine verzögerte Podozytenreifung. Während der normalen Glomerulireifung verändert sich die Expression aller vier Isoformen. Die höchste Expression kann in den kindlichen (60 Monate alten) Glomeruli festgestellt werden. Sie nimmt in den adulten Glomeruli wieder ab. Die Isoformen A (-/-), B (+/-) und D (+/+) steigen zwischen der 16. und 24. SSW an, danach aber nur noch sehr schwach. Dies lässt vermuten, dass diese eine wichtige Rolle in der frühen Podozytendifferenzierung spielen. Betrachtet man das Verhältnis, repräsentiert die +KTS-Isoform D (+/+) die häufigste Isoform im „capillary-loop“ Stadium, was wiederum zu der Annahme einer wichtigen Rolle in der frühen Podozytendifferenzierung führt. Im Gegensatz dazu steigt die Expression der +KTS-Isoform C (-/+) stetig zwischen der fötalen und der kindlichen Niere an und repräsentiert dann die stärkste Isoform in den kindlichen und adulten Glomeruli. Diese Isoform ist wahrscheinlich in der späteren Differenzierung und in der Aufrechterhaltung der Podozytenfunktion von großer Bedeutung. Die Wichtigkeit der +KTS-Isoformen für die Podozytenreifung und die Homöostase wird in Patienten mit Frasier-Syndrom deutlich, die eine Reduktion der +KTS-Varianten aufgrund von intronischen *WT1*-Mutationen zeigen und die zu einer Glomerulopathie im Erwachsenenalter führen (Barboux et al., 1997; Klamt et al., 1995). Außerdem zeigt ein Maus-Modell für das Frasier-Syndrom schwere Beeinträchtigungen der Podozyten-Fußfortsätze (Hammes et al., 2001).

Interessant ist, dass das Verhältnis der *WT1*-Isoformen C (-/+) / D (+/+) in den DDS-Glomeruli dem der „capillary-loop“ Stadien der fötalen Nieren ähnelt. Man weiß bis jetzt nur sehr wenig über die Funktion des alternativ gespleißten Exon 5, welches für 17 Aminosäuren kodiert und nur in Säugern gefunden wird (Kent et al., 1995). Es kann hier eine kontinuierliche Abnahme des + Exon 5/- Exon 5 Verhältnisses während der Entwicklung festgestellt werden, weshalb die + 17 Aminosäuren-Isoformen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in den frühen Schritten der Glomerulogenese spielen, während die – 17 Aminosäuren-Isoformen für die terminale Reifung und die Podozyten-Homöostase von Bedeutung sein könnten. Es wurde schon früher die Anwesenheit einer unabhängigen transkriptionellen Aktivierungsdomäne innerhalb der 17 Aminosäuren-Domäne gezeigt, die mit par4 interagiert und die Zellen vor Apoptose schützen kann (Richard et al., 2001). Während der Nierenentwicklung ist der Schutz vor Apoptose des metanephrischen Mesenchyms für die Bildung des Nephrons wichtig. Deshalb wäre es interessant zu bestimmen, ob hohe Level an + Exon 5 mRNA-Isoformen in der fötalen Niere für den Schutz des metanephrischen Mesenchyms vor Apoptose verantwortlich sind. In Konflikt mit dieser Hypothese stehen Daten, die von Natoli und Mitarbeitern publiziert wurden. Sie konnten keine Defekte in bis zu 7 Monate alten Mäusenieren, denen Exon 5 fehlt, nachweisen (Natoli et al., 2002b). Diese Daten führen zu der Vermutung, dass in Mäusen die 17 Aminosäuren keinen dramatischen Einfluss auf die Glomerulogenese haben, wobei Langzeitstudien noch laufen.

In den DDS-Patienten sind die Mengen aller vier *WT1* mRNA-Isoformen im Vergleich zu der kindlichen Kontrolle reduziert. Das Verhältnis gleicht dem des fötalen „capillary-loop“ Stadiums und führt zu der Hypothese einer Entwicklungsverzögerung der Podozyten. Betrachtet man die pathologischen Veränderungen der Podozyten, könnte die dramatische Reduktion der +KTS-Isoform C (-/+) eine Überlappung von DDS- und Frasier-Erkrankung bedeuten, die damit durch ähnliche molekulare Mechanismen verursacht würden. Zusätzlich zu einer reduzierten Expression der *WT1* mRNA, die mit Daten von Yang und Mitarbeitern übereinstimmen (sie fanden eine reduzierte Expression von *WT1* in der Immunhistochemie; Yang et al., 1999), konnte auch die Anwesenheit eines mutierten Transkripts bei DDS-Patienten nachgewiesen werden (Schumacher et al., 2007), das in einer dominant negativen Art auf Protein-Ebene wirken soll (Little et al., 1993; Moffett et al., 1995). Diese zwei Beobachtungen könnten zu einem dramatischen Verlust des funktionellen *WT1*-Proteins führen. Deshalb ist eine abnormale glomeruläre Entwicklung bei DDS-Patienten aufgrund des Verlustes von wildtypischem *WT1* sehr wahrscheinlich.

B) *VEGF165* als Marker für die Podozytendifferenzierung

Die Interaktion von Podozyten und Endothel ist für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der glomerulären Architektur und der glomerulären Filtrationsbarriere von großer Bedeutung. Eremina und Mitarbeiter konnten zeigen, dass VEGFA als Schlüsselsignal die Interaktion zwischen Podozyten und Endothel vermittelt (Eremina et al., 2003). Podozyten, die heterozygot für *VEGFA* sind, zeigen glomeruläre Reifungsdefekte, Glomerulosklerose (Eremina et al., 2006; Eremina et al., 2003) und ein „geschwollenes“ Endothel (Endotheliose), die man als Teil der renalen Läsion bei Präeklampsie-Patienten findet (Kincaid-Smith, 1991). Die Defekte bei Mäusen führen zum nephrotischen Syndrom und terminaler Niereninsuffizienz. Interessant sind die Ähnlichkeiten zwischen dem Phänotyp von *VEGFA*-heterozygoten Mäusen und Denys-Drash Patienten. Zusammen mit der Darstellung, dass WT1 die Expression von VEGFA während der normalen renalen Entwicklung kontrolliert (Gao et al., 2005), ist es fraglich, ob eine *loss of function*-Mutation im podozytenspezifischen *WT1*-Gen bei Denys-Drash Patienten in einer Deregulierung von VEGFA in den Podozyten resultiert, die dann zum DDS-Phänotyp führt. Zur Untersuchung einer möglichen gestörten Verständigung zwischen Podozyten und endothelialen Zellen habe ich die Expression von *VEGF165* untersucht, die eine Hauptisoform von *VEGFA* in Podozyten darstellt (Kretzler et al., 1998; Robert et al., 2000; Bates et al., 2002), von diesen sekretiert und durch Rezeptoren auf den Endothelzellen gebunden wird.

Es konnte gezeigt werden, dass während der fötalen Entwicklung die totale *VEGF165*-Expression am höchsten im „capillary-loop“ Stadium ist und danach abnimmt und dass ein Isoformen-Wechsel zugunsten der *VEGF165b*-Isoform stattfindet. Diese Isoform kann erstmals im „capillary-loop“ Stadium detektiert werden, steigt dann kontinuierlich an und zeigt die höchste Expression in den Glomeruli der adulten Kontrolle. Weiter wurde gezeigt, dass das Verhältnis der angiogenetischen stimulierenden (*VEGF165a*) und hemmenden *VEGF*-Isoform (*VEGF165b*) in den Glomeruli der DDS-Patienten mit denen der „s-shaped bodies“ in der fötalen Niere vergleichbar ist. Bei beiden kann ausschließlich die angiogenetische Isoform *VEGF165a* detektiert werden, während in den adulten Podozyten ein leichter Überschuss der anti-angiogenetischen Isoform *VEGF165b* zu finden ist.

Sich entwickelnde Podozyten exprimieren VEGF als wichtigsten Initiator für die glomeruläre Kapillarentwicklung. Die Sekretion von VEGF durch die unreifen Podozyten kann Angioblasten über deren VEGF-Rezeptoren anlocken, die dann die Bildung der Glomeruli ermöglichen. Podozyten exprimieren VEGF auch im voll ausgereiften Stadium weiter. Zusätzlich dazu findet man auch eine weitergeführte Expression der VEGF-Rezeptoren auf den glomerulären Endothelzellen. Deshalb vermutet man eine weitere Aufgabe von VEGF in den reifen Glomeruli, die über die Initiierung der glomerulären Kapillaren hinausgeht, wie z. B. die Aufrechterhaltung des Differenzierungsstadiums.

In der Literatur sind viele Krankheiten mit einer Hoch- oder Herunterregulation von VEGF beschrieben. Transgene Mäuse sterben einige Tage nach der Geburt mit renalen Blutungen (Eremina et al., 2003). Eine Inhibierung von VEGF *in vivo* mit Antikörpern oder löslichen Rezeptoren führt zum nephrotischen Syndrom bei erwachsenen Mäusen (Sugimoto et al., 2003). Die Inhibierung von VEGF in einem Glomerulonephritis-Modell führt zu einer verminderten glomerulären Reparatur (Ostendorf et al., 1999), während die Inhibierung von VEGF in Streptomycin-induzierten diabetischen Tieren zu einer Reduktion der Proteinurie führt (De Vriese et al., 2001). All diese Daten lassen vermuten, dass eine richtige VEGF-Balance für die glomeruläre Reparatur und Funktion von großer Bedeutung ist. Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war aber immer die Annahme einer proangiogenetischen Wirkung von VEGF-Isoformen.

Erst kürzlich konnten Cui und Mitarbeiter (2004) die anti-angiogenetische Isoform VEGF165b in Podozyten nachweisen, die zur Unterstützung der Hypothese einer neuen Funktion von VEGF in ausgereiften Glomeruli führt. Diese Isoform ist in Nierenzellkarzinomen und Prostatakrebs herunterreguliert. Sie inhibiert die VEGF165-vermittelte Endothelproliferation, -migration und Vasodilatation und ist *in vivo* nicht angiogenetisch. Außerdem ist sie die dominierende Isoform in differenzierten humanen Podozyten. Die Autoren stellten die Vermutung auf, dass es in den Podozyten gesunder Personen eine Balance zwischen den angiogenetischen und anti-angiogenetischen Isoformen gibt und dass es in dedifferenzierenden oder verletzten Podozyten zu einem Wechsel der inhibitorischen VEGF-Isoformen zu den angiogenetischen stimulatorischen Isoformen kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Hypothese, da in den DDS-Podozyten genau dieser Wechsel zu beobachten ist.

Besonders interessant ist der Isoformen-Wechsel von VEGF165 nach VEGF165b während der glomerulären Entwicklung und die parallele Änderung der Ratio der +KTS WT1 mRNA-Isoformen C nach D, was vermuten lässt, dass die +KTS Isoformen in den Spleißing-Prozess von VEGF165 involviert sein könnten. Die DDS-Patienten zeigen eine erhöhte Menge von totalem VEGF165, aber einen kompletten Verlust von VEGF165b, was beweist, dass der Isoformen-Wechsel betroffen ist und dies in einer gestörten Podozytenreifung resultiert.

6.1.2 Bestimmung der GBM-Reifung bei Denys-Drash Patienten

Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass es bei den Nierenglomeruli von DDS-Patienten auch zu einer fehlerhaften Reifung der GBM kommt. Diese wird durch Podozyten und Endothelzellen gebildet. Während der Entwicklung der GBM zeigen Collagen IV und Laminin einen Wechsel in ihren Isoform-Ketten (Miner, 1998). Der frühe Glomerulus exprimiert Collagen IV alpha 1,

alpha 2 und Laminin beta 1. Bei Reifung des Glomerulus kommt es zu einer Akkumulation von Collagen IV alpha 3-5 und Laminin beta 2 im „capillary-loop“ Stadium.

In den DDS-Glomeruli finden sich hohe Mengen von fötal exprimierter *Collagen IV alpha 1* und *Laminin beta 1* mRNA. Auch ist ein dramatischer Verlust von adult exprimiertem Collagen IV alpha 4- und Laminin beta 2 in den DDS-Glomeruli festzustellen, die normalerweise in großen Mengen in reifen Glomeruli exprimiert werden. Ein fehlerhaftes Muster der Collagen- und Laminin-Expression bei DDS-Patienten wurde auch schon von Yang und Mitarbeitern beschrieben. Sie zeigten einen Anstieg von Collagen IV alpha 1 und eine Akkumulation von Laminin beta 1, aber eine normale Expression von Collagen IV alpha 4 und Laminin beta 2 in den Glomeruli (Yang et al., 2001). Diese von meinen Untersuchungen abweichenden Ergebnisse könnten an unterschiedlichen Primärantikörpern liegen. Wie Ekblom und Mitarbeiter für die Laminin beta 1-Kette zeigten, können unterschiedliche Antikörper zu verschiedenen Färbeergebnissen führen (Ekblom et al., 1998). Die Diskrepanz zu den hier vorliegenden Laminin beta 2-Ergebnissen, die einen Verlust von Laminin beta 2 in den DDS-Glomeruli zeigen, kann allerdings nicht durch den Antikörper erklärt werden, da der gleiche Antikörper benutzt wurde. Jedoch wurden die Ergebnisse der Immunhistochemie auf RNA-Ebene über semiquantitative RT-PCR verifiziert, bei der auch nach 40 Zyklen kein Signal zu sehen war, so dass das hier erzielte Ergebnis auf RNA-Ebene bestätigt werden konnte.

Einige Hinweise führen zu der Vermutung, dass Collagen IV alpha 4 und Laminin beta 2 eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der GBM-Funktion spielen. Interessanterweise führen Mutationen in *COL4A4* (kodiert für Collagen IV alpha 4) zum Alport-Syndrom (Kashtan et al., 1999). Als eine Konsequenz der Abwesenheit von Collagen IV alpha 3-5-Ketten werden fötale Isoformen reexprimiert, wie z.B. Collagen IV alpha 1- und 2-, Laminin beta 1- und Laminin alpha 2-Ketten (Kashtan et al., 1992; Miner et al., 1996; Kashtan et al., 2001). Es findet zwar eine normale Glomerulogenese statt, letztendlich kommt es aber doch zu einer renalen Fehlentwicklung. Zenker und Mitarbeiter zeigten kürzlich, dass Mutationen in *LAMB2* (kodiert für Laminin beta 2) das Pierson-Syndrom verursachen, welches mit einem steroidresistenten kongenitalen nephrotischen Syndrom und einer diffusen mesangialen Sklerose assoziiert ist (Zenker et al., 2004). Diese Daten zusammen mit den Daten der mutanten Mäuse, denen Laminin beta 2 fehlt und die eine massive Proteinurie entwickeln (Noakes et al., 1995), geben Hinweise dafür, wie kritisch die Anwesenheit einer reifen GBM ist.

Es gibt auch Untersuchungen zu einer anderen Komponente des Glomerulus. Unser Kooperationspartner Dr. F. Eitner (Nephrologie, Aachen) untersuchte im Rahmen dieses gemeinsamen Projektes das Reifungsstadium von Mesangiumzellen mit alpha smAktin als Marker. Dieses Experiment zeigt, dass die Entwicklung der Mesangiumzellen in den DDS-Glomeruli abnormal verläuft (Schumacher et al., 2007). Während der Entwicklung kann man

alpha smAktin zuerst im Cytoplasma der einwandernden mesangialen Zellen in die „capillary-loop“ Stadien detektieren. In menschlichen Nieren ist die Expression auf aktivierte und/oder proliferierende mesangiale Zellen beschränkt. In kindlichen oder adulten Nieren findet man kein alpha smAktin in den Glomeruli. Bei Denys-Drash Patienten kann man alpha smAktin häufiger innerhalb der Glomeruli detektieren, was auf die Anwesenheit von aktivierten oder proliferierenden mesangialen Zellen hinweist. Dies könnte auf eine verzögerte Entwicklung oder eine Transdifferenzierung, wie in anderen glomerulären Erkrankungen gesehen, hindeuten. Zudem zeigen histopathologische Befunde von Denys-Drash-Patienten lichtmikroskopisch eine diffuse mesangiale Sklerose. Dabei kann man verschiedene Stadien unterscheiden, mit einem Gradienten vom Cortex zur Medulla, wobei die innersten Glomeruli am wenigsten betroffen sind (Habib et al., 1985; Habib et al., 1993). Durch Transmissions-Elektronenmikroskopie konnten massive Hyalinablagerungen mit Fibrin-ähnlichen Strukturen innerhalb der sklerotisierten Glomeruli und eine weitverbreitete Rückziehung der Podozyten-Fußfortsätze beobachtet werden (Schumacher et al., 2007). Dies ist auch mit Beobachtungen von Habib und Mitarbeitern zu vereinbaren (Habib et al., 1985). Zusätzlich dazu konnte auch „geschwollenes“ Endothel mit diffusem Verlust der Fensterung gefunden werden. Diese Daten führen zur Vermutung einer Störung der endothelialen Zell- und GBM-Reifung. Da das DDS-Krankheitsbild durch Mutationen im *WT1*-Gen, das nur in den Podozyten exprimiert wird, verursacht wird, sind die pathologischen Veränderungen vermutlich die Konsequenz der gestörten Podozyten und einer fehlerhaften Kommunikation zwischen Podozyten und endothelialen Zellen. Vermutet wird, dass der Verlust von *VEGF165b* in den DDS-Podozyten, der schon oben beschrieben wurde, eine Schlüsselrolle in diesem Prozess spielt. Die Hypothese basiert auf der Tatsache, dass eine Reduktion von totalem Vegf164 (Ortholog zum humanen VEGF165) in Maus-Podozyten zu Glomerulosklerose und pathologischen Veränderungen führt, die ähnlich den oben beschriebenen sind (Eremina et al., 2003). Hier wurde aber nicht zwischen der Vegf164a- und Vegf164b-Isoform unterschieden. Aufgrund der Ähnlichkeiten zum DDS kann aber vermutet werden, dass Teile des Maus-Phänotyps auf eine Reduktion von Vegf164b zurückzuführen sind.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass DDS-Glomeruli in Bezug auf spezifische Podozyten- und GBM-Marker unreif sind. Die Tatsache, dass verschiedene glomeruläre Komponenten (zusammen mit dem mesangialen Marker alpha smAktin und den beschriebenen histopathologischen Veränderungen beim DDS) betroffen sind, führt zur Favorisierung der Hypothese einer Entwicklungsverzögerung und nicht der der Transdifferenzierung. Die Ergebnisse zeigen zusammen mit den Literaturdaten eine komplexe Störung der glomerulären Entwicklung beim DDS, nämlich eine „Schwellung“ des endothelialen

Cytoplasmas, Fehlen oder Verlust der Fensterung, unvollständig verschmolzenen Basalmembranen mit dramatischer Abnahme von Collagen IV alpha 4- und Laminin beta 2-Ketten, die Anwesenheit unreifer Podozyten, die eine Rückziehung der Podozytenfüße zeigen und die Anwesenheit unreifer oder aktivierter Mesangiumzellen.

Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die komplexen histologischen Veränderungen beim Denys-Drash Syndrom durch ein verändertes Spleißen von *VEGF165* in den *WT1*-mutanten Podozyten ausgelöst worden sein könnte und zum Teil durch das Fehlen von *VEGF165b* zustande kommen, was zu einer gestörten Signalübermittlung zwischen Podozyten, Endothel- und Mesangiumzellen führt. Eine solche Störung der Signalübermittlung könnte bei der Entstehung der Endotheliose, der GBM- und Mesangium-Veränderungen eine zentrale Rolle spielen und letztendlich zu Glomerulosklerose führen. Die Podozyten könnten auf diese sekundären Effekte durch die Hochregulierung der stimulatorischen *VEGF165*-Isoform reagieren, was wiederum zur Erhöhung der glomerulären Permeabilität, zu Albuminurie und Akkumulation von mesangialer Matrix führen könnte. Dies wurde auch schon für die diabetische Nephropathie postuliert (Del Prete et al., 1998).

Ein verändertes Spleißen von *VEGF* könnte auch in andere Erkrankungen involviert sein. Bates und Mitarbeiter konnten zeigen, dass bei präeklampsischen Plazenten inhibitorische *VEGF*-Isoformen herunterreguliert werden, während es zu einer moderaten Hochregulierung der angiogenetischen stimulatorischen Isoformen kommt (Bates et al., 2006). Andere Studien zeigen bei der diabetischen Retinopathie einen Wechsel im Spleißen von inhibitorischer nach stimulatorischer Isoform (Perrin et al., 2005) und eine Herunterregulierung der inhibitorischen Isoform *VEGF165b* bei renalen Zellkarzinomen (Bates et al., 2002). Diese Beispiele beweisen die Wichtigkeit einer korrekten Balance zwischen stimulatorischen und inhibitorischen *VEGFA*-Isoformen. Diese Beobachtungen und die Phänotyp-Ähnlichkeiten zwischen DDS-Patienten und *VEGFA*-heterozygoten Mäusen lassen vermuten, dass ein Teil des Maus-Phänotyps auf ein Ungleichgewicht der *VEGF*-Isoformen Verhältnisse und die Reduktion der *VEGF164b*-Expression zurückzuführen ist.

Die hier gezeigten Daten zeigen, wie wichtig es ist, das Verhältnis zwischen stimulatorischen und inhibitorischen *VEGFA*-Isoformen bei Erkrankungen zu bestimmen, im Gegensatz zu bisherigen Versuchen, bei denen nur die gesamte *VEGFA*-Expression gemessen wurde. In Zukunft könnte die Bestimmung der verschiedenen Isoformen bei nicht übereinstimmenden Berichten helfen, die Rolle von *VEGF* bei glomerulären Erkrankungen zu lösen.

Es konnte hier ein erster mechanistischer Einblick gewonnen werden, wie eine aberrante *WT1*-Expression das *VEGF165*-Spleißing betreffen könnte und zu Glomerulosklerose bei DDS führt.

6.2 Charakterisierung von Podozyten-Zellkulturen

Die primären Nierenkulturen von DDS- und CNF-Patienten sowie normaler Kontrollen exprimieren podozytenspezifische Marker. Immunfluorimetrisch konnten die Proteine WT1, Vimentin, CD2AP und Podocin nachgewiesen werden und auf mRNA-Ebene *Synaptopodin*, *POD1*, *Nephrin* und *Densin*.

Es waren einige der untersuchten Zellen für Cytokeratin positiv, das in Podozyten nicht exprimiert wird. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Zellkulturen entweder mit nicht-podozytären Zellen verunreinigt sind oder sich die Zellen unter Kulturbedingungen verändern. Betrachtet man das positive Ergebnis der Cytokeratinfärbung in Zusammenhang mit der Tatsache, dass die Podozyten in Zellkultur sich – anders als *in vivo* – noch einige Male teilen können, ergibt sich eine dritte Erklärungsmöglichkeit. Es kann angenommen werden, dass in den Podozyten eine Rückdifferenzierung stattfindet, denn während der Nierenentwicklung sind die proliferierenden Zellen des kondensierenden Mesenchyms positiv für Cytokeratin. Mit zunehmender Reifung und Differenzierung nimmt die Cytokeratinexpression ab, bis schließlich in adulten Podozyten kein Cytokeratin mehr nachgewiesen werden kann. Diese dritte Möglichkeit könnte bei der Auswertung der Arrayanalysen ein Problem darstellen, da eine Rückdifferenzierung auch zu einem veränderten Expressionsmuster führen kann. Da aber alle bei den Arrayanalysen verwendeten Podozyten eine positive Cytokeratinfärbung zeigten und somit demselben Differenzierungsgrad angehören, kann dieser Punkt vernachlässigt werden.

Aufgrund der hier vorliegenden Ergebnisse kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass es sich bei den kultivierten Zellen hauptsächlich um Podozyten handelt.

Bestimmung neuer Podozyten- und Mesangium-Marker mittels Expressionsanalysen

Durch den Vergleich der Expressionsprofile von Podozyten und Mesangiumzellen sollten weitere Marker zur Charakterisierung der beiden Zelltypen aufgedeckt werden. Ein Teil der Expressionsdaten konnte mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR durch den Vergleich von Podozyten und Mesangiumzellen sowie die Hinzunahme von HEK293-Zellen verifiziert werden. Dabei wurden *Osteopontin* und *NK4* als typische podozytäre Marker und *Decorin*, *IGF2*, *MMP2* sowie *Lumican* als mesangiale Marker identifiziert. Von *Osteopontin* war schon bekannt, dass es podozytär exprimiert wird (Endlich et al., 2002), während *NK4* nur aufgrund des Expressionsunterschieds ausgesucht wurde. Von *Decorin*, *MMP2* und *Lumican* war auch schon eine mesangiale Expression aus der Literatur bekannt (Davies et al., 1992; Martin et al., 1994; Schaefer et al., 2001), während *IGF2* wieder aufgrund der hohen Expression in den Mesangiumzellen ausgesucht wurde. In Zukunft sollte die Expression dieser Gene auch *in vivo* auf Protein-Ebene bestätigt werden.

6.3 Expressionsprofile von Podozyten-Zellkulturen

Um Einblicke in die Pathogenese des Denys-Drash Syndroms (DDS) zu bekommen, wurden Expressionsprofile von primären Podozyten-Zellkulturen mit den Atlas-Arrays 3.6 der Firma Clontech und den 133A Affymetrix-Arrays erstellt. Durch die Analysen sollten differentiell exprimierte Gene identifiziert werden und damit mögliche Ursachen der Erkrankung. Bis jetzt kennt man nur einen Teil der Gene, die von WT1 reguliert werden. Inwieweit diese zur Entwicklung des DDS-Krankheitsbildes beitragen, ist oft noch unklar.

Für die Erstellung der Expressionsprofile standen primäre kindliche-, adulte-, DDS- und CNF-Podozytenkulturen zur Verfügung. Zu beachten waren einige Unterschiede bei der Erstellung der Expressionsprofile je nach verwendetem Array (Clontech oder Affymetrix). Zum einen wurde die RNA je nach Arraytyp mit zwei unterschiedlichen Kits extrahiert, zum anderen unterliegen Podozyten in Kultur artifiziellen Wachstumsbedingungen. Die unterschiedlich verwendeten Passagen und auch die Kulturdauer sowie Dichte können zur Veränderung der Expression einzelner Gene und ganzer Gengruppen führen (z.B. Interleukine, Cytokine, Interferone).

Auffällig ist, dass viele Ergebnisse von Clontech- und Affymetrix-Arrays bezüglich der DDS- und NS-spezifischen Gene (= DDS und CNF) gut übereinstimmen, während es bei den CNF-spezifischen Genen zwischen den beiden Auswertungen zu großen Differenzen kommt. Das liegt vor allem daran, dass nur eine CNF-Kultur für die Expressionsanalysen zur Verfügung stand.

Die identifizierten differentiell exprimierten Gene sind möglicherweise spezifisch auf die *WT1*-Mutation oder die *NPHS1*-Mutation zurückzuführen oder sekundär durch eine Podozytenschädigung bedingt und allgemein beim nephrotischen Syndrom (DDS und CNF) zu finden. Mit den Clontech-Arrays an sich konnten insgesamt 52 DDS-spezifische ($FC \geq 1,5$), 47 CNF-spezifische ($FC \geq 1,5$) und 129 NS-spezifische (DDS und CNF) differentiell exprimierte Gene ($FC \geq 2,0$) identifiziert werden, während mit den Affymetrix-Arrays 142 DDS-spezifische, 111 CNF-spezifische und 917 NS-spezifische Gene ($FC \geq 2,0$) gefunden wurden. Die Verifikation der Expressionsdaten erfolgte nur für DDS- und NS-spezifische Gene, da nur eine CNF-Kultur zur Verfügung stand. Weitere Expressionsanalysen an CNF-Kulturen müssen die hier erhaltenen Ergebnisse zuerst bestätigen, um Aussagen über einen Effekt der *NPHS1*-Mutation treffen zu können.

Von allen differentiell exprimierten Genen wurden exemplarisch 17 DDS- und NS-spezifische Gene mit verschiedensten Methoden auf mRNA- und Proteinebene verifiziert. Es wurden besonders die Gene betrachtet, die aufgrund einer Literaturrecherche in einem engen biologischen Zusammenhang zueinander stehen und für die Entstehung des DDS-Krankheitsbildes von Bedeutung sein könnten (vergleiche Abbildung 5.29, Seite 115). Bei fast

allen untersuchten Genen konnten die Expressionstendenzen der Arrays bestätigt werden. Die einzige Ausnahme betraf die Expression von *Gremlin*, das auf den Affymetrix-Arrays eine niedrige Expression in den DDS-Podozyten zeigte, während bei der Verifikation durch die quantitative SYBRgreen-RT-PCR eine höhere Expression in den DDS- und CNF- Podozyten im Vergleich zu den Podozyten nicht erkrankter Personen festgestellt werden konnte. Da sich die Array-Daten nicht immer bestätigen lassen, ist es wichtig, die Ergebnisse immer durch eine unabhängige Methode zu verifizieren. Von großer Bedeutung ist zudem die Verifikation *in vivo* auf Proteinebene, da eine veränderte Expression auf mRNA-Ebene nicht immer eine veränderte Proteinexpression zur Folge hat (Fink et al., 2002). Außerdem sollten *in vitro*-Untersuchungen immer *in vivo* bestätigt werden, um Differenzen, z.B. Zellkulturartefakte, auszuschließen. Auch auf Proteinebene *in vivo* konnte eine differentielle Expression von vier Genen bestätigt werden.

Biologische Relevanz der differentiell exprimierten Gene

Die differentiell exprimierten Gene, die als DDS-, CNF- und NS-spezifisch eingeordnet wurden, bieten aufgrund der unterschiedlichen Mutationen interessante Einblicke in die Pathogenese der beiden Krankheiten. Es konnten viele Gene gefunden werden, die bei beiden Erkrankungen differentiell exprimiert sind, aber nur wenige, die für die einzelnen Erkrankungen (DDS oder CNF) spezifisch sind, was zu der Vermutung führt, dass eine Schädigung der Podozyten selber, unabhängig von der primären Ursache, automatisch eine Kaskade sekundärer Prozesse auslöst, die bei beiden Krankheitsbildern sehr ähnlich ist. Nur die deregulierten Gene, die auf die *WT1*- oder *NPHS1*-mutierten Podozyten beschränkt sind, repräsentieren wahrscheinlich einen primären Effekt durch die spezifische Mutation.

Besonders interessant in diesem Zusammenhang ist die erhöhte Expression von *MT1-MMP* (auch *MMP14* genannt) in den DDS- und CNF-Podozyten, welches bei der Aufrechterhaltung der Schlitzmembran eine wichtige Rolle spielt (Gerke et al., 2005). Es scheint in die Abspaltung des extrazellulären Teils von NEPH2, einem mit Podocin, ZO-1 und Nephtrin interagierendem Schlitzmembranprotein, involviert zu sein. Eine erhöhte Aktivität von MT1-MMP und erhöhte Mengen des abgespaltenen NEPH2-Peptids im Urin konnten kürzlich von Gerke und Mitarbeitern bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Deshalb könnten erhöhte NEPH2-Spiegel im Urin von Patienten als ein neuer Biomarker für glomeruläre Erkrankungen und als Angriffspunkt neuer Therapiekonzepte dienen. Durch eine verstärkte Abspaltung der extrazellulären Domäne von NEPH2 bei DDS und CNF könnte die Interaktion von NEPH2 mit Nephtrin gestört werden und somit auch die Aufrechterhaltung der Schlitzmembran, was dann zu einer Rückziehung der Podozytenfüße und zu Proteinurie führen könnte. Diese Möglichkeit unterstreicht die Ähnlichkeit des DDS- und CNF-Krankheitsbildes. Diese Gemeinsamkeit zwischen beiden Krankheitsbildern resultiert dann möglicherweise in ähnlichen sekundären Effekten.

Die Ergebnisse der Arrayanalysen wurden in folgende vier Gruppen unterteilt:

- a) Zelladhäsions- und Cytoskelettproteine,
- b) Proteine, die bei der Angiogenese beteiligt sind,
- c) Proteine, die bei der ECM-Produktion eine wichtige Rolle spielen und
- d) Proteine, die für Differenzierungsprozesse während der Nierenentwicklung von Bedeutung sind.

Die im Folgenden unter diesen Punkten diskutierten differentiell exprimierten Gene spielen laut Literatur möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entstehung des nephrotischen Syndroms. Ihre biologische Vernetzung ist zum Teil in Abbildung 5.29 (siehe Seite 115) zusammengefasst.

A) Zelladhäsion und Cytoskelett

Bei den differentiell exprimierten Genen, die bei der Zelladhäsion und im Cytoskelett eine wichtige Rolle spielen, handelt es sich um *ITGA6*, verschiedene *Collagene*, um *VCAM1* und *ICAM1*, die hier als Beispiele diskutiert werden.

Das spezifische Integrin alpha6beta1 (*ITGA6/B1*) wird zu Beginn der Basalmembran-Entwicklung während der Nephrogenese vorübergehend auf den sich entwickelnden Podozyten exprimiert (Ekblom et al., 1998; Korhonen et al., 1990). Dieses Integrin dient als Rezeptor für Laminin alpha 1 (Falk et al., 1996). Die gefundene erhöhte Expression von *ITGA6* in den DDS-Podozyten (Clontech-Arrays) könnte auf eine unvollständige Ausreifung und eine nicht abgeschlossene Differenzierung der DDS-Podozyten hindeuten.

Bezüglich der differentiell exprimierten Collagene waren besonders *COL4A1*, *COL4A2* und *COL4A5* von besonderem Interesse. Während der Glomerulogenese bildet sich zuerst das Collagen IV alpha1-alpha2 Netzwerk im sich entwickelnden Glomerulus, später in der adulten GBM findet man nur noch Collagen alpha3-alpha4-alpha5-Ketten (Miner und Sanes, 1996; Harvey et al., 1998; Heidet et al., 2000). In den DDS und CNF-Podozyten konnte hier eine gesteigerte Expression von *COL4A1* (Affymetrix-Arrays) und *COL4A2* (Clontech-Arrays und Verifikation mittels Real-time RT-PCR) und eine verminderte Expression von *COL4A5* (Affymetrix-Arrays und Verifikation mittels semiquantitativer RT-PCR) gefunden werden, was wiederum auf eine unvollständige Ausreifung und eine nicht abgeschlossene Differenzierung der DDS- und CNF-Podozyten hindeutet. Interessanterweise führen Mutationen u.a. in *COL4A5* zum Alport-Syndrom (Barker et al., 1990; Mochizuki et al., 1994; van der Loop et al., 2000) (vergleiche mit 6.1.2). Elektronenmikroskopisch findet man beim Alport Syndrom eine irreguläre Verdickung und Multilaminierung der GBM (Atkin et al., 1988), die nur Collagen alpha1 und alpha2-Ketten enthält (Kalluri et al., 1997). Möglich ist, dass Änderungen in der GBM-Zusammensetzung zu einer Veränderung der Homöostase der GBM-Remodellierung führt, was durch Veränderungen in der Interaktion mit Zell-Adhäsions-Molekülen, wie z. B. Integrinen, verursacht wird (Sayers et al., 1999). Ein ganz ähnlicher Mechanismus könnte auch bei DDS für eine Verdickung der GBM verantwortlich sein.

Auch die beiden Zelladhäsions-Proteine ICAM1 und VCAM1 zeigten sich in den Expressionsanalysen als differentiell exprimiert. ICAM1 wird sehr stark von Monozyten und Lymphozyten exprimiert und ist *in vitro* auf Gefäßendothel, z.B. durch TNFA, hochreguliert (Pober und Cotran, 1991). Die Hochregulation von TNFA in den DDS-Podozyten könnte auch hier zu einer Hochregulation von ICAM1 in den DDS-Podozyten (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels semiquantitativer RT-PCR und Immunhistochemie) führen. Eine erhöhte ICAM1-Expression wurde auch schon auf kultivierten Podozyten der nekrotisierenden proliferierenden Glomerulonephritis (NCGN) nachgewiesen (Coers et al., 1994). Coers und Mitarbeiter gehen bei dieser Krankheit von einer Aktivierung der Podozyten im Prozess der lokalen oder systemischen Inflammation aus. Nach einer Aktivierung spielen sie durch die Expression von Adhäsions-Molekülen, die einen verlängerten Aufenthalt von inflammatorischen Zellen erleichtern, eine Rolle in der Aufrechterhaltung des inflammatorischen Prozesses.

Nicht nur TNFA, sondern auch VEGFA, das in den DDS- und CNF-Podozyten erhöht ist (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Real-time RT-PCR), kann die Expression von ICAM1 (Lu et al., 1999) sowie VCAM1 auf Gefäßendothelzellen erhöhen (Kim et al., 2001). Literaturdaten bezüglich einer podozytären Expression von VCAM1 liegen bis jetzt noch nicht vor. In der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine erhöhte VCAM1-Expression in den DDS- und CNF-Podozyten (Clontech- und Affymetrix Arrays sowie Verifikation mittels semiquantitativer RT-PCR und Immunhistochemie) detektiert, das eine ähnliche Funktion wie ICAM1 haben könnte.

Zusammengenommen könnten all diese Veränderungen in der Cytoskelett-Zusammensetzung und den verschiedenen Zelladhäsions-Molekülen zu einer gestörten Verankerung der Podozyten mit der GBM und letztendlich zu Proteinurie führen.

B) Angiogenese

Bei den Proteinen, die bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen und hier als differentiell exprimiert gefunden wurden, handelt es sich um VEGFA, HIF1A, IGFBP3, MMP1, MMP2, MMP14, TIMP3 und TGFB1.

Eine veränderte Expression bestimmter VEGFA-Isoformen in den DDS-Glomeruli wurde schon ausführlich im Diskussionsteil beschrieben (siehe Seite 136f). In den DDS- und CNF-Podozyten konnte zudem eine stark erhöhte Expression von VEGFA (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Real-time RT-PCR) detektiert werden. Aufgrund dieses Expressionsunterschiedes wurde zusätzlich untersucht, ob es eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren VEGFR1, VEGFR2 und *Neuropilin-1* auf Mesangiumzellen und Podozyten gibt. In der Literatur ist eine Expression der drei Rezeptoren auf Endothelzellen und für *Neuropilin-1*

sowie VEGFR1 auch auf Podozyten beschrieben (Eremina und Quaggin, 2004; Chen et al., 2004). VEGFR2 hingegen wurde bis jetzt noch nicht auf menschlichen Podozyten, sondern nur auf immortalisierten Maus-Podozyten nachgewiesen (Guan et al., 2006). Auch von Mesangiumzellen ist *in vitro* eine Expression von VEGFR1, VEGFR2 und Neuropilin-1 bekannt; allerdings konnte bis jetzt *in vivo* nur eine sehr schwache Expression von VEGFR2 auf Mesangiumzellen identifiziert werden (Thomas et al., 2000). Eine Expression von *VEGFR1* und *Neuropilin-1* wurde in dieser Arbeit in allen gesunden- und erkrankten Podozyten sowie den Mesangiumzellen nachgewiesen. Außerdem konnte hier auch die Expression von *VEGFR2* in beiden Zelltypen festgestellt werden. Interessant ist, dass eine *VEGFR2*-Expression aber nur in den DDS- und CNF- und nicht in den gesunden Podozyten gefunden wurde. Bekannt ist, dass durch die Rezeptoren unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert werden können. Die Aktivierung von VEGFR1 auf Endothelzellen führt zu Zellmigrationen und zur Rekrutierung von Monozyten (Sato et al., 2000; Esser et al., 1998; Clauss et al., 1996). VEGFR2 ist dagegen für die embryonale Vaskularisierung und Hämatopoese von Bedeutung. Adult spielt es eine Rolle bei der Endothelproliferation und –differenzierung (Neufeld et al., 1999; Millauer et al., 1993). Die Aktivierung von VEGFR2 inhibiert Apoptose durch den Phosphatidylinositol 3'-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg (Gerber et al., 1998). Neuropilin-1 hingegen fungiert als Korezeptor und fördert die Bindung einer spezifischen Isoform von VEGFA, nämlich VEGF165 an VEGFR2 auf Endothelzellen. (Fuh et al., 2000). Da in dieser Arbeit nicht zwischen der angiogenetischen Isoform VEGF165a und der inhibitorischen Isoform VEGF165b unterschieden wurde, ist es vorstellbar, dass ein Fehlen von VEGF165b in den DDS-Podozyten (wie schon unter 6.1.1 beschrieben) die Aktivität von VEGFR2 mindert und so die Apoptose der DDS-Podozyten gefördert wird. Die Arbeit von Fuh und Mitarbeitern (2000) erklärt auch die Expression von *Neuropilin-1* in den DDS- und CNF-Podozyten, die auch *VEGFR2* exprimieren. Was eine *Neuropilin-1* Expression in den Podozyten nicht erkrankter Personen bedeuten kann, die kein *VEGFR2* exprimieren, ist noch unklar. Vielleicht gibt es hier nur eine geringe oder transiente Expression von *VEGFR2*, die durch die verwendete Methode nicht detektiert wurde. Außerdem konnte schon für Brustkrebs-Zellen *in vitro* gezeigt werden, dass es ein VEGFR2-unabhängiges autokrines VEGF-Signaling gibt, das durch Neuropilin-1 vermittelt wird (Bachelder et al., 2001). Dieser Mechanismus könnte auch für die Podozyten nicht erkrankter Personen gelten.

Bei der vaskulären Entwicklung spielen auch HIF1 und HIF2 eine wichtige Rolle. Beide stimulieren die Expression von VEGFA und werden in der sich entwickelnden Niere und den Podozyten exprimiert (Freeburg et al., 2003). Während der Nierenentwicklung findet man eine starke HIF1A-Expression in sich entwickelnden Maus-Podozyten (Freeburg et al., 2003), wohingegen bei neugeborenen Mäusen kein HIF1A mehr gefunden wird. In den hier durchgeführten Expressionsanalysen konnte *HIF1A* in den DDS- und CNF-Podozyten (Clontech-Arrays und Verifikation mittels Real-time RT-PCR) als leicht erhöht identifiziert

werden. Dies könnte ein Hinweis auf eine unvollständige Ausreifung und eine nicht abgeschlossene Differenzierung der DDS- und CNF-Podozyten sein.

Auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), besonders MMP1, MMP2 und MMP14 (MT1-MMP), spielen eine wichtige Rolle bei der Angiogenese. Diese MMPs werden besonders für die Aktivierung und Freisetzung von VEGFA benötigt (Moses, 1997; Sounni et al., 2002). Ein Fehlen von MMP1 und MMP2 führt zu einer gestörten Angiogenese (Fisher et al., 1994; Rivilis et al., 2002; Lin et al., 2002). MMP14 spielt eine wichtige Rolle bei der Umstrukturierung von extrazellulärer Matrix, entweder durch deren direkte Degradierung oder indirekt durch Aktivierung von pro-MMP2 (Sounni et al., 2002). MMPs können außerdem an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden sein. Die Freisetzung dieser gebundenen MMPs wird zur Umstrukturierung der extrazellulären Matrix, zur Degradierung von Basalmembranen und Aktivierung und Freisetzung von VEGFA benötigt. Wie eine Deregulierung von MMPs die VEGFA-Verfügbarkeit verändern könnte, ist allerdings noch nicht geklärt (Eremina und Quaggin, 2004). Die Aktivität der MMPs kann entweder durch die oben genannte enzymatische Aktivierung von pro-MMPs oder durch Inhibierung der aktivierten MMPs durch endogene Inhibitoren wie TIMPs moduliert werden. Dabei ist jedes TIMP (1-3) in der Lage, alle MMPs zu inhibieren (Moses, 1997). Die Ergebnisse der Podozyten-Expressionsanalysen zeigen komplexe Veränderungen der MMP-Expression: Die Herunterregulierung von *MMP1* (Affymetrix-Arrays) und *MMP2* (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Real-time RT-PCR) in den DDS-Podozyten sowie die Hochregulierung von MMP14 (Clontech- und Affymetrix-Arrays) in den DDS- und CNF-Podozyten. Zusammen mit der Herunterregulierung von TIMP3 in den DDS- und CNF-Podozyten (Affymetrix-Arrays) ist eine Veränderung der VEGFA-Expression und damit eine gestörte Angiogenese bei den DDS-Patienten gut vorstellbar. Aufgrund der oben beschriebenen komplexen Zusammenhänge zwischen Aktivierung und Inhibierung der MMPs ist es aber nur sehr schwer zu verstehen, welche MMPs letztendlich zu einer erhöhten VEGFA-Aktivität in den DDS-Podozyten beitragen könnten.

Auch von TGFB1 ist bekannt, dass es die Expression von VEGFA in Podozyten aktivieren kann (Iglesias-de la Cruz et al., 2002). *TGFB1* ist in den DDS- und CNF-Podozyten (Affymetrix-Arrays) hochreguliert und könnte auch hier zu der beschriebenen erhöhten *VEGFA*-Expression führen. TGFB1 wiederum kann die Expression von Collagen IV und anderen extrazellulären Matrixproteinen stimulieren (Ziyadeh et al., 1994). Chen und Mitarbeiter vermuten deshalb eine Funktion von VEGFA für die Podozyten-Defunktion bei der diabetischen Nephropathie, die eine Verdickung der GBM und eine veränderte makromolekulare Permeabilität zeigt (Chen et al., 2004), was auch bei den beiden nephrotischen Syndromen mit ein Grund für die Entstehung der Proteinurie sein könnte.

All diese beschriebenen Fehlregulationen führen zu der Vermutung einer gestörten Angiogenese bei den Patienten mit beiden nephrotischen Syndromen sowie einer Veränderung der GBM, die letztendlich zur Entstehung der Proteinurie führen könnte.

C) ECM-Produktion

Bei den differentiell exprimierten Genen, die bei der ECM-Produktion eine wichtige Rolle spielen könnten, handelt es sich u.a. um *IGFBP3*, *IGFBP5*, *TNFA*, *ET-2*, *MMP1*, *MMP2* und *MMP7*, die hier diskutiert werden und sich teilweise mit den letzten Paragraphen überschneiden. Der biologische Zusammenhang dieser Gene ist in Abbildung 6.1 dargestellt.

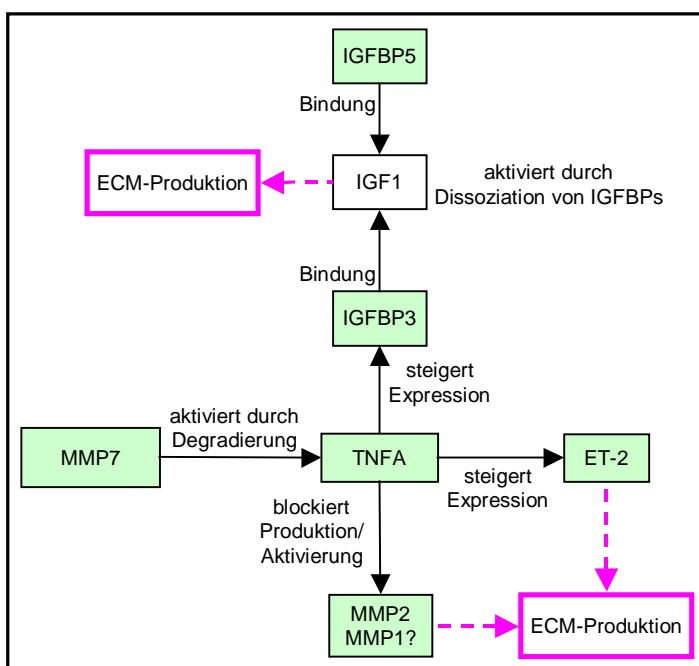


Abbildung 6.1: Biologischer Zusammenhang der in den Arrays differentiell exprimierten Gene, die bei der ECM-Produktion eine wichtige Rolle spielen.

Von TNFA ist bekannt, dass es viele Signaltransduktionswege aktivieren kann (Vilceck und Lee, 1991). Die Signale durch TNFA werden über unterschiedliche Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) weitergegeben, wobei die meisten TNFR1-vermittelt sind. Die Bindung von TNFA an TNFR1 steuert eine Serie interzellulärer Ereignisse, die zu der Aktivierung der zwei Haupt-Transkriptionsfaktoren NF- κ B und c-Jun führt (Chen und Goeddel, 2002). Diese aktivieren wiederum Gene, die für diverse biologische Prozesse, wie z.B. Zellwachstum, Zelltod, Entwicklung, Onkogenese, Immunantwort, inflammatorische- und Stressantwort von Bedeutung sind. TNFR2 ist dagegen nur für Prozesse des Zellüberlebens von Bedeutung, nicht aber in Prozesse der Apoptose involviert. Aufgrund der erhöhten Expression von *TNFA* in den DDS-Podozyten (Clontech-Arrays und Verifikation mittels Real-time RT-PCR) und der unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden, die TNFA durch beide Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 auslösen kann (Chen und Goeddel, 2002; Al-Lamki et al., 2005), wurde untersucht, ob es eine unterschiedliche Verteilung dieser Rezeptoren auf Mesangiumzellen und Podozyten

gibt. Es zeigte sich, dass die Expression von *TNFR2* nur auf die Mesangiumzellen beschränkt ist, während *TNFR1* von Mesangiumzellen und Podozyten exprimiert wird. Da *TNFR1* die Mehrzahl der biologischen Aktivitäten durch TNFA steuert, ist fraglich, ob das Fehlen der *TNFR2*-Expression in den Podozyten überhaupt eine entscheidende Auswirkung hat.

Viele Daten zeigen zudem, dass ein erhöhter TNFA-Spiegel eine Rolle in der Pathogenese verschiedener glomerulärer Erkrankungen spielt, wie bei Glomerulonephritis (Egido et al., 1993), beim idiopathischen nephrotischen Syndrom (Bustos et al., 1994) und beim nephrotischen Syndrom von Ratten (Gómez-chiarri et al., 1994). Bakr und Mitarbeiter konnten eine positive Korrelation zwischen der TNFA-Produktion und dem Grad der Proteinurie und Glomerulosklerose beim humanen primären nephrotischen Syndrom finden (Bakr et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass TNFA die Expression und Sekretion von IGFBP3 in glatten Muskelzellen von Gefäßen aktivieren kann (Anwar et al., 2002). Auch *IGFBP3* ist hier in den DDS- und CNF-Podozyten (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot) sehr stark hochreguliert. Fraglich ist, ob eine relativ schwache Hochregulierung von *TNFA* eine solch starke Erhöhung von *IGFBP3* bedingen kann, oder ob weitere Faktoren an dieser Hochregulation beteiligt sind.

IGFBPs spielen eine wichtige Rolle bei der extrazellulären Matrixbildung. Sie haben einen Einfluss auf die Aktivität von IGFs, z.B. kann IGF1 durch IGFBP3 aktiviert werden (Jones und Clemmons, 1995). Durch die Bindung von IGFBP3 an IGF1 wird der Zugang von IGF1 an seinen Rezeptor reguliert. Ein aktives IGF1 fördert wiederum die extrazelluläre Matrixbildung (Tyler, 1989; Bird und Tyler, 1995) durch die Produktion von Collagenen und Herunterregulierung der Collagenase-Produktion (Jones und Clemmons, 1995). Bekannt ist, dass IGF1, wenn es an lösliche IGFBPs gebunden ist, nicht an seinen Rezeptor binden kann (Arai et al., 1994). Eine IGF1-Bindung an zelloberflächengebundene oder ECM-assoziierte IGFBPs führt jedoch zu einer Potenzierung der zellulären Aktionen von IGF1. Dabei ist noch nicht bekannt, wie es zu Dissoziation des IGFBP-IGF1-Komplexes kommt, IGF1 freigesetzt wird und an seinen Rezeptor binden kann. Eine gemeinsame Lokalisation von IGFBP3 und IGF1 konnte schon in Podozyten und Mesangiumzellen festgestellt werden (Sandra et al., 1998). Bei diabetischen Nieren mit extrazellulärer Matrix-Ablagerung findet man zudem eine erhöhte Expression von IGFBP3 und -5 in den Glomeruli (Park et al., 1998; Pilewski et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Erhöhung von *IGFBP3* (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot) und *IGFBP5* (Clontech- und Affymetrix-Arrays) in den DDS- und CNF-Podozyten gezeigt. IGFBP3 und -5 können, wie oben beschrieben, zelloberflächen- oder ECM-assoziiert und z.B. an Heparansulfat-Proteoglykane gebunden sein (Jones et al., 1993; Hwa et al., 1999). Zellossoziiertes IGFBP3 besitzt eine geringere Affinität für IGF1 (Yang et al., 1996), was zur Folge hat, dass eine leichtere Dissoziation von IGF1 von Heparansulfat-gebundenem IGFBP3 und -5 zu einer gesteigerten

Aktivität von IGF1 und deshalb auch bei beiden nephrotischen Syndromen zu einer gesteigerten Matrixsynthese und damit zu Glomerulosklerose führen könnte.

Aufgrund der erhöhten Expression von *TNFA* und *IGFBP3* in den Podozyten von DDS- und CNF-Patienten wurde *in vitro* deren Wirkung durch Zugabe in das Zellkulturmedium von Mesangiumzellen und immortalisierten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person untersucht. Die Annahme war, dass durch die beiden sekretierten Proteine die Mesangiumzellen zur Akkumulation von Matrix angeregt würden, was auch schon zuvor von unterschiedlichen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Pilewski et al., 2005; Pawluczyk und Harris, 1998). Bei den Mesangiumzellen konnte nur die Expression von *FN1*, *COL1A1* und *LAMB1* untersucht werden, da *COL6A1* und *COL4A4* nicht exprimiert wurden. Nach Gabe von IGFBP3 war nur eine leicht erhöhte Expression von *COL1A1* in den Mesangiumzellen zu sehen. Die Podozyten hingegen zeigten eine starke Zunahme der Expression von *COL6A1* durch TNFA und IGFBP3 und auch eine Steigerung von *COL1A1* durch die Gabe von IGFBP3. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Expressionsanalysen, kann man auch dort eine gesteigerte Expression von *COL1A1* und *COL6A1* in den DDS- und CNF-Podozyten (Affymetrix-Arrays) finden. Diese könnte durch eine erhöhte Expression von *TNFA* und *IGFBP3* zustande gekommen sein. Von Collagen VI ist bekannt, dass es bei FSGS-Patienten in erhöhter Konzentration in mesangialer Matrix und der GBM zu finden ist (Cai et al., 1995). Auch bei der diabetischen Nephropathie konnte eine erhöhte Collagen VI-Expression in der GBM nachgewiesen werden (Schena und Gesualdo, 2005). Bei beiden Erkrankungen wird die Proteinurie unter anderem auf die Verdickung der GBM zurückgeführt. Dementsprechend ist es auch bei den DDS-Podozyten vorstellbar, dass sie übermäßig Collagen VI synthetisieren, welches in die GBM eingelagert wird, dessen Struktur verändert und somit bei der Entstehung der Proteinurie mit eine Rolle spielt. Interessant wäre es in Zukunft zu untersuchen, ob auch die schon oben beschriebene Erhöhung von *COL4A1* und *COL4A2* in den DDS- und CNF-Podozyten auf TNFA und IGFBP3 zurückzuführen ist. Die in der Literatur beschriebene erhöhte Matrixakkumulation von Mesangiumzellen durch TNFA und IGFBP3 konnte hier nicht bestätigt werden. Da hier nur mit einer Konzentration von TNFA und IGFBP3 gearbeitet wurde, ist es deshalb wichtig, in Zukunft weitere Konzentrationen auszutesten, um zu sehen, ob sich die beobachteten Effekte bestätigen lassen, oder ob es bei anderen Konzentrationen zu veränderten Effekten kommt.

Verschiedenste Studien zeigen eine Korrelation zwischen einem aktivierten Endothelin-System und einer Glomerulonephritis oder Glomerulosklerose (Murer et al., 1994; Orisio et al., 1993; Roccatello et al., 1994). Eine Überexpression von ET-2 in Glomeruli von Ratten führt zu der Entwicklung von Glomerulosklerose und einer signifikant erhöhten Proteinurie (Hocher et al., 1996). Außerdem kann ET-2 die Matrix-Proteinsynthese *in vivo* induzieren (Hocher et al., 1996). Hier wurde eine Hochregulierung von *ET-2* in den DDS-Podozyten (Affymetrix-Arrays

und Verifikation mittels semiquantitativer RT-PCR) gefunden, die über einen ähnlichen Mechanismus eine Proteinurie und eine verstärkte Matrixbildung fördern könnte. Die Erhöhung von *ET-2* könnte, wie bereits von Lambert und Mitarbeitern beschrieben, z.B. auf die gesteigerte *TNFA*-Expression in den DDS-Podozyten zurückzuführen sein (Lambert et al., 1998).

Die Proteolyse spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Matrixsynthese und -degradierung. Die Matrix-Metalloproteinasen gehören zur Familie der Endopeptidasen, die Collagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membrangebundene MMPs umfassen. Sie zeigen ein großes Spektrum an proteolytischen Aktivitäten gegen extrazelluläre Matrixkomponenten (Sato et al., 1994; Freije et al., 1994; Birkedal-Hansen, 1995). Bezüglich der Substrate Collagen und Laminin ist überwiegend noch nicht geklärt, welche Collagen- bzw. Laminin-Ketten von welchen MMPs gespalten werden (siehe Tabelle 6.1). Eine Verdickung der GBM beim DDS und CNF könnte aufgrund einer gesteigerten Synthese und Akkumulation von ECM-Makromolekülen wie Collagenen, Fibronektin, Lamininen und Proteoglycanen zustande kommen, was durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -degradierung erklärt werden könnte.

MMP	Substrat	Arrayergebnis	Literatur
MMP1	Collagen I	reduziert in DDS und CNF	Uchio et al., 2000
	IGFBP3/-5		Fowlkes et al., 1994; Manes et al., 1999; Thraillkill et al., 1995
MMP2	Collagen IV, V, VII, IX	reduziert in DDS und CNF	Matrisian, 1992; Nagase und Woessner 1999
	Collagen VI alpha 3		Myint et al., 1996
	Fibronektin		Matrisian, 1992; Nagase und Woessner 1999
	IGFBP3/-5		Fowlkes et al., 1994; Manes et al., 1999; Thraillkill et al., 1995
MMP7	Collagen IV, V, VII, IX	erhöht in DDS und CNF	Matrisian, 1992; Nagase und Woessner 1999
	Fibronektin		Matrisian, 1992; Nagase und Woessner 1999
	Laminin		Wilson und Matrisian, 1996
	Proteoglycan		Murphy et al., 1991; Wilson und Matrisian, 1996
	IGFBP3		Miyamoto et al., 2004
	TNFA		Gearing et al., 1994
	Osteopontin		Agnihotri et al., 2001
MT1-MMP (MMP14)	Laminin 5 gamma 2	erhöht in DDS und CNF	Koshikawa et al., 2005
	Laminin 5 beta 3		Udayakumar et al., 2003

Tabelle 6.1: Zusammenfassung der in den Arrays differentiell exprimierten MMPs mit ihren Substraten.

Bei Mäusen mit hereditärem nephrotischen Syndrom (ICGN, Ursache unbekannt) wurde in den Nieren eine geringere MMP1- und MMP2-Expression gefunden (Uchio et al., 2000), die in den Glomeruli eine abnormale ECM-Akkumulation von Collagen I, III und IV zeigten. Dabei führt die gesteigerte ECM-Produktion und die geringere ECM-Degradierung zu einer Zunahme an ECM. Eine geringere *MMP1* (Affymetrix-Arrays)- und *MMP2*-Expression (Clontech- und Affymetrix-Arrays sowie Verifikation mittels Real-time RT-PCR) konnte auch hier in den Podozyten der DDS-Patienten detektiert werden. Dies könnte also auch dort eine gesteigerte ECM-Akkumulation erklären. Die *MMP2*-Produktion und Aktivierung kann z.B. durch *TNFA*

Urogenitaltraktes wichtig. Bei *EMX2*-mutanten Mäusen findet keine Nieren- und keine Gonadenentwicklung statt (Miyamoto et al., 1997; Ogata et al., 2000). Während der Nierenentwicklung hängt die Entwicklung der Ureterknospe und deren Verzweigung von *EMX2* ab (Davies und Fisher, 2002). Trotz seiner wichtigen Rolle in vielen Bereichen der Embryonalentwicklung konnte *EMX2* auch in adulten neuralen Stammzellen *in vitro* nachgewiesen werden (Galli et al., 2002; Gangemi et al., 2001). Eine Überexpression von *EMX2* in adulten neuralen Stammzellen hat nur einen anti-proliferativen Effekt, führt aber nicht zur Beeinflussung eines speziellen Differenzierungsweges. Eine Überexpression in den DDS- und CNF-Podozyten könnte einen mehr fötalen Differenzierungszustand unterstreichen.

SOX9 konnte als ein in den NS- bzw. DDS-Podozyten höher exprimiertes Gen identifiziert werden. Die Daten der Affymetrix-Arrays zeigten eine NS-spezifische Expression, während bei der Verifikation mit semiquantitativer RT-PCR eine DDS-spezifische Expression nachgewiesen wurde. Die bisher publizierten Studien über *SOX9* beschränken sich hauptsächlich auf seine Rolle bei der Skelett- und Gonaden-Entwicklung. Bis jetzt konnte *SOX9* während der Nierenentwicklung nur in den sich entwickelnden Sammelrohren der metanephrischen Niere nachgewiesen werden (Kent et al., 1996). Eine mögliche Rolle von *SOX9* in Podozyten wurde noch nicht publiziert. Es gibt mittlerweile schon eine Reihe bekannter *SOX9*-Targetgene, zu denen viele verschiedene Collagene gehören, u.a. auch *COL1A2* (Ylöstalo et al., 2006). *COL1A2* ist in den DDS- und CNF-Podozyten (Affymetrix-Arrays) hochreguliert. *SOX9* könnte also bei beiden nephrotischen Syndromen an den komplexen Cytoskelettveränderungen der Podozyten beteiligt sein und so deren Funktion bei der Ultrafiltration beeinflussen.

Gremlin ist während der Embryonalentwicklung ein wichtiger Regulator der BMP-Aktivität. Knock-out Mäuse sterben postnatal an renaler Aplasie (Khokha et al., 2003; Michos et al., 2004). Auch seine Targetgene *BMP2*, *-4* und *-7* spielen eine wichtige Rolle während der renalen Entwicklung (Dudley et al., 1995; Karsenty et al., 1996; Miyazaki et al., 2000; Piscione et al., 1997; King et al., 1994; Luo et al., 1995). Sie regulieren dort Wachstum und Differenzierung der Ureterknospe und des metanephrischen Mesenchyms. Interessant in diesem Zusammenhang ist eine Entdeckung der Arbeitsgruppe von Miyazaki und Mitarbeitern, die eine Expression von BMPs im Glomerulus mit mesangialer Matrixexpansion in Verbindung gebracht haben (Miyazaki et al., 2006). Während der Entwicklung werden *BMP4* und *BMP7* sehr hoch in den zukünftigen Podozyten exprimiert (Dudley et al., 1995). Von *BMP7* weiß man, dass es auch in den reifen Podozyten exprimiert wird (Simon et al., 1999; Gould et al., 2002). Die Funktion der beiden BMPs im Glomerulus ist jedoch noch nicht klar. Miyazaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass transgene Mäuse, die ektopisch auf den Podozyten einen BMP-Inhibitor exprimieren, eine Verringerung mesangialer Zellen und eine mesangiale Expansion aufgrund der Akkumulation von Fibronektin, aber nicht von Collagen I oder IV bzw. Laminin aufweisen. Deshalb wird davon ausgegangen, dass endogenes BMP auf die

Mesangiumzellen wirkt und zur Aufrechterhaltung der normalen Struktur von Bedeutung ist. Die erhöhte Expression von *Gremlin* in den DDS-Podozyten (Clontech-Arrays) könnte ebenfalls die Aktivität dieser BMPs inhibieren und dies wiederum zu einer Akkumulation von Matrix in den Mesangiumzellen führen. Normalerweise findet man in der humanen adulten Niere keine Gremlin-Expression. Bei der diabetischen Nephropathie konnte jedoch in Patienten mit milder mesangialer Hyperzellularität und Matrixexpansion eine glomeruläre Expression von Gremlin in den Podozyten und parietalen Epithelzellen gefunden werden (Michos et al., 2004). Dies ist die einzige Literaturstelle, die eine podozytäre Expression beschreibt und zu den hier gefundenen Ergebnissen passt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Array-Analysen neue Einblicke in die Entstehung der diffusen mesangialen Sklerose beim DDS gegeben haben. Dabei handelt es sich vor allem um eine unvollständige Reifung der Podozyten und der GBM. Zusätzlich gibt es sekundäre Effekte, wie die Akkumulation von extrazellulärer Matrix durch ein Ungleichgewicht von Matrixsynthese und -degradierung. Um die Daten zu festigen, muss in Zukunft ein noch größeres Kollektiv untersucht werden. Die Tatsache, dass die Hauptzahl aller fehlregulierten Gene bei beiden nephrotischen Erkrankungen vorkommt, lässt vermuten, dass die Podozyten-Schädigung selber, unabhängig von der primären Ursache, eine Kaskade von sekundären Prozessen startet. Im Gegensatz dazu repräsentieren die Gene, die nur aufgrund der *WT1*- oder *NPHS1*-Mutation fehlreguliert sind, wahrscheinlich den primären Effekt der jeweiligen Mutation.

6.4 *WT1* Knock-down in adulten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person und embryonalen Nierenzellen (HEK293) mittels RNAi-Technik

WT1 wird während der Nierenentwicklung in einem komplexen Muster exprimiert und spielt zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung eine wichtige Rolle: Festlegung der Nierengegend, Differenzierung des Nephrons und Reifung der Glomeruli. *WT1* Knock-out Mäuse bekräftigen die Wichtigkeit von *WT1* für den Beginn der Nierenentwicklung. Es bilden sich keine metanephrischen Nieren (Kreidberg et al., 1993). Die beginnende Differenzierung des Mesenchyms ist normal (Donovan et al., 1999), aber das Auswachsen der Ureterknospe bleibt aus und das Mesenchym stirbt durch Apoptose (Kreidberg et al., 1993). Der dramatische Phänotyp der homozygoten *WT1* Knock-out Mäuse zeigt dessen Wichtigkeit für die renale Entwicklung. Es gibt mehrere Gründe, weshalb man von einer Rolle von *WT1* zu unterschiedlichen Zeitpunkten der metanephrischen Entwicklung ausgehen kann. Zuerst wird

WT1 in einem komplexen räumlich-zeitlichen Muster in drei Stadien in der sich entwickelnden Niere exprimiert: anfangs zu Beginn der metanephrischen Entwicklung schwach, dann wird es im Mesenchym zu Beginn der Differenzierung der Nephrone hochreguliert und steigt dann noch einmal in den glomerulären Podozyten an (Armstrong et al., 1993; Pritchard-Jones et al., 1990). Zum Zweiten verursachen spezifische *WT1*-Mutationen (wie z.B. Missense-Mutationen) Defekte bei der glomerulären Reifung (Denys-Drash Syndrom), was für die Notwendigkeit von *WT1* für die glomeruläre Reifung spricht (Pelletier et al., 1991; Kohsaka et al., 1999). Zu guter Letzt gibt es Mäuse, denen *WT1* komplett fehlt und die keine Nieren anlegen.

Die siRNA vermittelte RNA-Interferenz erlaubt eine Inhibierung der Genexpression zu bestimmten Zeitpunkten (Elbashir et al., 2001a,b; Harborth et al., 2001). Durch den spezifischen Knock-down von *WT1* in den mit Telomerase immortalisierten Podozyten (N13T) und immortalisierten embryonalen Nierenzellen (HEK293) sollte die Funktion von *WT1* zu zwei verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung (adult und embryonal) mittels Expressionsanalysen untersucht werden und Rückschlüsse auf potentielle *WT1*-Zielgene geben.

Durch *in vitro* Studien sind schon eine Vielzahl potentieller *WT1*-Targetgene bekannt, von denen viele eine wichtige Rolle während der Nierenentwicklung spielen. Zu erwarten wäre demnach eine veränderte Expression möglicher *WT1*-Zielgene bei den embryonalen HEK293-Zellen, die eine Rolle während der Nierenentwicklung spielen, während bei den adulten Podozyten ein anderes Zielgen-Spektrum aufgrund einer veränderten *WT1*-Funktion in der adulten Niere vorzusehen ist. Außerdem erwartet man ein unterschiedliches Zielgenspektrum allein aufgrund der unterschiedlichen Zelltypen. Während man sich bei den vorangegangenen Expressionsanalysen der Podozyten-Zellkulturen das Endstadium der Krankheit ansieht, erhofft man sich durch den *WT1* Knock-down Einblicke in den Beginn der Erkrankung zu gewinnen. Voraussetzung dafür ist die Annahme eines dominant-negativen Effektes durch die DDS-Mutation.

Bei den Knock-down Experimenten gab es sehr große Unterschiede zwischen den beiden Arraytypen bzw. den verwendeten N13T-Podozyten und HEK293-Zellen. Die Unterschiede zwischen diesen sind wahrscheinlich Zelltyp-bedingt sowie auch durch die Immortalisierung mit Telomerase beeinflusst, während die Unterschiede zwischen den beiden Arraytypen zum einen an den unterschiedlich verwendeten Arraytypen und zum anderen an der nur einmaligen Hybridisierung / RNA liegen könnten. Aus diesen Gründen wurde auch ein Vergleich zwischen den Clontech- und Affymetrix-Ergebnissen der N13T-Podozyten sowie zwischen den beiden verwendeten Zelltypen nicht in Erwägung gezogen.

Durch den Vergleich der Expressionsprofile vor und nach *WT1* Knock-down konnten vermeintliche Zielgene von *WT1* identifiziert werden, die zum einen schon aus der Literatur bekannt waren und zum anderen für die Nierenentwicklung eine wichtige Rolle spielen könnten. Mit Hilfe der Clontech-Arrays konnten nach *WT1* Knock-down in den N13T-Podozyten

insgesamt 96 ($FC \geq 1,5$) differentiell exprimierte Gene identifiziert werden. Die Auswertung der Affymetrix-Arrays ergab 158 differentiell exprimierte Gene bei den N13T-Podozyten und 148 bei den HEK293-Zellen ($FC \geq 1,5$). Auffällig war bei allen Arrays, dass es sich bei der Hauptzahl der differentiell exprimierten Gene um reprimierte Gene im Knock-down handelte, d.h. um möglicherweise durch WT1 hochregulierte Gene.

Von allen differentiell exprimierten Genen wurden exemplarisch drei im Knock-down hoch- (*HIF1A*, *INHBA*, *Gremlin*) und zwei herunterregulierte Gene (*EGR1*, *p21*) auf mRNA-Ebene verifiziert. Bei allen untersuchten Genen konnten die Tendenzen der Expressionsdaten bestätigt werden. Wichtig ist aber, die hier erhaltenen Ergebnisse in Zukunft durch weitere Experimente zu bestätigen.

Biologische Relevanz der differentiell exprimierten Gene nach *WT1* Knock-down

Verglichen wurden zum einen die Ergebnisse vom *WT1* Knock-down in den N13T-Podozyten mit den DDS-spezifischen Genen der Podozyten-Arrays. Dabei wurden nur die gleichen Arraytypen untereinander verglichen, da ein Vergleich zwischen verschiedenen Arraytypen aufgrund der unterschiedlich zugrunde liegenden Methodik problematisch ist. Zum anderen wurde die Expression von bereits bekannten *WT1*-Zielgenen nach *WT1* Knock-down in N13T-Podozyten und HEK293-Zellen angesehen. Die differentiell exprimierten Gene nach *WT1* Knock-down in N13T- und HEK293-Zellen waren so unterschiedlich, dass von einem Vergleich zwischen diesen beiden Zelltypen abgesehen wurde.

Nach *WT1* Knock-down zeigten sich fehlregulierte Gene, wie z.B. *EGFR*, *EGR1* und *INHA*, bei denen es sich laut Literatur um schon bekannten *WT1*-Zielgene handelt.

EGFR ist ein Transmembranprotein und eine Tyrosinkinase und wird *in vitro* von *WT1* negativ reguliert (Englert et al., 1995; Haber et al., 1996; Vicanek et al., 1997; Scharnhorst et al., 1997; Thäte et al., 1998; Hosono et al., 1999; Sim et al., 2002). In der sich entwickelnden Niere exprimieren die renalen Vorläufer-Zellen mit steigender *WT1*-Expression immer weniger *EGFR* (Englert et al., 1995). Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, dass EGF über *EGFR* epitheliale Gewebe zu gesteigerter Wachstumsaktivität veranlassen kann (Schlessinger et al., 1992). Ferner wurde beobachtet, dass *EGFR* bei Aktin-Rearrangements des Cytoskeletts involviert ist (Suzuki et al., 2001; Boonstra et al., 1995) und bei der Nephrogenese die Differenzierung und Proliferation der Zellen reguliert (Voldborg et al., 1997). In den N13T-Podozyten ist *EGFR* im Knock-down (Clontech-Arrays) herunterreguliert, was eine normalerweise positive Regulation durch *WT1* bedeuten würde und deshalb nicht mit den Literaturdaten übereinstimmt. Dieser Unterschied könnte auf die unterschiedlich verwendeten Zelltypen zurückzuführen sein, was auch in der Literatur schon öfter, z.B. für *ODC* oder *IGF2*, beobachtet wurde (Moshier et al., 1996; Idelman et al., 2003). Bei DDS-Patienten konnte

zudem laut Literatur keine abnormale EGFR-Expression festgestellt werden (Vicanek et al., 1997). Auch hier wurde in den DDS-Podozyten keine veränderte *EGFR*-Expression beobachtet, was die Literaturdaten bestätigen. Vicanek und Mitarbeiter konnten zudem zeigen, dass alle WT1-Isoformen die EGFR-Promotoraktivität supprimieren können, jedoch WT1-Isoformen mit Deletionen in den Zinkfingern oder der N-terminalen Domäne nicht. Dagegen zeigten WT1-Isoformen mit der DDS-Mutation R394W weiterhin die Fähigkeit, den EGFR-Promotor zu supprimieren. Eine Herunterregulierung von *EGFR* durch ein mutiertes WT1 bei DDS-Patienten kann also nicht für die Abnormalitäten während der Glomerulogenese von DDS-Patienten verantwortlich sein. Dieses Ergebnis zeigt auch, dass ein *WT1* Knock-down eine andere Wirkung als ein mutiertes *WT1* bei DDS-Patienten hervorrufen kann.

EGR1 gehört zur Gruppe der Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (Gashler und Sukhatme, 1995). Die Zinkfinger 1, 2 und 3 von *EGR1* zeigen eine 61 %ige Aminosäure-Homologie mit den Zinkfingern 2, 3 und 4 von *WT1* (Rauscher, 1993). Beide Proteine können an ähnliche DNA-Sequenzen binden, weshalb man von einer Regulation der gleichen Targetgene ausgeht. Verschiedene Arbeiten zeigen die Aktivierung einiger Promotoren durch *EGR1*, aber deren Repression durch *WT1* (Wang et al., 1992; Madden et al., 1991; Ryan et al., 1995; Kinane et al., 1994, 1996; Moshier et al., 1996). Eine reziproke Expression von *EGR1* und *WT1* wurde auch schon beobachtet (Kinane et al., 1994, 1996). *EGR1* konnte bis jetzt als ein negativ und positiv reguliertes *WT1*-Zielgen gefunden werden (Madden et al., 1991; Englert et al., 1995; Reddy et al., 1995; Maheswaran et al., 1993; Haber et al., 1993). Dabei waren die gefundenen Expressionstendenzen, trotz gleicher Zelltypen und auch der Verwendung gleicher *WT1*-Isoformen, unterschiedlich. Die im Knock-down gefundene Herunterregulierung von *EGR1* in den N13-Podozyten (Clontech-Arrays) bestätigt die Literaturdaten, die eine positive Regulation von *EGR1* durch *WT1* zeigen. Krones-Herzig und Mitarbeiter konnten zeigen, dass *EGR1* zu einer Hochregulierung einiger Collagene führt, u.a. von *COL4A5*. Schon bei den Ergebnissen der Podozyten-Expressionsanalysen konnte in den DDS- und CNF-Podozyten eine verminderte Expression von *COL4A5* (Affymetrix-Arrays und Verifikation mittels semiquantitativer RT-PCR) gefunden werden, das schon mit einer unvollständigen Ausreifung und eine nicht abgeschlossenen Differenzierung der DDS- und CNF-Podozyten in Verbindung gebracht wurde (vergleiche Seite 144). Bei den DDS-Podozyten könnte dies u.a. durch eine Herunterregulation von *EGR1* zustande gekommen sein.

INHA wurde bis jetzt als negativ reguliertes *WT1*-Zielgen identifiziert (Thäte et al., 1998; Sim et al., 2002; Hsu et al., 1995). Hsu und Mitarbeiter konnten dabei eine Repression durch die –Exon5/-KTS- Isoform beobachten. Die erhöhte *INHA*-Expression im *WT1* Knock-down der HEK293-Zellen bestätigt dieses Ergebnis. *INHA* kann die Interaktion von Activin-Rezeptoren mit Mitgliedern der TGF β -Superfamilie, z.B. den BMPs, zerstören (Cook et al., 2004). Von BMP7 ist bekannt, dass es während der Nierenentwicklung bei der Vermittlung der mesenchymal-

epithelialen Interaktionen eine Rolle spielt und für eine normale metanephrische Entwicklung benötigt wird. Eine erhöhte INHA-Expression während der Nierenentwicklung könnte die Activin-Rezeptor-BMP7-Verbindung stören und zu einer fehlerhaften Nierenentwicklung führen (Gupta et al., 1999; Vukicevic et al., 1996).

Weiterhin wurden durch den Vergleich beider Experimente (DDS-Podozyten und *WT1* Knock-down in N13T) differentiell exprimierte Gene wie *Gremlin* und *MMP7* mit den Clontech-Arrays sowie *TNFSF10*, *TNFAIP2*, *NNMT*, *PTX3*, *Gremlin* und *MMP1* mit den Affymetrix-Arrays gefunden. Dabei stimmen die Expressionsergebnisse der DDS-Podozyten für *TNFSF10* und *TNFAIP2*, die beide hochreguliert sind, nicht mit dem Knock-down Experiment überein, wo man eine Herunterregulierung der Expression beobachten kann. Als besonders interessant stellen sich die Ergebnisse bezüglich *MMP1* und *Gremlin* dar, die hier diskutiert werden.

Gremlin wurde schon im Rahmen der Podozyten-Expressionsanalysen diskutiert (vergleiche Seite 153f), wo eine erhöhte Expression in den DDS-Podozyten (Clontech-Arrays) gefunden und dies in Zusammenhang mit einer Akkumulation von Matrix in den Mesangiumzellen gebracht wurde. Auch nach *WT1* Knock-down in N13T-Podozyten findet man eine erhöhte *Gremlin*-Expression mit beiden Arraytypen, was eine negative Regulation durch *WT1* in der Niere vermuten lässt. Möglicherweise wird *Gremlin* während der Nephrogenese früh exprimiert und später durch das Auftreten von *WT1* reprimiert. Eine anhaltende Expression von *Gremlin* während der Nephrogenese könnte bei den DDS-Patienten die Akkumulation von Matrixproteinen unterstützen.

MMP1 ist eine Collagenase, die primär für die Degradierung von Collagen I, II und III zuständig ist (Werb, 1997). Bei Mäusen mit einem hereditären nephrotischen Syndrom (ICGN, Ursache unbekannt) konnten Uchio und Mitarbeiter eine verminderte *MMP1*-Expression im Gegensatz zu den Kontrollen feststellen (Uchio et al., 2000). Dies führt zu einer abnormalen Akkumulation von ECM, besonders von Collagen I, III und IV. Auch hier wurde in DDS-Podozyten eine verminderte *MMP1*-Expression (Affymetrix-Arrays) gesehen. Dies konnte nach *WT1* Knock-down in den N13T-Podozyten (Affymetrix-Arrays) bestätigt werden.

Zusammenfassung

Ausgangspunkt der Untersuchung war die Überlegung, dass eine *WT1* Missense-Mutation dominant-negativ wirkt und somit funktionelles *WT1*-Protein dramatisch reduziert. Aufgrund der Tatsache, dass die primären DDS-Podozyten-Zellkulturen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stammen, wurde davon ausgegangen, dass die entsprechenden Expressionsprofile einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit entsprechen. Durch den Knock-down von *WT1* sollten nun Einblicke in frühe Stadien der DDS-Erkrankung gewonnen werden.

Insgesamt konnten nur wenige aus der Literatur bekannte WT1-Zielgene im Knock-down als differentiell exprimiert gefunden werden, wobei die Expressionstendenz in einem Fall (*EGFR*) nicht mit den Literaturdaten übereinstimmte. Warum nur so wenige bekannte Zielgene gefunden wurden, obwohl der Knock-down auf mRNA- und Proteinebene sehr gut funktionierte, darüber kann nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit besteht z.B. in der Verwendung anderer Zellen als in der Literatur angegeben. Die Ergebnisse deuten zum Teil auf eine direkte Regulation durch WT1, zum Teil aber auch auf eine indirekte Regulation hin. Ob es sich wirklich um physiologische Zielgene handelt, muss in Zukunft durch weitere Untersuchungen, wie z.B. durch die Suche nach möglichen WT1-Erkennungssequenzen in den Promotoren der beschriebenen Gene, geklärt werden. Durch eine Chromatin-Immunpräzipitation (= ChIP) könnte man zusätzlich die Bindung von WT1 an die hier gefundenen potentiellen Zielgene überprüfen.

Bei den Genen, die sich durch zukünftige Untersuchungen als nicht durch WT1 direkt reguliert herausstellen, könnte es sich um indirekt regulierte Gene handeln sowie um Artefakte der Methode. Wichtig ist es deshalb, die hier erhaltenen Ergebnisse in Zukunft durch weitere Experimente zu festigen.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnten auf molekularer Ebene neue Einblicke in die Pathomechanismen der diffusen mesangialen Sklerose beim Denys-Drash Syndrom (DDS) gewonnen werden.

Zu Beginn der Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass im Transkriptionsfaktor WT1 Missense-Mutationen beim Menschen die terminale glomeruläre Reifung stören. Um dies zu bestätigen, wurden Glomeruli von DDS-Patienten mit den fötalen „s-shape“- und „capillary-loop“ Stadien sowie mit Glomeruli von Kindern und Erwachsenen verglichen. Durch die Verwendung verschiedener Marker konnte eine Entwicklungs-Verzögerung in DDS-Patienten betreffend Podozyten und GBM festgestellt werden. Dabei waren drei Feststellungen von besonderem Interesse:

- 1) Die DDS-Podozyten exprimieren reduzierte Mengen an *WT1* mRNA, und das Verhältnis der vier alternativ gespleißten *WT1* mRNA Hauptisoformen entspricht eher dem der „capillary-loop“ Stadien als dem der reifen Glomeruli.
- 2) Die DDS-Podozyten exprimieren ein Verhältnis der angiogenetischen stimulatorischen Isoform *VEGF165a* zur inhibitorischen Isoform *VEGF165b*, das dem fötalen „s-shape“ Stadium entspricht. Interessant ist dabei die Überlegung, dass die +KTS *WT1*-Isoformen in den Spleißing-Prozess von *VEGF165* involviert sein könnten.
- 3) Während der GBM-Entwicklung gibt es normalerweise einen entwicklungsbedingten Switch von Collagen IV alpha 1, -alpha 2 zu Collagen IV alpha 3, -alpha 4, -alpha 5 und von Laminin beta 1 zu Laminin beta 2. Dies scheint bei DDS beeinträchtigt zu sein, da den DDS-Glomeruli Collagen IV alpha 4 und Laminin beta 2 fehlt.

Die reduzierten *WT1* mRNA-Mengen in den DDS-Podozyten und die dominant-negative Art und Weise, in der die heterozygoten Missense-Mutationen wahrscheinlich agieren, resultieren in einer dramatischen Abnahme von wildtypischem *WT1* in den Podozyten. Dieses hat wahrscheinlich wichtige Effekte auf die Expressionslevel von *WT1*-Zielgenen. Um herauszufinden, welche Gene in DDS-Podozyten fehlreguliert sind, wurden von primären Podozyten-Zellkulturen Expressionsprofile erstellt und mit denen von Kontrollen verglichen. Zu den Kontrollen zählten kindliche- und adulte Podozyten sowie Podozyten eines Patienten mit einem kongenitalen nephrotischen Syndrom vom finnischen Typ (CNF) mit *NPHS1*-Mutation. Alle Kulturen exprimierten dabei die spezifischen Podozytenmarker *WT1*, Podocin, Nephrin, CD2AP, Synaptopodin, Densin, *POD1* und Vimentin. Die Tatsache, dass die Hauptzahl der differentiell exprimierten Gene bei beiden nephrotischen Erkrankungen (DDS und CNF)

fehlreguliert war, lässt vermuten, dass die Podozyten-Schädigung selber, unabhängig von der primären Ursache, eine Kaskade von sekundären Prozessen auslöst. Im Gegensatz dazu repräsentieren die Gene, die nur aufgrund der *WT1*- oder *NPHS1*-Mutation fehlreguliert sind, wahrscheinlich den primären Effekt der jeweiligen Mutation. Verifiziert wurden insgesamt 17 Gene mit verschiedenen Methoden auf mRNA- oder Proteinebene, die entweder bei DDS differentiell exprimiert waren oder bei DDS und CNF. Die differentiell exprimierten Gene aus den Arrayanalysen wurden aufgrund ihrer Funktion folgenden Gruppen zugeteilt:

- 1) Zelladhäsion und Cytoskelett (*ITGA6*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A5*, *ICAM1*, *VCAM1*),
- 2) Angiogenese (*VEGFA*, *HIF1alpha*, *IGFBP3*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP14*, *TIMP3*, *TGFbeta1*),
- 3) Produktion von extrazellulärer Matrix (*IGFBP3*, *IGFBP5*, *TNFA*, *ET2*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*) und
- 4) Nierenentwicklung (*PAX2*, *SOX9*, *EMX2*, *Gremlin*).

Eine Fehlregulation dieser Proteine führt vermutlich zu einer unvollständigen Reifung und nicht abgeschlossenen Differenzierung der Podozyten, einer gestörten Verankerung der Podozyten mit der GBM und zu einer extrazellulären Matrixakkumulation, was letztendlich eine Proteinurie und Glomerulosklerose zur Folge haben könnte.

Aufgrund der Tatsache, dass die primären DDS-Podozyten-Zellkulturen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz stammten, wurde davon ausgegangen, dass die Expressionsprofile einem fortgeschrittenen Stadium der Krankheit entsprechen. Wenn man an therapeutische Targets denkt, ist es aber wichtig, die frühesten Änderungen zu analysieren, die durch einen Verlust von *WT1* in den Podozyten zustande kommen. Zur Herunterregulierung von *WT1* in immortalisierten Podozyten (N13T) einer nicht erkrankten Person und embryonalen Nierenzellen (HEK293) wurde deshalb die Technik der RNA-Interferenz mit einer spezifischen *WT1*-siRNA verwendet. Nach Optimierung der Transfektion wurde eine dramatische Reduktion von >98% (N13T) bzw. 85% (HEK293) der *WT1* mRNA-Mengen nach 24h und von >90% des *WT1*-Proteins nach 24h, 48h und 72h erreicht. Um die Effekte eines *WT1* Knock-downs zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen mittels Arrays durchgeführt. Durch dieses Experiment sollten putative *WT1*-Zielgene gefunden werden, die in die frühen Schritte der Erkrankung involviert sind. Verifiziert wurden fünf differentiell exprimierte Gene mit Real-time RT-PCR. Neben schon bekannten *WT1*-Zielgenen (*EGFR*, *EGR1* und *INHA*) konnten auch einige neue putative Zielgene (*Gremlin* und *MMP1*) identifiziert werden, die eine Rolle während der Nierenentwicklung und Pathogenese der Glomerulosklerose spielen könnten. Inwieweit es sich um physiologische Targets handelt, muss in Zukunft weiter untersucht werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, obwohl es sich beim Denys-Drash Syndrom um eine monogene Erkrankung handelt, mutiertes *WT1* direkt oder indirekt in

verschiedene Prozesse der Zelle eingreift (Zelladhäsion, Cytoskelett, Angiogenese, ECM-Produktion). Eine der frühesten Veränderungen ist sicherlich eine Entwicklungsverzögerung in den Podozyten, die sich wiederum auf benachbarte Zellen aber auch auf die Homöostase der Podozyten auswirkt und letztlich eine Glomerulosklerose verursacht.

8 Abstract

The purpose of the present thesis was to gain new insights into how heterozygous *WT1* mutations ultimately lead to diffuse mesangial sclerosis in patients with Denys-Drash syndrome. Therefore different molecular genetic and biochemical analyses were used.

To test if *WT1* missense mutations in humans interfere with terminal glomerular maturation, glomeruli of DDS patients were compared to fetal stages and to glomeruli of a child and adults. A developmental delay could be demonstrated in DDS patients:

- 1) DDS-podocytes express reduced levels of *WT1* mRNA, and the ratio of the four alternatively spliced *WT1* mRNA isoforms resembles that of fetal capillary-loop stages.
- 2) DDS-podocytes express a ratio of angiogenetic isoform *VEGF165a* to inhibitory isoform *VEGF165b* that resembles fetal s-shape stages.
- 3) DDS-glomeruli lack collagen IV alpha 4 and laminin beta 2, two components of the mature GBM.

The reduced level of *WT1* mRNAs in DDS-podocytes and the dominant negative manner in which heterozygous missense mutations are expected to act results in a decrease of wildtype *WT1* in podocytes. This in turn is expected to have important effects on the expression level of *WT1* target genes. To find out which genes are deregulated in DDS-podocytes, expression profiles were generated from primary podocyte cell cultures and compared to those of controls (podocytes of children and adults; podocytes of a patient with congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF) due to a *NPHS1* mutation). All cell cultures expressed specific podocyte markers like *WT1*, Podocin, Nephricin, *CD2AP*, Synaptopodin, *Densin* *POD1* and Vimentin. The finding that most of the genes are deregulated in both nephrotic syndrome diseases (DDS and CNF) suggests that podocyte injury itself, independent of its primary cause, may start automatically a cascade of secondary processes. In contrast, genes only deregulated in *WT1*-mutated or *NPHS1*-mutated podocytes may represent a primary effect of the underlying mutation. Due to their function differential expressed genes were assigned to the following groups:

- 1) cell adhesion and cytoskeleton (*ITGA6*, *COL4A1*, *COL4A2*, *COL4A5*, *ICAM1*, *VCAM1*),
- 2) angiogenesis (*VEGFA*, *HIF1alpha*, *IGFBP3*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP14*, *TIMP3*, *TGFbeta1*),
- 3) production of extracellular matrix (*IGFBP3*, *IGFBP5*, *TNFA*, *ET2*, *MMP1*, *MMP2*, *MMP7*),
- 4) nephrogenesis (*PAX2*, *SOX9*, *EMX2*, *Gremlin*).

A deregulation of these proteins may lead to an incomplete maturation of podocytes, a disturbed anchorage of podocytes within the GBM and to an expansion of extracellular matrix.

This could lead at last to proteinuria and glomerulosclerosis.

Due to the fact that the primary DDS podocyte cell cultures were established from patients with end-stage renal failure, the expression profiles probably correspond to an advanced stage of disease. To analyze the earliest changes caused by a dramatic decrease of WT1 in podocytes, the RNAi technology was used to knockdown WT1 in normal immortalized podocytes and embryonic kidney cells with a specific *WT1*-siRNA. This technology was combined with array analyses to identify putative WT1 target genes. Beside already known WT1 target genes (*EGFR*, *EGR1* und *INHA*) new putative target genes (*Gremlin* und *MMP1*) which play a role during nephrogenesis were identified.

Although Denys-Drash syndrome is a monogenetic disease, mutant WT1 interferes directly or indirectly with a variety of cellular processes (cell adhesion, cytoskeleton, angiogenesis, production of extracellular matrix). One of the earliest changes is certainly a delay in podocyte maturation which in turn affects neighbouring cells as well as the homeostasis of podocytes and ultimately leads to glomerulosclerosis.

9 Literaturverzeichnis

- Abrahamson DR (1987): Structure and development of the glomerular capillary wall and basement membrane. *Am. J. Physiol.* 253(5 Pt 2): F783-F794.
- Adler S, Brady HR (1999): Cell adhesion molecules and the glomerulopathies. *Am. J. Med.* 107(4): 371-386.
- Agnihotri R, Crawford HC, Haro H, Matrisian LM, Havrda MC, Liaw L (2001): Osteopontin, a novel substrate for matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1) and matrix metalloproteinase-7 (matrilysin). *J. Biol. Chem.* 276(30): 28261-28267.
- Ahola H, Heikkilä E, Astrom E, Inagaki M, Izawa I, Pavenstadt H, Kerjaschki D, Holthofer H (2003): A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(7): 1731-1737.
- Ahola H, Wang SW, Luimula P, Solin M-L, Holzman L, Holthofer H (1999): Cloning and expression of the rat nephrin homolog. *Am. J. Pathol.* 155(3): 907-913.
- Ahvenainen EK, Hallman N, Hjelt L (1956). Nephrotic syndrome in newborn and young infants. *Ann. Paediatr. Fenn.* 2(3): 227-241.
- Al-Lamki RS, Wang J, Vandenabeele P, Bradley JA, Thiru S, Luo D, Min W, Pober JS, Bradley JR (2005): TNFR1- and TNFR2-mediated signaling pathways in human kidney are cell type-specific and differentially contribute to renal injury. *FASEB J.* 19(12): 1637-1645.
- Andress DL (1995): Heparin modulates the binding of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-5 to a membrane protein in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.* 270(47): 28289-28296.
- Anwar A, Zahid AA, Scheidegger KJ, Brink M, Delafontaine P (2002): Tumor necrosis factor-alpha regulates insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression in vascular smooth muscle. *Circulation* 105(10): 1220-1225.
- Arai T, Parker A, Busby W, Clemmons DR (1994): Heparin, heparan sulfate, and dermatan sulfate regulate formation of the insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein complexes. *J. Biol. Chem.* 269(32): 20388-20393.
- Armstrong JF, Pritchard-Jones K, Bickmore WA, Hastie ND, Bard BL (1993): The expression of the Wilms' tumour gene, WT1, in the developing mammalian embryo. *Mech. Dev.* 40(1-2): 85-97.
- Arrizabalaga P, Sole M, Quinto L, Ascaso C, Engel P (1998): Leukocyte infiltration and intercellular adhesion molecule-1-mediated cell interactions in immunoglobulin A nephropathy. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122(9): 817-822.
- Atkin CL, Gregory MC, Border WA (1988): Alport syndrome. In "Diseases of Kidney" (Schrier WW, Gottschalk CW): 617-641. Boston and London: Little Brown and Company, 1997.
- Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, Mercurio AM (2001): Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 61(15): 5736-5740.
- Bakr A, Shokeir M, El-Chenawi F, El-Husseni F, Abdel-Rahman A, El-Ashry R (2003): Tumor necrosis factor-alpha production from mononuclear cells in nephrotic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 18(6): 516-520.
- Barboux S, Niaudet P, Gubler MC, Grunfeld JP, Jaubert F, Kuttann F, Fekete CN, Souleyreau-Therville N, Thibaud E, Fellous M (1997): Donor splice-site mutations in WT1 are responsible for Frasier syndrome. *Nat. Genet.* 17(4): 467-470.
- Baricos WH, Cortez SL, Deboisblanc M, Xin S (1999): Transforming growth factor-beta is a potent inhibitor of extracellular matrix degradation by cultured human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10(4): 790-795.
- Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC, Gregory MC, Skolnick MH, Atkin CL, Tryggvason K (1990): Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 248(4960): 1224-1227.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002): VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62(14): 4123-4131.
- Bates DO, MacMillan PP, Manjaly JG, Qiu Y, Hudson SJ, Bevan HS, Hunter AJ, Soothill PW, Read M, Donaldson LF, Harper SJ (2006): The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxxB, are downregulated in preeclamptic placentae at term. *Clin. Sci. (Lond.)* 110(5): 575-585.

- Baudry D, Faussillon M, Cabanis MO, Rigolet M, Zucker JM, Patte C, Sarnacki S, Boccon-Gibod L, Junien C, Jeanpierre C (2002): Changes in WT1 splicing are associated with a specific gene expression profile in Wilms' tumour. *Oncogene* 21(36): 5566-5573.
- Baudry D, Hamelin M, Cabanis MO, Fournet JC, Tournade MF, Sarnacki S, Junien C, Jeanpierre C (2000): WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. *Clin. Cancer Res.* 6(10): 3957-3965.
- Bird JL, Tyler JA (1995): Tumour necrosis factor alpha, interferon gamma and dexamethasone regulate IGF-I-maintained collagen production in cultured human fibroblasts. *J. Endocrinol.* 147(1): 167-176.
- Birkedal-Hansen H (1995): Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(5): 728-735.
- Boonstra J, Rijken P, Humbel B, Cremers F, Verkleij A, van Bergen en Henegouwen P (1995): The epidermal growth factor. *Cell Biol. Int.* 19(5): 413-430.
- Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C (2000): NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genet.* 24(4): 349-354.
- Breitenender-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D (1997): Podoplanin: Novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am. J. Pathol.* 151(4): 1141-1152.
- Bremner WJ (1989): Inhibin: from hypothesis to clinical application. *New Eng. J. Med.* 321(12): 826-827.
- Brenner B, Wildhardt G, Schneider S, Royer-Pokora B (1992): RNA polymerase chain reaction detects different levels of four alternatively spliced *WT1* transcripts in Wilms' tumors. *Oncogene* 7(7): 1431-1433.
- Bruening W, Pelletier J (1996): A non-AUG translation initiation event generates novel WT1 isoforms. *J. Biol. Chem.* 271(15): 8646-8654.
- Bruijn JA, Dinklo NJ (1993): Distinct patterns of expression of intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 in renal disease. *Lab. Invest.* 69(3): 329-335.
- Bustos C, Gonzalez E, Muley R, Alonso JL, Egido J (1994): Increase of tumour necrosis factor alpha synthesis and gene expression in peripheral blood mononuclear cells of children with idiopathic nephrotic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 24(12): 799-805.
- Cai Y, Sich M, Beziau A, Kleppel MM, Gubler M-C (1996): Collagen distribution in focal and segmental glomerulosclerosis: An immunofluorescence and ultrastructural immunogold study. *J. Pathol.* 179(2): 188-196.
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH (1990): Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60(3): 509-520.
- Caricasole A, Duarte A, Larsson SH, Hastie N, Little M, Holmes G, Todorov I, Ward A (1996): RNA binding by the Wilms tumor suppressor zinc finger proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15): 7562-7566.
- Carmeliet P (2000): Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6(4): 389-395.
- Charlieu JP, Larsson S, Miyagawa K, van Heyningen V, Hastie ND (1995): Does the Wilms' tumour suppressor gene, WT1, play roles in both splicing and transcription? *J. Cell Sci. Suppl.* 19: 95-99.
- Chen G, Goeddel DV (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296(5573): 1634-1635.
- Chen S, Kasama Y, Lee JS, Jim B, Marin M, Ziyadeh FN (2004): Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of alpha3(IV) collagen production by transforming growth factor-beta1 in mouse podocytes. *Diabetes* 53(11): 2939-2949.
- Clark EA, Brugge JS (1995): Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268(5208): 233-239.
- Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W (1996): The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 271(30): 17629-17634.
- Coers W, Brouwer E, Vos JT, Chand A, Huitema S, Heeringa P, Kallenberg CG, Weening JJ (1994): Podocyte expression of MHC class I and II and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in experimental pauci-immune crescentic glomerulonephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 98(2): 279-286.
- Cook DM, Hinkes MT, Bernfield M, Rauscher FJ 3rd (1996): Transcriptional activation of the syndecan-1 promoter by the Wilms' tumor protein WT1. *Oncogene* 13(8): 1789-1799.

- Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK (2004): Molecular biology of inhibin action. *Semin. Reprod. Med.* 22(3): 269-276.
- Coppes MJ, Clericuzio CL (1994): Molecular genetic analysis of the WT1 gene in patients suspected to have the Denys-Drash syndrome. *Med. Pediatr. Oncol.* 23(4): 390.
- Coppes MJ, Pritchard-Jones K (2000): Principles of Wilms' tumor biology. *Urol. Clin. North Am.* 27(3): 423-433.
- Cubbage ML, Suwanichkul A, Powell DR (1990): Insulin-like growth factor binding protein-3. Organization of the human chromosomal gene and demonstration of promoter activity. *J. Biol. Chem.* 265(21): 12642-12649.
- Cui TG, Foster RR, Saleem M, Mathieson PW, Gillatt DA, Bates DO, Harper SJ (2004): Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 286(4): F767-F773.
- Dal Canton A, Fuiano G, Sepe V, Caglioti A, Ferrone S (1992): Mesangial expression of intercellular adhesion molecule-1 in primary glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 41(4): 951-955.
- Davies JA, Fisher CE (2002): Genes and proteins in renal development. *Exp. Nephrol.* 10(2): 102-113.
- Davies JA, Ladomery M, Hohenstein P, Michael L, Shafe A, Spraggon L, Hastie N (2004): Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 13(2): 235-246.
- Davies M, Thomas GJ, Shewring LD, Mason RM (1992): Mesangial cell proteoglycans: synthesis and metabolism. *J. Am. Soc. Nephrol. Suppl.* 2(10): 88-94.
- de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH (2001): Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(5): 993-1000.
- Del Prete D, Anglani F, Ceol M, D'Angelo A, Forino M, Vianello D, Baggio B, Gambaro G (1998): Molecular biology of diabetic glomerulosclerosis. *Nephrol. Dial. Transplant Suppl.* 13(8): 20-25.
- Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tanghe W, Proesmans W (1976): Association of an anatomopathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism. *Arch. Fr. Pediatr.* 24(7): 729-739.
- Dey BR, Sukhatme VP, Roberts AB, Sporn MB, Rauscher FJ 3rd, Kim SJ (1994): Repression of the transforming growth factor-beta 1 gene by the Wilms' tumor suppressor WT1 gene product. *Mol. Endocrinol.* 8(5): 595-602.
- Diez-Marques L, Ortega-Velazquez R, Langa C, Rodriguez-Barbero A, Lopez-Novoa JM, Lamas S, Bernabeu C (2002): Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1587(1): 36-44.
- Donovan MJ, Natoli TA, Sainio K, Amstutz A, Jaenisch R, Sariola H, Kreidberg JA (1999): Initial differentiation of the metanephric mesenchyme is independent of WT1 and the ureteric bud. *Dev. Genet.* 24(3-4): 252-262.
- Drash A, Sherman F, Hartmann WH, Blizzard RM (1970): A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J. Pediatr.* 76(4): 585-593.
- Dressler GR, Wilkinson JE, Rothenpieler UW, Patterson LT, Williams-Simons L, Westphal H (1993): Deregulation of Pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature* 362(6415): 65-67.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 9(22): 2795-2807.
- Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, French M, Tsai RW (2002): PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int. J. Dev. Biol.* 46(4): 535-544.
- Eddy AA, Mauer SM (1985): Pseudohermaphroditism, glomerulopathy, and Wilms tumor (Drash syndrome): frequency in end-stage renal failure. *J. Pediatr.* 106(4): 584-587.
- Egido J, Gomez-chiarri M, Ortiz A (1993): The role of tumor necrosis factor α in the pathogenesis of glomerular diseases. *Kidney Int. Suppl.* 43(39): 59-64.
- Eklom M, Falk M, Salmivirta K, Durbeej M, Eklom P (1998): Laminin isoforms and epithelial development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 857: 194-211.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001a): Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836): 494-498.

- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001b): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2): 188-200.
- Endlich N, Sunohara M, Nietfeld W, Wolski EW, Schiwiek D, Kranzlin B, Gretz N, Kriz W, Eickhoff H, Endlich K (2002): Analysis of differential gene expression in stretched podocytes: osteopontin enhances adaptation of podocytes to mechanical stress. *FASEB J.* 16(13): 1850-1852.
- Englert C (1998): WT1 - more than a transcription factor? *Trends Biochem. Sci.* 23(10): 389-393.
- Englert C, Hou X, Maheswaran S, Bennett P, Ngwu C, Re GG, Garvin AJ, Rosner MR, Haber DA (1995): WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* 14(19): 4662-4675.
- Englert C, Maheswaran S, Garvin AJ, Kreidberg J, Haber DA (1997): Induction of p21 by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res.* 57(8): 1429-1434.
- Eremina V, Cui S, Gerber H, Ferrara N, Haigh J, Nagy A, Ema M, Rossant J, Jothy S, Miner JH, Quaggin SE (2006): Vascular endothelial growth factor signalling in the podocyte-endothelial compartment is required for mesangial cell migration and survival. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17: 724-735.
- Eremina V, Quaggin SE (2004): The role of VEGF-A in glomerular development and function. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 13(1): 9-15.
- Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH, Quaggin SE (2003): Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin. Invest.* 111(5): 707-716.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W (1998): Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell Sci.* 111(13): 1853-1865.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W (1998): Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* 140(4): 947-959.
- Falk M, Salmivirta K, Durbeek M, Larsson E, Ekblom M, Vestweber D, Ekblom P (1996): Integrin alpha 6 beta 1 is involved in kidney tubulogenesis in vitro. *J. Cell Sci.* 109(12): 2801-2810.
- Ferletta M, Ekblom P (1999): Identification of laminin-10/11 as a strong cell adhesive complex for a normal and a malignant human epithelial cell line. *J. Cell Sci.* 112(Pt1): 1-10.
- Ferrara N, Davis-Smyth T (1997): The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18(1): 4-25.
- Fink L, Kohlhoff S, Stein MM, Hanze J, Weissmann N, Rose F, Akkayagil E, Manz D, Grimminger F, Seeger W, Bohle RM (2002): cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am. J. Pathol.* 160(1): 81-90.
- Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA (1994). Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. *Dev. Biol.* 162(2):499-510.
- Fowlkes JL, Suzuki K, Nagase H, Thraill KM (1994): Proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 during rat pregnancy: a role for matrix metalloproteinases. *Endocrinology* 135(6): 2810-2813.
- Freeburg PB, Robert B, St John PL, Abrahamson DR (2003): Podocyte expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 and (HIF)-2 during glomerular development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(4): 927-938.
- Freije JM, Diez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C (1994): Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. *J. Biol. Chem.* 269(24): 16766-16773.
- Fuh G, Garcia KC, de Vos AM (2000) : The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 275(35): 26690-26695.
- Fukuzawa R, Heathcott RW, Sano M, Morison IM, Yun K, Reeve A (2004): Myogenesis in Wilms tumors is associated with mutations of the WT1 gene and activation of Bcl-2 and the Wnt signaling pathway. *Pediatr. Dev. Pathol.* 7(2): 125-137.
- Galli R, Fiocco R, De Filippis L, Muzio L, Gritti A, Mercurio S, Broccoli V, Pellegrini M, Mallamaci A, Vescovi AL (2002): Emx2 regulates the proliferation of stem cells of the adult mammalian central nervous system. *Development* 129(7): 1633-1644.
- Gangemi RM, Daga A, Marubbi D, Rosatto N, Capra MC, Corte G (2001): Emx2 in adult neural precursor cells. *Mech. Dev.* 109(2): 323-329.
- Gao F, Maiti S, Sun G, Ordonez NG, Udtha M, Deng JM, Behringer RR, Huff V (2004): The *Wt1*+/*R394W* mouse displays glomerulosclerosis and early-onset renal failure characteristic of human Denys-Drash syndrome. *Mol. Cell Biol.* 24(22): 9899-9910.

- Gao X, Chen X, Taglienti M, Rumballe B, Little MH, Kreidberg JA (2005): Angioblast-mesenchyme induction of early kidney development is mediated by Wt1 and Vegfa. *Development* 132(24): 5437-5449.
- Gashler A, Sukhatme VP (1995): Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50: 191-224.
- Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilbert R, Gordon JL (1994): Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370(6490): 555-557.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N (1998): Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J. Biol. Chem.* 273(46): 30336-30343.
- Gerke P, Sellin L, Kretz O, Petraschka D, Zentgraf H, Benzing T, Walz G (2005): NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 16(6): 1693-1702.
- Gessler M, Hameister H, Henry I, Junien C, Braun T, Arnold HH (1990): 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(2): 135-138.
- Gessler M, König A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, Peters C, Ruyle S, Mandell J, Li F, Cavenee W, Bruns G (1994): Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' tumors. *Hum. Mut.* 3: 212-222.
- Gomez-Chiarri M, Ortiz A, Lerma JL, Lopez-Armada MJ, Mampaso F, Gonzalez E, Egido J (1994): Involvement of tumor necrosis factor and platelet-activating factor in the pathogenesis of experimental nephrosis in rats. *Lab. Invest.* 70(4): 449-459.
- Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H (2002): BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int.* 61(1): 51-60.
- Guan F, Villegas G, Teichman J, Mundel P, Tufro A (2006): Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291(2): F422-F428.
- Guo JK, Menke AL, Gubler MC, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, Hastie ND, Schedl A (2002): WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 11(6): 651-659.
- Gupta IR, Piscione TD, Grisaru S, Phan T, Macias-Silva M, Zhou X, Whiteside C, Wrana JL, Rosenblum ND (1999): Protein kinase A is a negative regulator of renal branching morphogenesis and modulates inhibitory and stimulatory bone morphogenic proteins. *J. Biol. Chem.* 274(37): 26305-26314.
- Haber DA, Englert C, Maheswaran S (1996): Functional properties of WT1. *Med. Pediatr. Oncol.* 27(5): 453-455.
- Haber DA, Park S, Maheswaran S, Englert C, Re GG, Hazen-Martin DJ, Sens DA, Garvin AJ (1993): WT1-mediated growth suppression of Wilms tumor cells expressing a WT1 splicing variant. *Science* 262(5142): 2057-2059.
- Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE (1991): Alternative splicing and genomic structure of the Wilms' tumor gene WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88(21): 9618-9622.
- Habib R (1993): Nephrotic syndrome in the 1st year of life. *Pediatr. Nephrol.* 7(4): 347-353.
- Habib R, Loirat C, Gubler MC, Niaudet P, Bensman A, Levy M, Broyer M (1985): The nephropathy associated with male pseudohermaphroditism and Wilms' tumor (Drash syndrome): a distinctive glomerular lesion - report of 10 cases. *Clin. Nephrol.* 24(6): 269-278.
- Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trumper L, Balkwill FR, Binder C (2004): Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis* 25(8): 1543-1549.
- Hammes A, Guo JK, Lutsch G, Leheste JR, Landrock D, Ziegler U, Gubler MC, Schedl A (2001): Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. *Cell* 106(3): 319-329.
- Hanahan D (1985): Techniques for Transformation of E.coli. In "DNA cloning: A practical approach" (Glover DM). Oxford, Washington DC, USA: IRL Press, 1985.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K (2001): Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* 114(24): 4557-4565.
- Harvey SJ, Zheng K, Sado Y, Naito I, Ninomiya Y, Jacobs RM, Hudson BG, Thorner PS (1998): Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.* 54(6): 1857-1866.

- Hastie ND (1994): The genetics of Wilms' tumor - a case of disrupted development. *Annual Rev. Genet.* 28: 523-558.
- Hastie ND (2001): Life, sex, and WT1 isoforms - three amino acids can make all the difference. *Cell.* 106(4): 391-394.
- Heidet L, Cai Y, Guicharnaud L, Antignac C, Gubler MC (2000): Glomerular expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. *Am. J. Pathol.* 156(6): 1901-1910.
- Hoher B, Liefeldt L, Thone-Reineke C, Orzechowski HD, Distler A, Bauer C, Paul M (1996): Characterization of the renal phenotype of transgenic rats expressing the human endothelin-2 gene. *Hypertension* 28(2): 196-201.
- Hofmann W, Royer HD, Drechsler M, Schneider S, Royer-Pokora B (1993): Characterization of the transcriptional regulatory region of the human WT1 gene. *Oncogene* 8(11): 3123-3132.
- Holmes G, Boterashvili S, English M, Wainwright B, Licht J, Little M (1997): Two N-terminal self-association domains are required for the dominant negative transcriptional activity of WT1 Denys-Drash mutant proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233(3): 723-728.
- Holthöfer H, Ahola H, Solin M-L, Wang S, Palmén T, Luimula P, Miettinen A, Kerjaschki D (1999): Nephritin localizes at the podocyte filtration slit area and is characteristically spliced in the human kidney. *Am. J. Pathol.* 155(5): 1681-1687.
- Holthöfer H, Miettinen A, Lehto VP, Lehtonen E, Virtanen I (1984): Expression of vimentin and cytokeratin types of intermediate filament proteins in developing and adult human kidneys. *Lab. Invest.* 50(5): 552-559.
- Holthöfer H, Sainio K, Miettinen A (1995): The glomerular mesangium: studies of its developmental origin and markers in vivo and in vitro. *APMIS* 103: 354-366.
- Holzman LB, St. John PL, Kovari IA, Verma R, Holthöfer H, Abrahamson DR (1999): Nephritin localizes to the slit pore of the glomerular epithelial cells. *Kidney Int.* 56(4): 1481-1491.
- Hosono S, Luo X, Hyink DP, Schnapp LM, Wilson PD, Burrow CR, Reddy JC, Atweh GF, Licht JD (1999): WT1 expression induces features of renal epithelial differentiation in mesenchymal fibroblasts. *Oncogene* 18(2): 417-427.
- Hsu SY, Kubo M, Chun SY, Haluska FG, Housman DE, Hsueh AJ (1995): Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin- α gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 9(10): 1356-1366.
- Hubbell E, Liu W-M, Mei R (2002): Robust estimators for expression analysis. *Bioinformatics* 18(12): 1585-1592.
- Huttunen N-P, Rapola J, Vilks J, Hallman N (1980): Renal pathology in congenital nephrotic syndrome of Finnish type: A quantitative light microscopy study of 50 patients. *Int. J. Pediatr. Nephrol.* 1(1): 10-16.
- Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999): The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 20(6): 761-787.
- Idelman G, Glaser T, Roberts CT Jr, Werner H (2003): WT1-p53 interactions in insulin-like growth factor-I receptor gene regulation. *J. Biol. Chem.* 278(5): 3474-3482.
- Iglesias-de la Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S (2002): Effects of high glucose and TGF- β 1 on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int.* 62(3): 901-913.
- Jadresic D (1990): Medical, psychological and social aspects of torture: prevention and treatment. *Med. War.* 6(3): 197-203.
- Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, Cabanis MO, Luce S, Cecille A, Elion J, Peuchmaur M, Loirat C, Niaudet P, Gubler MC, Junien C (1998): Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am. J. Hum. Genet.* 62(4): 824-833.
- Johnstone RW, Wang J, Tommerup N, Vissing H, Roberts T, Shi Y (1998): Ciao 1 is a novel WD40 protein that interacts with the tumor suppressor protein WT1. *J. Biol. Chem.* 273(18): 10880-10887.
- Jones JI, Clemmons DR (1995): Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.* 16(1): 3-34.
- Jones JI, Gockerman A, Busby WH Jr, Camacho-Hubner C, Clemmons DR (1993): Extracellular matrix contains insulin-like growth factor binding protein-5: potentiation of the effects of IGF-I. *J. Cell Biol.* 121(3): 679-687.

- Kalluri R, Shield CF, Todd P, Hudson BG, Neilson EG (1997): Isoform switching of type IV collagen is developmentally arrested in X-linked Alport syndrome leading to increased susceptibility of renal basement membranes to endoproteolysis. *J. Clin. Invest.* 99(10): 2470-2478.
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW (2000): Activation of HIF1 α ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(19): 10430-10435.
- Karnieli E, Werner H, Rauscher FJ 3rd, Benjamin LE, LeRoith D (1996): The IGF-I receptor gene promoter is a molecular target for the Ewing's sarcoma-Wilms' tumor 1 fusion protein. *J. Biol. Chem.* 271(32): 19304-19309.
- Karsenty G, Luo G, Hofmann C, Bradley A (1996): BMP 7 is required for nephrogenesis, eye development, and skeletal patterning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 785: 98-107.
- Kashtan CE (1999): Alport syndrome. An inherited disorder of renal, ocular, and cochlear basement membranes. *Medicine* 78(5): 338-360.
- Kashtan CE, Kim Y (1992): Distribution of the alpha 1 and alpha 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. *Kidney Int.* 42(1): 115-126.
- Kashtan CE, Kim Y, Lees GE, Thorner PS, Virtanen I, Miner JH (2001): Abnormal glomerular basement membrane laminins in murine, canine, and human Alport syndrome: aberrant laminin alpha2 deposition is species independent. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(2): 252-260.
- Kennedy D, Ramsdale T, Mattick J, Little M (1996): An RNA recognition motif in Wilms' tumour protein (WT1) revealed by structural modelling. *Nat. Genet.* 12(3): 329-331.
- Kent J, Wheatley SC, Andrews JE, Sinclair AH, Koopman P (1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122(9): 2813-2822.
- Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM (2003): Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat. Genet.* 34(3): 303-307.
- Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY (2001): Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276(10): 7614-7620.
- Kim YG, Alpers CE, Brugarolas J, Johnson RJ, Couser WG, Shankland SJ (1999): The cyclin kinase inhibitor p21CIP1/WAF1 limits glomerular epithelial cell proliferation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55(6): 2349-2361.
- Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D, Wiggins R (2001): Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney Int.* 60(3): 957-968.
- Kinane TB, FINDER JD, Kawashima A, Brown D, Abbate M, Fredericks WJ, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd, Ercolani L (1996): LLC-PK1 cell growth is repressed by WT1 inhibition of G-protein α_{i-2} protooncogene transcription. *J. Biol. Chem.* 270(51): 30760-30764.
- Kinane TB, FINDER JD, Kawashima A, Brown D, Abbate M, Shang C, Fredericks WJ, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP, Ercolani L (1994): Growth of LLC-PK1 renal cells is mediated by EGR-1 up-regulation of G protein alpha i-2 protooncogene transcription. *J. Biol. Chem.* 269(44): 27503-27509.
- Kincaid-Smith P (1991): The renal lesion of preeclampsia revisited. *Am. J. Kidney Dis.* 17: 144-148.
- King JA, Marker PC, Seung KJ, Kingsley DM (1994): BMP5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short ear mice. *Dev. Biol.* 166(1): 112-122.
- Kitamura M (1998): TGF- β 1 as an endogenous defender against macrophage-triggered stromelysin gene expression in the glomerulus. *J. Immunol.* 160(10): 5163-5168.
- Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, Yanagisawa H, Tadokoro K, Yamada M (1999): Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum. Mutat.* 14(6): 466-470.
- Korhonen M, Ylanne J, Laitinen L, Virtanen I (1990): The alpha 1-alpha 6 subunits of integrins are characteristically expressed in distinct segments of developing and adult human nephron. *J. Cell Biol.* 111(3): 1245-1254.
- Koshikawa N, Minegishi T, Sharabi A, Quaranta V, Seiki M (2005): Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *J. Biol. Chem.* 280(1): 88-93.
- Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC, Jaenisch R (1996): Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122(11): 3537-3547.

- Kreidberg JA, Sarlola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenish R (1993): WT-1 is required for early kidney development. *Cell* 74(4): 679-691.
- Kretzler M, Schroppe B, Merkle M, Huber S, Mundel P, Horster M, Schlondorff D (1998): Detection of multiple vascular endothelial growth factor splice isoforms in single glomerular podocytes. *Kidney Int. Suppl.* 67: 159-161.
- Kretzler M, Teixeira VP, Berger T, Blattner SM, Unschuld PG, Cohen CD, Schlondorff D (2001): Altering glomerular epithelial function *in vitro* using transient and stable transfection. *J. Nephrol.* 14(3): 211-219.
- Krones-Herzig A, Mittal S, Yule K, Liang H, English C, Urcis R, Soni T, Adamson ED, Mercola D (2005): Early growth response 1 acts as a tumor suppressor *in vivo* and *in vitro* via regulation of p53. *Cancer Res.* 65(12): 5133-5143.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laity JH, Dyson HJ, Wright PE (2000): Molecular basis for modulation of biological function by alternate splicing of the Wilms' tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(22): 11932-11935.
- Lambert GL, Barker S, Corder R (1998): Comparison of the regulation of endothelin-2 and endothelin-converting enzyme-1 b [correction of beta] by forskolin and TNF-alpha in ACHN cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 32(1): 168.
- Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B (1995): Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J. Cell Biol.* 131(6): 1903-1915.
- Lappin DW, McMahon R, Murphy M, Brady HR (2002): Gremlin: an example of the re-emergence of developmental programmes in diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant. Suppl.* 17(9): 65-67.
- Larsson SH, Charlieu JP, Miyagawa K, Engelkamp D, Ross A, van Heyningen V, Hastie ND (1995): Subnuclear localization of WT1 in splicing or transcription factor domains is regulated by alternative splicing. *Cell* 81(3): 391-401.
- Li C, Routsalainen V, Tryggvason K, Shaw AS, Miner JH (2000): CD2AP is expressed with nephrin in developing podocytes and is found widely in mature kidney and elsewhere. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279(4): F785-F792.
- Lin R, Amizuka N, Sasaki T (2002): 1Alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 promotes vascularization of the chondro-osseous junction by stimulating expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase 9. *J. Bone Miner Res.* 17(9): 1604-1612.
- Little M, Carman G, Donaldson E (2000a): Novel WT1 exon 9 mutation (D396Y) in a patient with early onset Denys Drash syndrome. *Hum. Mutat.* 15: 389.
- Little M, Holmes G, Bickmore W, van Heyningen V, Hastie N, Wainwright B (1995): DNA binding capacity of the WT1 protein is abolished by Denys-Drash syndrome WT1 point mutations. *Hum. Mol. Genet.* 4(3): 351-358.
- Little M, Holmes G, Walsh P (1999): WT1: what has the last decade told us? *Bioessays* 21(3): 191-202.
- Little M, Wells C (1997): A clinical overview of WT1 gene mutations. *Hum. Mutat.* 9(3): 209-225.
- Little MH, Williamson KA, Mannens M, Kelsey A, Gosden C, Hastie ND, van Heyningen V (1993): Evidence that WT1 mutations in Denys-Drash syndrome patients may act in a dominant-negative fashion. *Hum. Mol. Genet.* 2(3): 259-264.
- Little NA, Hastie ND, Davies RC (2000b): Identification of WTAP, a novel Wilms' tumour 1-associating protein. *Hum. Mol. Genet.* 9(15): 2231-2239.
- Lu M, Perez VL, Ma N, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK, Adamis AP (1999): VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression *in vivo*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40(8): 1808-1812.
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9(22): 2808-2820.
- Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, Sukhatme VP, Rauscher FJ 3rd (1991): Transcriptional repression mediated by the WT1 Wilms tumor gene product. *Science.* 253(5027): 1550-1553.
- Maheswaran S, Park S, Bernard A, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Hill DE, Haber DA (1993): Physical and functional interaction between WT1 and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(11): 5100-5104.
- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM (2000): Osteoprotegerin is an alpha v beta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275(28): 20959-20962.

- Manes S, Llorente M, Lacalle RA, Gomez-Mouton C, Kremer L, Mira E, Martinez AC (1999): The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 274(11): 6935-6945.
- Martin J, Knowlden J, Davies M, Williams JD (1994): Identification and independent regulation of human mesangial cell metalloproteinases. *Kidney Int.* 46(3): 877-885.
- Matrisian LM (1992): The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays* 14(7): 455-463.
- Matrisian LM (1994): Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732: 42-50.
- Matsell DG, Delhanty PJ, Stepaniuk O, Goodyear C, Han VK (1994): Expression of insulin-like growth factor and binding protein genes during nephrogenesis. *Kidney Int.* 46(4): 1031-1042.
- Mayo MW, Wang CY, Drouin SS, Madrid LV, Marshall AF, Reed JC, Weissman BE, Baldwin AS (1999): WT1 modulates apoptosis by transcriptionally upregulating the bcl-2 proto-oncogene. *EMBO J.* 18(14): 3990-4003.
- Menke A, McInnes L, Hastie ND, Schedl A (1998): The Wilms' tumor suppressor WT1: approaches to gene function. *Kidney Int.* 53(6): 1512-1518.
- Menke AL, Fleming S, Ross A, Medine CN, Patek CE, Spraggon L, Hughes J, Clarke AR, Hastie ND (2003): The wt1-heterozygous mouse; a model to study the development of glomerular sclerosis. *J. Pathol.* 200(5): 667-674.
- Michaud JL, Lemieux LI, Dube M, Vanderhyden BC, Robertson SJ, Kennedy CR (2003): Focal and segmental glomerulosclerosis in mice with podocyte-specific expression of mutant alpha-actinin-4. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14(5): 1200-1211.
- Michos O, Panman L, Vintersten K, Beier K, Zeller R, Zuniga A (2004): Gremlin-mediated BMP antagonism induces the epithelial-mesenchymal feedback signaling controlling metanephric kidney and limb organogenesis. *Development* 131(14): 3401-1410.
- Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A (1993): High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72(6): 835-846.
- Miller CJ (2005): Description of simpleaffy: easy analysis routines for Affymetrix data. (<http://www.bioconductor.org/repository/devel/vignette/simpleAffy.pdf>).
- Miner JH, Sanes JR (1996): Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome. *J. Cell Biol.* 135(5): 1403-1413.
- Miner, J.H. (1998): Developmental biology of glomerular basement membrane components. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 7(1): 13-19.
- Miyamoto N, Yoshida M, Kuratani S, Matsuo I, Aizawa S (1997): Defects of urogenital development in mice lacking Emx2. *Development* 124(9): 1653-1664.
- Miyamoto S, Yano K, Sugimoto S, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Kodama K, Goya M, Chiba T, Ochiai A (2004): Matrix metalloproteinase-7 facilitates insulin-like growth factor bioavailability through its proteinase activity on insulin-like growth factor binding protein 3. *Cancer Res.* 64(2): 665-671.
- Miyazaki Y, Oshima K, Fogo A, Hogan BL, Ichikawa I (2000): Bone morphogenetic protein 4 regulates the budding site and elongation of the mouse ureter. *J. Clin. Invest.* 105(7): 863-873.
- Miyazaki Y, Ueda H, Yokoo T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Matsusaka T, Ichikawa I, Hosoya T (2006): Inhibition of endogenous BMP in the glomerulus leads to mesangial matrix expansion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340(2): 681-688.
- Miyoshi Y, Ando A, Egawa C, Taguchi T, Tamaki Y, Tamaki H, Sugiyama H, Noguchi S (2002): High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 8(5): 1167-1171.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y, Verellen-Dumoulin C, Chan B, Schroder CH, Smeets HJ (1994): Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat. Genet.* 8(1): 77-81.
- Moffett P, Bruening W, Nakagama H, Bardeesy N, Housman D, Housman DE, Pelletier J (1995): Antagonism of WT1 activity by protein self-association. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(24): 11105-11109.
- Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A (1999): YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development* 126(9): 1845-1857.
- Morison IM, Becroft DM, Taniguchi T, Woods CG, Reeve AE (1996): Somatic overgrowth associated with overexpression of insulin-like growth factor II. *Nat. Med.* 2(3): 311-316.

- Moses MA (1997): The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Stem Cells* 15(3): 180-189.
- Moshier JA, Skunca M, Wu W, Boppana SM, Rauscher FJ 3rd, Dosescu J (1996): Regulation of ornithine decarboxylase gene expression by the Wilms' tumor suppressor WT1. *Nucleic Acids Res.* 24(6): 1149-1157.
- Mrowka C, Schedl A (2000): Wilms' tumor suppressor gene WT1: from structure to renal pathophysiologic features. *J. Am. Soc. Nephrol. Suppl.* 16: 106-115.
- Muirhead EE (1988): The renomedullary system of blood pressure control. *Am. J. Med. Sci.* 295(4): 231-233.
- Muller GA, Markovic-Lipkovski J, Muller CA (1991): Intercellular adhesion molecule-1 expression in human kidneys with glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 36(4): 203-208.
- Mundel P, Gilbert P, Kriz W (1991): Podocytes in glomerulus of rat kidney express a characteristic 44 kD protein. *J. Histochem. Cytochem.* 39(8): 1047-1056.
- Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Kruger M, Reiser J, Kriz W (1997a): Synaptopodin: An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J. Cell Biol.* 139(1): 193-204.
- Mundel P, Kriz W (1995): Structure and function of podocytes: an update. *Anat. Embryol.* 192(5): 385-397.
- Mundel P, Shankland SJ (1999): Glomerular podocytes and adhesive interaction with glomerular basement membrane. *Exp. Nephrol.* 7(2): 160-166.
- Mundlos S; Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B (1993): Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms tumor gene WT1 in embryonic and adult tissue. *Develop.* 119(4): 1329-1341.
- Murer L, Zacchello G, Basso G, Scarpa A, Montini G, Chiozza ML, Zacchello F (1994): Immunohistochemical distribution of endothelin in biopsies of pediatric nephrotic syndrome. *Am. J. Nephrol.* 14(3): 157-161.
- Murphy G, Cockett MI, Ward RV, Docherty AJ (1991): Matrix metalloproteinase degradation of elastin, type IV collagen and proteoglycan. A quantitative comparison of the activities of 95 kDa and 72 kDa gelatinases, stromelysins-1 and -2 and punctuated metalloproteinase (PUMP). *Biochem. J.* 277(1): 277-279.
- Myint E, Brown DJ, Ljubimov AV, Kyaw M, Kenney MC (1996): Cleavage of human corneal type VI collagen alpha 3 chain by matrix metalloproteinase-2. *Cornea* 15(5): 490-496.
- Nagase H, Woessner JF Jr (1999): Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* 274(31): 21491-42149.
- Nagata M, Watanabe T (1997): Podocytes in metanephric organ culture express characteristic in vivo phenotypes. *Histochem. Cell Biol.* 108(1): 17-25.
- Natoli TA, Liu J, Eremina V, Hodgins K, Li C, Hamano Y, Mundel P, Kalluri R, Miner JH, Quaggin SE (2002a): A mutant form of the Wilms' tumor suppressor gene WT1 observed in Denys-Drash syndrome interferes with glomerular capillary development. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13(8): 2058-2067.
- Natoli TA, McDonald A, Alberta JA, Taglienti ME, Housman DE, Kreidberg JA (2002b): A mammal-specific exon of WT1 is not required for development or fertility. *Mol. Cell Biol.* 22(12): 4433-4438.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z (1999): Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.* 13(1): 9-22.
- Nichols KE, Re GG, Yan YX, Garvin AJ, Haber DA (1995): WT1 reduces expression of insulin-like growth factor 2 in Wilms' tumor cells. *Cancer Res.* 55(20): 4540-4543.
- Noakes PG, Miner JH, Gautam M, Cunningham JM, Sanes JR, Merlie JP (1995): The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat. Genet.* 10(4): 400-406.
- Obermuller N, Morente N, Kranzlin B, Gretz N, Witzgall R (2001): A possible role for metalloproteinases in renal cyst development. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280(3): F540-F550.
- Ogata T, Muroya K, Sasagawa I, Kosho T, Wakui K, Sakazume S, Ito K, Matsuo N, Ohashi H, Nagai T (2000): Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int.* 58(6): 2281-2290.
- Ohtaka A, Ootaka T, sato H, Soma J, Sato T, Saito T, Ito S (2000): Significance of early phenotypic change of glomerular podocytes detected by Pax2 in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Am. J. Kidney Dis.* 39(3): 475-485.

- Oosterwijk E, van Muijen GN, Oosterwijk-Wakka MG, Warnaar SO (1990): Expression of intermediate-sized filaments in developing and adult human kidney and in renal cell carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 38(3): 385-392.
- Orsio S, Benigni A, Bruzzi I, Corna D, Perico N, Zoja C, Benatti L, Remuzzi G (1993): Renal endothelin gene expression is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Kidney Int.* 43(2): 354-358.
- Orlando RA, Takeda T, Zak B, Schmieder S, Benoit VM, McQuistan T, Furthmayr H, Farquhar MG (2001): The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12(8): 1589-1598.
- Ortiz A, Bustos C, Alonso J, Alcazar R, Lopez-Armada MJ, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J (1995): Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of experimental and human glomerulonephritis. *Adv. Nephrol. Necker Hosp.* 24: 53-77.
- Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J (1999): VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J. Clin. Invest.* 104(7): 913-923.
- Palmer RE, Kotsianti A, Cadman B, Boyd T, Gerald W, Haber DA (2001): WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr. Biol.* 11(22): 1805-1809.
- Park IS, Kiyomoto H, Alvarez F, Xu YC, Abboud HE, Abboud SL (1998): Preferential expression of insulin-like growth factor binding proteins-1, -3, and -5 during early diabetic renal hypertrophy in rats. *Am. J. Kidney Dis.* 32(6): 1000-1010.
- Patek CE, Fleming S, Miles CG, Bellamy CO, Lodomery M, Spraggon L, Mullins J, Hastie ND, Hooper ML (2003): Murine Denys-Drash syndrome: evidence of podocyte de-differentiation and systemic mediation of glomerulosclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 12(18): 2379-2394.
- Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlier JP, Clarke AR, Miyagawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ (1999): A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(6): 2931-2936.
- Patrakka J, Kestilä M, Wartiovaara J, Ruotsalainen V, Tissari P, Lenkkeri U, Männikkö M, Visapää I, Holmberg C, Rapola J, Tryggvason K, Jalanko H (2000): Congenital nephrotic syndrome of the Finnish type (NPHS1): Features resulting from different mutations in Finnish patients. *Kidney Int.* 58(3): 972-980.
- Pawluczyk IZ, Harris KP (1998): Cytokine interactions promote synergistic fibronectin accumulation by mesangial cells. *Kidney Int.* 54(1): 62-70.
- Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, Mauer SM, Manivel JC, Striegel JE, Houghton DC, Junien C, Habib R, Fouser L (1991): Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 67(2): 437-447.
- Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO, Churchill AJ (2005): Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia* 48(11): 2422-2427.
- Pietschke MG (2002). Molekulare Charakterisierung des Wilms-Tumor 1-Gens bei der Pathogenese des kongenitalen / infantilen nephrotischen Syndroms. Dissertation Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Pilewski JM, Liu L, Henry AC, Knauer AV, Feghali-Bostwick CA (2005): Insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5 are overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis and contribute to extracellular matrix deposition. *Am. J. Pathol.* 166(2): 399-407.
- Piscione TD, Yager TD, Gupta IR, Grinfeld B, Pei Y, Attisano L, Wrana JL, Rosenblum ND (1997): BMP-2 and OP-1 exert direct and opposite effects on renal branching morphogenesis. *Am. J. Physiol.* 273(6): F961-F975.
- Pober J, Cotran RS (1991): What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Lab. Invest.* 64(3): 301-305.
- Pober JS, Cotran RS (1991): Immunologic interactions of T lymphocytes with vascular endothelium. In "Advances in Immunology" (Dixon FJ). New York: Academic Press.
- Pricci F, Pugliese G, Romano G, Romeo G, Locuratolo N, Pugliese F, Mene P, Galli G, Casini A, Rotella CM, Di Mario U (1996): Insulin-like growth factors I and II stimulate extracellular matrix production in human glomerular mesangial cells. Comparison with transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 137(3): 879-885.
- Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, Porteous D, Gosden C, Bard J, Buckler A, Pelletier J, Housman D, van Heyningen V, Hastie N (1990): The candidate Wilms' tumour gene is involved in genitourinary development. *Nature* 346(6280): 194-197.

- Putaala H, Sainio K, Sariola H, Tryggvason K (2000): Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11(6): 991-1001.
- Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, Wartiovaara J, Tryggvason K (2001): The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain, and pancreas: Inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* 10(1): 1-8.
- Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, Rossant J (1999): The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development* 126(24): 5771-5783.
- Ransom RF (2004): Podocyte proteomics. *Contrib. Nephrol.* 141: 189-211.
- Rauscher FJ 3rd (1993): The WT1 Wilms tumor gene product: A developmentally regulated transcription factor in the kidney that functions as a tumor suppressor. *FASEB J.* 7(10): 896-903.
- Rauscher FJ 3rd (1993): Tumor suppressor genes which encode transcriptional repressors: studies on the EGR and Wilms' tumor (WT1) gene products. *Adv. Exp. Med. Biol.* 348: 23-29.
- Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Tournay OE, Cook DM, Curran T (1990): Binding of the Wilms' tumor locus zinc finger protein to the EGR-1 consensus sequence. *Science* 250(4985): 1259-1262.
- Reddy JC, Licht JD (1996): The WT1 Wilms' tumor suppressor gene: how much do we really know? *Biochem. Biophys. Acta.* 1287(1): 1-28.
- Reddy JC, Morris JC, Wang J, English MA, Haber DA, Shi Y, Licht JD (1995): WT1-mediated transcriptional activation is inhibited by dominant negative mutant proteins. *J. Biol. Chem.* 270(18): 10878-10884.
- Renshaw J, King-Underwood L, Pritchard-Jones K (1997): Differential splicing of exon 5 of the Wilms tumour (WT1) gene. *Genes Chromosomes Cancer* 19(4): 256-266.
- Ribes D, Fischer E, Calmont A, Rossert J (2003): Transcriptional control of epithelial differentiation during kidney development. *J. Am. Soc. Nephrol. Suppl.* 14(1): 9-15.
- Richard DJ, Schumacher V, Royer-Pokora B, Roberts SG (2001): Par4 is a coactivator for a splice isoform-specific transcriptional activation domain in WT1. *Genes Dev.* 15(3): 328-339.
- Richardson RL, Hausman GJ, Wright JT (1998): Growth factor regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins (IGFBP) and preadipocyte differentiation in porcine stromal-vascular cell cultures. *Growth Dev. Aging* 62(1-2): 3-12.
- Rivlis I, Milkiewicz M, Boyd P, Goldstein J, Brown MD, Egginton S, Hansen FM, Hudlicka O, Haas TL (2002): Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283(4): H1430-H1438.
- Robert B, Zhao X, Abrahamson DR (2000): Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF(164) in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279(2): F275-F282.
- Roberts WG, Palade GE (1995): Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* 108(6): 2369-2379.
- Roccatello D, Mosso R, Ferro M, Polloni R, De Filippi PG, Quattrocchio G, Bancale E, Cesano G, Sena LM, Piccoli G (1994): Urinary endothelin in glomerulonephritis patients with normal renal function. *Clin. Nephrol.* 41(6): 323-330.
- Rothenpieler UW, Dressler GR (1993): Pax-2 is required for mesenchyme-to-epithelium conversion during kidney development. *Development* 119(3): 711-720.
- Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, Reponen P, Hess M, Kestilä M, Holmberg C, Salonen R, Heikinheimo M, Wartiovaara J, Tryggvason K, Jalanko H (2000): Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis. *Am. J. Pathol.* 157(6): 1905-1916.
- Rupprecht HD, Drummond IA, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Sukhatme VP (1994): The Wilms' tumor suppressor gene WT1 is negatively autoregulated. *J. Biol. Chem.* 269(8): 6198-6206.
- Ryan G, Steele-Perkins V, Morris JF, Rauscher FJ 3rd, Dressler GR (1995): Repression of Pax-2 by WT1 during normal kidney development. *Development* 121(3): 867-875.
- Sandra A, Boes M, Dake BL, Stokes JB, Bar RS (1998): Infused IGF-I/IGFBP-3 complex causes glomerular localization of IGF-I in the rat kidney. *Am. J. Physiol.* 275(1 Pt 1): E32-E37.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M (1994): A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370(6484): 61-65.
- Sato Y, Kanno S, Oda N, Abe M, Ito M, Shitara K, Shibuya M (2000): Properties of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in signal transduction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902: 201-205.
- Saxen L, Sariola H (1987): Early organogenesis of the kidney. *Pediatr. Nephrol.* 1(3): 385-392.

- Sayers R, Kalluri R, Rodgers K, Shield C, Meehan D, Cosgrove D (1999): Role for transforming growth factor- β 1 in Alport renal disease progression. *Kidney Int.* 56(5): 1662-1673.
- Schaefer L, Raslik I, Grone HJ, Schonherr E, Macakova K, Ugorcakova J, Budny S, Schaefer RM, Kresse H (2001): Small proteoglycans in human diabetic nephropathy: discrepancy between glomerular expression and protein accumulation of decorin, biglycan, lumican, and fibromodulin. *FASEB J.* 15(3): 559-561.
- Scharnhorst V, Dekker P, Van der Eb AJ, Jochemsen AG (1999): Internal translation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties. *J. Biol. Chem.* 274(33): 23456-23462.
- Scharnhorst V, Kranenburg O, van der Eb AJ, Jochemsen AG (1997): Differential regulation of the Wilms' tumor gene, WT1, during differentiation of embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Cell Growth Differ.* 8(2): 133-143.
- Schena FP, Gesualdo L (2005): Pathogenic mechanisms of diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol. Suppl.* 16(1): 30-33.
- Schlessinger J, Ullrich A (1992): Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron* 9(3): 383-391.
- Schuhen S (2002): Molekulare Charakterisierung von Wilms Tumoren mit und ohne WT1-Mutationen. Diplomarbeit Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf.
- Schumacher V, Jeruschke S, Eitner F, Becker J, Pitschke G, Ince Y, Miner JH, Leuschner I, Engers R, Schulze Everding A, Bulla M, Royer-Pokora B (2007): Impaired glomerular maturation and lack of *VEGF165b* in Denys-Drash syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18(3): 719-729.
- Schumacher V, Scharer K, Wuhl E, Altrogge H, Bonzel KE, Guschmann M, Neuhaus TJ, Pollastro RM, Kuwertz-Broking E, Bulla M, Tondera AM, Mundel P, Helmchen U, Waldherr R, Weirich A, Royer-Pokora B (1998): Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations. *Kidney Int.* 53(6): 1594-1600.
- Schumacher V, Schneider S, Figge A, Wildhardt G, Harms D, Schmidt D, Weirich A, Ludwig R, Royer-Pokora B (1997): Correlation of germ-line mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(8): 3972-3977.
- Seron D, Cameron JS, Haskard DO (1991): Expression of VCAM-1 in the normal and diseased kidney. *Nephrol. Dial. Transplant.* 6(12): 917-922.
- Sharif K, Goyal M, Kershaw D, Kunkel R, Wiggins R (1998): Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of *Glepp1* in the developing glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. *Exp. Nephrol.* 6(3): 324-344.
- Sharma PM, Bowman M, Madden SL, Rauscher FJ 3rd, Sukumar S (1994): RNA editing in the Wilms' tumor susceptibility gene, WT1. *Genes Dev.* 8(6): 720-731.
- Shih NY, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner J, Shaw AS (1999): Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286(5438): 312-315.
- Shiozawa S (2000): Participation of macrophages in glomerular sclerosis through the expression and activation of matrix metalloproteinases. *Pathol. Int.* 50(6): 441-457.
- Sim EU, Smith A, Szilagi E, Rae F, Ioannou P, Lindsay MH, Little MH (2002): Wnt-4 regulation by the Wilms' tumour suppressor gene, WT1. *Oncogene* 21(19): 2948-2960.
- Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS, Abboud HE (1999): Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am. J. Physiol.* 276(3): F382-F389.
- Smeets HJ, Knoers VV, van de Heuvel LP, Lemmink HH, Schroder CH, Monnens LA (1996): Hereditary disorders of the glomerular basement membrane. *Pediatr. Nephrol.* 10(6): 779-788.
- Smoyer WE, Mundel P (1998): Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J. Mol. Med.* 76(3-4): 172-183.
- Smyth GK (2005): Limma: linear models for microarray data. In "Bioinformatics and Computational biology solutions using R and Bioconductor" (Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W). New York: Springer.
- Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A (2002): MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J.* 16(6): 555-564.
- Steinhausen M, Snoei H, Parekh N, Baker R, Johnson PC (1983): Hydronephrosis: a new method to visualize vas afferens, efferens, and glomerular network. *Kidney Int.* 23(6): 794-806.

- Sterzel RB, Hartner A, Schlotzer-Schrehardt U, Voit S, Hausknecht B, Doliana R, Colombatti A, Gibson MA, Braghetta P, Bressan GM (2000): Elastic fiber proteins in the glomerular mesangium in vivo and in cell culture. *Kidney Int.* 58(4): 1588-1602.
- Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R (2003): Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J. Biol. Chem.* 278(15): 12605-12608.
- Suzuki K, Takahashi K (2001): Actin filament assembly and actin-myosin contractility are necessary for anchorage- and EGF-dependent activation of phospholipase Cgamma. *J. Cell Physiol.* 189(1): 64-71.
- Tanney DC, Feng L, Pollock AS, Lovett DH (1998): Regulated expression of matrix metalloproteinases and TIMP in nephrogenesis. *Dev. Dyn.* 213(1): 121-129.
- Thate C, Englert C, Gessler M (1998): Analysis of WT1 target gene expression in stably transfected cell lines. *Oncogene* 17(10): 1287-1294.
- Thomas S, Vanuytsel J, Gruden G, Rodriguez V, Burt D, Gnudi L, Hartley B, Viberti G (2000): Vascular endothelial growth factor receptors in human mesangium in vitro and in glomerular disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11(7): 1236-1243.
- Thrailkill KM, Quarles LD, Nagase H, Suzuki K, Serra DM, Fowlkes JL (1995): Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology* 136(8): 3527-3533.
- Topol LZ, Marx M, Laugier D (1997): Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol. Cell Biol.* 17(8): 4801-4810.
- Torban E, Eccles MR, Favor J, Goodyer PR (2000): PAX2 suppresses apoptosis in renal collecting duct cells. *Am. J. Pathol.* 157(3): 833-842.
- Torres M, Gomez-Pardo E, Dressler GR, Gruss P (1995). Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development* 121(12): 4057-4065.
- Tyler JA (1989): Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem. J.* 260(2): 543-548.
- Uchio K, Manabe N, Kinoshita A, Tamura K, Miyamoto M, Ogura A, Yamamoto Y, Miyamoto H (1999): Abnormalities of extracellular matrices and transforming growth factor beta1 localization in the kidney of the hereditary nephrotic mice (ICGN strain). *J. Vet. Med. Sci.* 61(7): 769-776.
- Uchio K, Manabe N, Tamura K, Miyamoto M, Yamaguchi M, Ogura A, Yamamoto Y, Miyamoto H (2000): Decreased matrix metalloproteinase activity in the kidneys of hereditary nephrotic mice (ICGN strain). *Nephron* 86(2): 145-151.
- Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von Bredow DC, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT (2003): Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res.* 63(9): 2292-2299.
- van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C, Jefferson JA, Maxwell AP, Monnens LA, Schroder CH, Smeets HJ (2000): Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int.* 58(5): 1870-1875.
- Venkatachalam MA, Kritz W (1998): Anatomy. In „Hetinstall's Pathology of the kidney“, (Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG). Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Vicanek C, Ferretti E, Goodyer C, Torban E, Moffett P, Pelletier J, Goodyer P (1997): Regulation of renal EGF receptor expression is normal in Denys-Drash syndrome. *Kidney Int.* 52(3): 614-619.
- Vilceck J, Lee TH (1991): New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J. Biol. Chem.* 266(12): 7313-7316.
- Vize PD, Woolf AS, Bard JBL (2003): The Kidney. From normal development to congenital disease. USA: Elsevier Science.
- Voldborg BR, Damstrup L, Spang-Thomsen M, Poulsen HS (1997): Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Ann. Oncol.* 8(12): 1197-1206.
- Vukicevic S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath TK (1996): Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenic protein 7): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(17): 9021-9026.
- Wang ZY, Madden SL, Deuel TF, Rauscher FJ 3rd (1992): The Wilms' tumor gene product, WT1, represses transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J. Biol. Chem.* 267(31): 21999-22002.
- Wang ZY, Qiu QQ, Enger KT, Deuel TF (1993): A second transcriptionally active DNA-binding site for the Wilms tumor gene product, WT1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90(19): 8896-8900.

- Wang ZY, Qui QQ, Huang J, Gurrieri M, Deuel F (1995): Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms' tumor suppressor gene, WT1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways. *Oncogene* 10(3): 415-422.
- Werb Z (1997): ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 91(4): 439-442.
- Werner H, Shen-Orr Z, Rauscher FJ 3rd, Morris JF, Roberts CT Jr, LeRoith D (1995): Inhibition of cellular proliferation by the Wilms' tumor suppressor WT1 is associated with suppression of insulin-like growth factor I receptor gene expression. *Mol. Cell Biol.* 15(7): 3516-3522.
- Wiggins RC, Wiggins JE, Goyal M, Wharram BL, Thomas PE (1995): Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: Characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p23. *Genomics* 27(1): 174-181.
- Wilson C, Miller CJ (2005): Simpleaffy: A BioConductor package for Affymetrix quality control and data analysis. *Bioinformatics* 21(18): 3683-3685.
- Wilson CL, Matrisian LM (1996): Matrilysin: an epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28(2): 123-136.
- Woessner JF Jr (1991): Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5(8): 2145-2154.
- Yamashita M, Horikoshi S, Asanuma K, Takahara H, Shirato I, Tomino Y (2004): Tensin is potentially involved in extracellular matrix production in mesangial cells. *Histochem. Cell Biol.* 121(3): 245-254.
- Yang AH, Chen JY, Chen BF (2004): The dysregulated glomerular cell growth in Denys-Drash syndrome. *Virchows Arch.* 445(3): 305-314.
- Yang Y, Gubler MC, Beaufrils H (2002): Dysregulation of podocyte phenotype in idiopathic collapsing glomerulopathy and HIV-associated nephropathy. *Nephron* 91(3): 416-423.
- Yang Y, Jeanpierre C, Dressler GR, Lacoste M, Niaudet P, Gubler MC (1999): WT1 and PAX-2 podocyte expression in Denys-Drash syndrome and isolated diffuse mesangial sclerosis. *Am. J. Pathol.* 154(1): 181-192.
- Yang Y, Zhang SY, Sich M, Beziau A, van den Heuvel LP, Gubler MC (2001): Glomerular extracellular matrix and growth factors in diffuse mesangial sclerosis. *Pediatr. Nephrol.* 16(5): 429-438.
- Yang YW-H, Yanagishita M, Rechler MM (1996): Heparin inhibition of insulin-like growth factor-binding protein-3 binding to human fibroblasts and rat glioma cells: Role of heparan sulfate proteoglycans. *Endocrinology* 137(10): 4363-4371.
- Ylöstalo J, Smith JR, Pochampally RR, Matz R, Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Prockop DJ (2006): Use of differentiating adult stem cells (marrow stromal cells) to identify new downstream target genes for transcription factors. *Stem Cells* 24(3): 642-652.
- Zenker M, Aigner T, Wendler O, Tralau T, Muntefering H, Fenski R, Pitz S, Schumacher V, Royer-Pokora B, Wuhl E. (2004): Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 13(21): 2625-2632.
- Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G (1994): Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* 93(2): 536-542.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Royer-Pokora für die Möglichkeit, die Arbeit an ihrem Institut durchzuführen. Außerdem danke ich ihr für das Gutachten und die Abnahme der Prüfung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner direkten 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. Ihre hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen wird mir stets in Erinnerung bleiben. Außerdem danke ich Ihnen für die konstruktive Kritik und die Korrekturen bei der Anfertigung der Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Martin möchte ich herzlich für das Gutachten und die Bereitschaft zur Abnahme der Prüfung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Beye, Herrn Prof. Dr. Hegemann und Frau Prof. Dr. Rose 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 Prof. J. Miner (St. Louis, USA), Prof. L. Sorokin (Lund, Schweden), Prof. A. Shaw (St. Louis, USA), Prof. K. Tryggvason (Stockholm, Schweden), Prof. C. Antignac (Paris, Frankreich), Prof. K. Amann (Erlangen) sowie Dr. F. Eitner (Aachen) 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. Yasemin Ince, Dipl.-Biol. Banu Güler, Dipl.-Biol. Conny Uschkereit, Dipl.-Biol. Meike Küff, Dipl.-Ing. Manfred Beier und Dr. H.-G. Scheil.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mann, der mit liebevoller Unterstützung und immenser Geduld einen maßgeblichen Anteil am Erfolg dieser Arbeit hat.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die durch kleinere und größere Hilfestellungen, wie Korrekturlesen und liebevoller Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die Förderung meiner Promotion durch die Forschungskommission der Heinrich-Heine Universität bedanke ich mich sehr.

Curriculum Vitae

Stefanie Jeruschke, geb. Schuhen
geboren am 08.06.1976 in Siegen
verheiratet

Schulbildung

- 07/1982 – 06/1986 Grundschule in Rudersdorf
07/1986 – 06/1995 Städtisches Ganztagsgymnasium am Rosterberg in Siegen

Hochschulbildung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- 10/1995 – 04/2002 Biologie-Studium mit Abschluss Diplom

Thema der Diplomarbeit:
Molekulare Charakterisierung von Wilms-Tumoren mit und ohne *WT1*-
Mutationen

Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- 06/2002 – 12/2007 Promotion am Institut für Humangenetik und Anthropologie

Thema der Promotion:
Aufklärung molekularer Pathomechanismen des *WT1*-assoziierten
nephrotischen Syndroms (Förderung der Promotion durch die
Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität)

Berufstätigkeit

- 10/1999 – 04/2002 Studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
04/2002 – 12/2002 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik und
Anthropologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01/2003 – 03/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik und
Anthropologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
-

Düsseldorf, 11.12.2007

Stefanie Jeruschke