

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II

Nephrologie und Allgemeine Innere Medizin

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Etablierung einer Podozytenzelllinie mit verminderter alpha-
Galaktosidase A-Aktivität als Modell für den Podozytenschaden bei
Morbus Fabry

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Claudia Larissa Weitbrecht

aus Gummersbach

promoviert am 18.11.2015

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h.c. Th. Krieg

1. Berichterstatterin: Professor Dr. med. C.E. Kurschat

2. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

Köln, 25.04.15

Unterschrift

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Professor Dr. med. Christine Kurschat und Herrn Dr. med. Max C. Liebau und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Stefanie Keller und Frau Ruth Herzog durchgeführt worden.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einleitung	6
1.1 Morbus Fabry	6
1.1.2 Genetik	7
1.1.3 Therapie	8
1.2 Die Niere und Podozyten	10
1.2.1 Die Niere.....	10
1.2.2 Podozyten und ihre Rolle in der Pathologie von Nierenerkrankungen	11
1.2.3 Pathologie der Niere bei Morbus Fabry	12
1.3 Die Fabry-Maus – ein Krankheitsmodell.....	13
1.4 Zielsetzung der Arbeit	14
2. Materialien.....	16
2.1 Geräte	16
2.2 Chemikalien und Laborbedarf	16
2.3 Puffer und Lösungen	18
2.3.1 Enhanced chemiluminescence (ECL).....	19
2.3.2 Gele für Gelelektrophorese.....	20
2.4 Medien	21
2.4.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien	21
2.4.1.1 LB-Medium und Agarplatten	21
2.4.1.2 SOC-Medium	21
2.5 Enzyme	22
2.6 Verbrauchsmaterialien und Kits	23
2.7 Antikörper für Westernblot.....	24

2.8 Plasmide und Vektoren	24
2.9 Oligonukleotide	26
2.9.1 Primer	26
2.9.2 shRNA	27
2.10 Bakterien	28
2.11 Eukaryote Zellen	28
3. Methoden	29
3.1 Klonierung	29
3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.3 Agarosegelelektrophorese	31
3.4 Enzymatischer Verdau	31
3.5 Ligation von cDNA-Abschnitten in Zielvektoren	33
3.6 LR-Rekombination: Gateway Cloning	34
3.7 Transformation chemokompetenter E.coli Bakterien.....	34
3.8 DNA-Präparationen	35
3.8.1 Mini-Präparation	35
3.8.2 Midi- und Maxipräparation	36
3.9 Sequenzierung von DNA.....	37
3.10 Generierung von Knockdown-Zelllinien.....	38
3.10.1 Klonierung von Knockdown- Zelllinien durch RNA-Interferenz	38
3.10.2 Herstellung von Lentiviren und Transduktion der Zielzellen	41
3.11 SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot (Western-Blot).....	42
3.12 QPCR.....	44
3.12.1 RNA Präparation	44
3.12.2 Reverse Transkription.....	45
3.12.3 QPCR	45

3.13 Luciferase-Assay.....	46
3.14 Galaktosidase-Aktivitätsassay.....	46
3.15 Statistik.....	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Klonierung und Validierung von short-hairpin RNA-Konstrukten gegen humane α -Galaktosidase A.....	50
4.1.1 Klonierung von humaner α -Galaktosidase A	50
4.1.2 Klonierung und Testung der Hairpin-Sequenzen gegen humane α -Galaktosidase A	50
4.2 Etablierung und Validierung einer humanen Podozytenzelllinie mit verminderter α -Galaktosidase A-Aktivität.....	54
4.2.1 Die Transduktion humaner Podozyten mit shRNA 459 und shRNA 894 führt zu einer Reduktion der zellulären α -Galaktosidase-mRNA	55
4.2.2 Verminderte α -Galaktosidase A-Aktivität in mit shRNA 459 und shRNA 894-transduzierten Podozyten.....	59
4.3 Klonierung von Δ KDLL und Y365X	62
5. Diskussion.....	66
6. Zusammenfassung.....	72
7. Literaturverzeichnis	73
Anhang 2: Abbildungsverzeichnis	78
Anhang 3: Tabellenverzeichnis	79
8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen.....	81
9. Lebenslauf.....	82

Anhang 1: Abkürzungsverzeichnis

3'UTR 3' untranslated region

Abb. Abbildung

APS Ammoniumperoxidsulfat

BSA Bovines Serum Albumin

cDNA complementary desoxyribonucleic acid

CHO-Zellen Chinese Hamster Ovary-Zellen

ddH₂O destilliertes Wasser

ΔKDLL Trunkation der α-Galaktosidase A bei der die letzten 4 Aminosäuren fehlen

dNTP Desoxyribonucleotidtriphosphat Mix

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Deoxyribonucleic Acid

DTT Dithiothreitol

ECL enhanced chemiluminescence

E.coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

eGFP Enhanced green fluorescent protein

FBS Fetales bovines Serumalbumin

FL Full length

Gb3 Globotriaosylceramid

GLA-Gen α-Galaktosidase A Gen

h human

HEBS 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat

HEK 293t-Zellen human embryonic kidney cells

HeLa-Zellen Henrietta Lacks' immortal cells

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HRPT 1 Hypoxantine phosphoribosyltransferase

i.v. intravenös

Kb Kilobasen
KCL Kaliumchlorid (KCL)
kDa Kilodalton
LB-Medium Luria-Bertani-Medium
MgSO₄ Magnesiumsulfat
mRNA Messenger Ribonucleic Acid
MU Methilumbelliferon
NaCl Natriumchlorid
Na₂HPO₄ Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
NaOH Natriumhydroxid
NDS Normal Donkey Serum
PBS Phosphate Buffered Saline
PCR Polymerase chain reaction
PVDF-Membran Polyvinylidenfluoridmembran
QPCR Real-time quantitative polymerase chain reaction
RL/FL Quotient Renillaflly-Aktivität zu Firefly-Aktivität
RLT-Puffer RNeasy Lysis Buffer (aus Qiagen Kit)
RNA Ribonucleic Acid
RPM Rounds per minute
RPMI-1640 Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS Natriumdodecylsulfat
shRNA short Ribonucleic Acid
siRNA Small Interference Ribonucleic Acid
TEMED Tetramethylethylendiamid
Y365X Trunkation der α -GALaktosidase A mit einem Stoppcodon an Position
365
wt Wildtyp
Zitronensäure 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure

1. Einleitung

1.1 Morbus Fabry

Morbus Fabry ist eine X-chromosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit. Die Erkrankung wurde 1898 erstmals unabhängig voneinander von zwei Dermatologen beschrieben: dem Deutschen Johannes Fabry (17) und dem Engländer William Anderson (4). Daher wird die Krankheit auch „Morbus Anderson-Fabry“ genannt.

Mutationen im Gen, das für α -Galaktosidase A kodiert, führen zu einem Mangel des lysosomalen Enzyms α -Galaktosidase A. α -Galaktosidase A ist eine Glykohydrolase, die terminale α -Galaktosyl-Gruppen abbaut. Unter anderem kann sie das Sphingolipid Globotriaosylceramid (Gb3) zu Laktosylceramid abbauen. Wenn das Enzym fehlt oder nur in geringen Mengen vorhanden ist, lagern sich zunehmend mehr Abbauprodukte, vor allem Gb3, in den Lysosomen ab. Verschiedene Zellen des Körpers sind betroffen, besonders die Zellen der Niere, Perizyten, Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen, Neuronen des autonomen Nervensystems, sowie Epithel- und Endothelzellen (14). Es wird angenommen, dass die zunehmende Ablagerung von Gb3 zum langsam fortschreitenden Funktionsverlust der betroffenen Zellen führt und dadurch Multisystemschäden verursacht werden. Die betroffenen Patienten zeigen die ersten Symptome in der Kindheit oder im Jugendalter. 66% der männlichen und 36% der weiblichen Patienten haben Angiokeratome. Die ersten Angiokeratome treten bereits im Kindesalter an Händen, Ellenbogen, Knien, und in den Flanken, später auch am Genital auf. Im Verlauf zeigen sich die charakteristischen Angiokeratome periumbilikal, an den Lippen und den Handinnenflächen (63). Weitere Symptome sind Akroparästhesien, akute Schmerzepisoden, die Stunden bis Tage dauern, vermindertes Schwitzen (Hypohydrosis), eine Corneatrübung ohne Visusverlust (Cornea verticillata) und gastrointestinale Probleme (24). Im Erwachsenenalter kommt eine kardiale Manifestation hinzu, die eine Herzinsuffizienz, lebensbedrohliche Arrhythmien und Myokardinfarkte zur Folge haben kann. Die cerebrovaskuläre Beteiligung führt zu frühen

Schlaganfällen (15). Eine bedeutende Komplikation ergibt sich aus dem Funktionsverlust der Nierenzellen. Vor Einführung der Enzymersatztherapie entwickelten 50% der Patienten um das 43. Lebensjahr eine chronische Niereninsuffizienz, davon war fast ein Viertel schon vor dem 30. Lebensjahr betroffen. Ein Teil der Patienten zeigte bereits ab dem 20. Lebensjahr eine terminale Niereninsuffizienz. Ab dem 50. Lebensjahr entwickelten alle männlichen Patienten im Verlauf eine terminale Niereninsuffizienz. Vor Einführung der Dialyse und der Nierentransplantation war das terminale Nierenversagen die häufigste Todesursache für Fabry-Patienten, die dann meist im Alter von etwa 40 Jahren verstarben (9). Seit 2001 steht eine Enzymersatztherapie in Form von rekombinanter α -Galaktosidase zur Verfügung. Verschiedene Daten zeigen, dass dadurch der Verlauf der Nierenerkrankung verlangsamt werden kann (19, 20, 35).

1.1.2 Genetik

Morbus Fabry wird X-chromosomal vererbt. Das defekte α -Galaktosidase A Gen (GLA-Gen) befindet sich in der Xq22-Region auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Das GLA-Gen codiert für ein Vorstufen-Glykoprotein, aus dem dann durch posttranslationale Modifikation am Golgi-Apparat das endgültige Enzym (46kDa) gebildet wird. Männer sind von dieser Erkrankung meist stärker betroffen als Frauen, welches auf die X-chromosomale Lokalisation des Defekts zurück zu führen ist, da bei betroffenen Männern in jeder Zelle eine defekte Kopie des GLA-Gens vorliegt. Früher wurde angenommen, dass aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs nur männliche Genträger erkranken. Aber auch weibliche Träger eines defekten Gens zeigen sowohl asymptotische Verläufe als auch voll ausgeprägte Krankheitsbilder (33). Dabei ist die Anzahl der Zellen mit einem defekten Gen nicht allein entscheidend für das Ausmaß der Erkrankung (34). Mittlerweile sind mehr als 600 verschiedene Mutationen im GLA-Gen bekannt, die einen Morbus Fabry auslösen können (56). Wahrscheinlich spielt auch die Art der Mutationen, die einen Morbus Fabry verursachen können, eine Rolle bei der Ausprägung der Symptome. Missense- oder Nonsense-Mutationen mit einfachem

Basenaustausch sind die häufigsten Mutationen. Patienten mit Missensemutationen, bei denen eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit denselben chemischen Eigenschaften ersetzt ist, haben eine höhere α -Galaktosidase A Restaktivität als Patienten mit anderen Mutationen und daher oft einen günstigeren Krankheitsverlauf (9).

1.1.3 Therapie

Morbus Fabry ist bisher nicht heilbar. Heute ist die Therapie der Wahl eine Enzymersatztherapie, die seit 2001 in Deutschland zugelassen ist. Hierzu stehen zwei Enzympräparate für eine Infusionstherapie zur Verfügung: Agalsidase alfa und Agalsidase beta. Beide Präparate werden unterschiedlich hergestellt: Agalsidase alfa in humanen Fibroblasten und Agalsidase beta in CHO-Zellen des Hamsters (7). Beide Präparate werden in unterschiedlichen Dosierungen und mit verschiedener Infusionszeit alle 14 Tage i.v. verabreicht. Die Überlegenheit eines der beiden Präparate ist bisher nicht bewiesen. Die Enzymersatztherapie lindert die neuropathischen Schmerzen der Patienten und hat einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Krankheit, auch das Fortschreiten der Nierenbeteiligung wird verlangsamt oder in einigen Fällen sogar gestoppt (19, 20, 35, 36, 55). In der Cochrane Database wird die Evidenz der Therapie aufgrund der bisher vorliegenden Studien mit relativ kleinen Patientenzahlen jedoch noch als schwach eingeordnet (16).

Als Wirkprinzip der Enzymersatztherapie wird folgendes angenommen: Nach der Infusion des jeweiligen Präparats wird das Medikament durch Mannose-6-Phosphatrezeptoren und Sortilin in die Zellen aufgenommen und im Golgi-Apparat phosphoryliert (48,49). Durch diese Veränderung kann das Enzym anschließend über Mannose-6-Phosphat-, Mannose- und Asialoglykoprotein-Rezeptoren in die Lysosomen aufgenommen werden. Dort dissoziieren die Enzyme von ihrem Rezeptor und können Gb3 abbauen (18, 31, 38, 36, 54).

Eine Therapie muss lebenslang erfolgen und bedeutet eine Einschränkung der Lebensqualität für den Patienten. Zum einen muss die Infusion alle 2

Wochen durchgeführt werden, und die Patienten fahren dafür oft in ein Therapiezentrum. Es gibt deutschlandweit nur wenige Zentren, so dass weite Anfahrtswege in Kauf genommen werden müssen. Seit Kurzem gibt es zusätzlich die Möglichkeit, die Infusion durch fachkundiges Personal zu Hause durchführen zu lassen.

Zum anderen hat die Therapie viele Nebenwirkungen. Zu den häufigen Nebenwirkungen (mehr als einer von 100 Patienten) zählen allergische Reaktionen mit Hautrötung (selten Anaphylaxie), Tachykardie, Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen, Durchfall, Schwindel, Myalgie und weitere (7, 57). Es fehlen allerdings bisher Langzeitstudien zu den Auswirkungen einer Dauertherapie.

Ein weiteres Problem der Therapie ist die Antikörperbildung. Über 60% der Patienten entwickeln im Laufe der Therapie IgG-Antikörper, die das Ersatzenzym neutralisieren können. Die Antikörperentwicklung tritt unabhängig von der Art der genetischen Ursachen oder der Restaktivität der α -Galaktosidase auf. Auffällig ist, dass Patienten, die mit höheren Dosen behandelt wurden, häufiger Antikörper entwickeln (62). Langzeitstudien, die den Einfluss auf den Therapieverlauf in größeren Patientengruppen dokumentieren, liegen derzeit nicht vor.

Begleitend werden Patienten mit Morbus Fabry mit nierenprotektiven ACE-Hemmern oder AT1-Rezeptor-Antagonisten behandelt. Viele Patienten brauchen wegen der Begleitsymptomatik auch eine begleitende analgetische Therapie.

Bei einer terminalen Niereninsuffizienz ist neben der Dialyse auch eine Nierentransplantation möglich. Allerdings ist auf Grund des erhöhten kardiovaskulären Risikos eine strenge Indikationsstellung erforderlich (40, 45).

1.2 Die Niere und Podozyten

1.2.1 Die Niere

Die wichtigsten Aufgaben der Niere sind die Regulation des Volumen- und Elektrolythaushaltes sowie die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen. Die Niere besteht aus Funktionseinheiten, die Nephrone genannt werden. Jede Niere besteht aus 600.000 bis einer Millionen Nephrone. Ein Nephron besteht aus dem Glomerulum, einem Kapillarknäuel, und wird von der Bowmanschen Kapsel umgeben. An die Bowmansche Kapsel schließt sich das Tubulussystem an, bestehend aus dem proximalen Tubulus, der Henleschen Schleife, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr. Die Sammelrohre münden in das Nierenbecken.

In der Niere werden aus dem Blut, das durch das Glomerulum fließt, täglich ca. 180 Liter Primärharn filtriert und im Tubulussystem zum Großteil rückresorbiert, so dass am Ende circa 1,8 Liter Endharn pro Tag produziert werden. Die Filtration erfolgt über den glomerulären Filter, der aus drei Bestandteilen zusammengesetzt ist. Die glomeruläre Kapillare wird durch ein fenestriertes Endothel ausgekleidet, gefolgt von einer Basalmembran aus negativ geladenen Proteoglykanen und vernetzten Kollagenfibrillen. Auf dieser Basalmembran befinden sich spezialisierte Zellen, die Podozyten. Der glomeruläre Filter hält vor allem Proteine, die größer als 65kDa sind in der Kapillare zurück. Eine erhöhte Eiweißausscheidung im Urin (Proteinurie) ist daher ein Zeichen einer Nierenschädigung (51, 60).

des Aktin-Zytoskeletts und [4] Änderungen der apikalen Membrandomäne der Podozyten (5). Hauptsymptom einer irreversiblen Podozyten-schädigung ist eine Proteinurie, die zu einer terminalen Niereninsuffizienz führen kann. Ein nephrotisches Syndrom, das sich bei starken Podozytenschäden entwickeln kann, ist durch eine starke Proteinurie ($>3,5\text{g/d}$), eine Hypoproteinämie, Hypercholesterinämie und durch Ödeme gekennzeichnet. Morphologische Zeichen einer Podozytenschädigung sind Vakuolen- und Pseudozystenbildung, Fußfortsatzverschmelzung und Ablösung von der glomerulären Basalmembran (5, 39).

1.2.3 Pathologie der Niere bei Morbus Fabry

Die Niereninsuffizienz ist immer noch einer der schwerwiegendsten klinischen Schäden des Morbus Fabry. Die renale Pathologie der Erkrankung wurde erstmals in den 1950er Jahren beschrieben. Bei der Betrachtung von Glomeruli im Lichtmikroskop sind die hypertrophen aufgeblähten Podozyten mit Vakuolen, sowie mesangiale Aufweitungen und verschiedene Stadien der glomerulären Veränderung auffällig. Innerhalb des Glomerulus findet sich der größte Teil der Lipidablagerungen in Podozyten, gefolgt von parietalen Epithel-, Mesangial- und glomerulären Endothelzellen. Mit Fortschreiten der Krankheit kommt es zur Fußfortsatzverschmelzung und zu einer verstärkten Proteinurie. Des Weiteren können fokale glomeruläre und tubuläre Nekrosen sowie eine Verdickung der glomerulären und tubulären Basalmembran auftreten. Der Schaden ist jedoch nicht in allen Glomeruli oder allen Gebieten des Tubulointerstitiums gleich (3, 42).

Warum vor allem die Podozyten betroffen sind, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Eine mögliche Erklärung ist ein hoher Stoffwechsel der Podozyten, der auf Grund der Glukosesensibilität nahe liegt (29, 30).

1.3 Die Fabry-Maus – ein Krankheitsmodell

1997 veröffentlichten Oshima et al. ein α -Galaktosidase A-knockout Mausmodell, die sogenannte Fabry-Maus, bei der ein kompletter Verlust der α -Galaktosidase A Aktivität vorliegt (46).

In den darauffolgenden Jahren wurde dieses Mausmodell intensiv untersucht. Es ergaben sich wesentliche Unterschiede zwischen den pathophysiologischen Veränderungen im Mausmodell im Vergleich zur Erkrankung im Menschen. Zwar lagern die Mäuse Gb3 in verschiedenen Zellen des Körpers ein, aber es entsteht daraus nicht immer eine klinische Symptomatik. In der Niere der Fabry-Mäuse ist die Ablagerung von Gb3 nachweisbar, die Tiere entwickeln jedoch, anders als beim Menschen, keine Proteinurie. Glomerulosklerose und tubulointerstitielle Fibrose sind beim Menschen wichtige Marker für das Fortschreiten einer Fabry-Nephropathie, aber bei Fabry-Mäusen fehlen diese morphologischen Veränderungen. Der Befall von Gefäß- und Endothelzellen ist bei Mäusen und Menschen allerdings ähnlich ausgeprägt. Auch die Anzahl der betroffenen Podozyten stimmt in etwa überein. Allerdings sind die Gb3- Ablagerungen bei den Mäusen sehr viel geringer ausgeprägt als beim Menschen. Mesangialzellen sind bei den Mäusen kaum betroffen (61).

Daher postulieren Valbuena et al., dass sowohl Podozyten als auch Mesangialzellen eine noch unbekanntة Bedeutung in der Krankheitsentstehung der Nephropathie bei Morbus Fabry haben (61).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das vorhandene Morbus-Fabry-Mausmodell ist nicht geeignet, um die einzelnen molekularbiologischen Vorgänge der Nephropathie bei Morbus Fabry zu untersuchen. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher ein humanes Podozytenzellkulturmodell zu entwickeln, an dem die Auswirkungen einer reduzierten α -Galaktosidase A Aktivität charakterisiert werden können.

Daher wurde im ersten Teil der Arbeit ein Zellkulturmodell humaner Podozyten mit erniedrigter α -Galaktosidase A-Aktivität etabliert. Die α -Galaktosidase A-Aktivität der humanen Podozyten wurde per lentiviralem Gentransfer von short-hairpin-RNA-Konstrukten reduziert. Mittels qPCR, Luciferase-Assays und enzymatischen Messungen wurde die Effizienz einer Reduktion der α -Galaktosidase A-Aktivität überprüft.

Im zweiten der Teil der Arbeit wurden zwei verschiedene Trunkationen im C-terminalen Ende des α -Galaktosidase A-Gens kloniert und per lentiviralem Gentransfer in humane Podozyten transduziert. Zum einen wurde eine Trunkation gewählt, bei der es durch ein Stoppcodon an der Stelle 365 zu einem vollständigen Verlust der α -Galaktosidase A-Aktivität kommt (s. Abb. 2) (Miyamura, 1996). Das Konstrukt hat einen dominant negativen Effekt auf die α -Galaktosidase A-Aktivität (4).

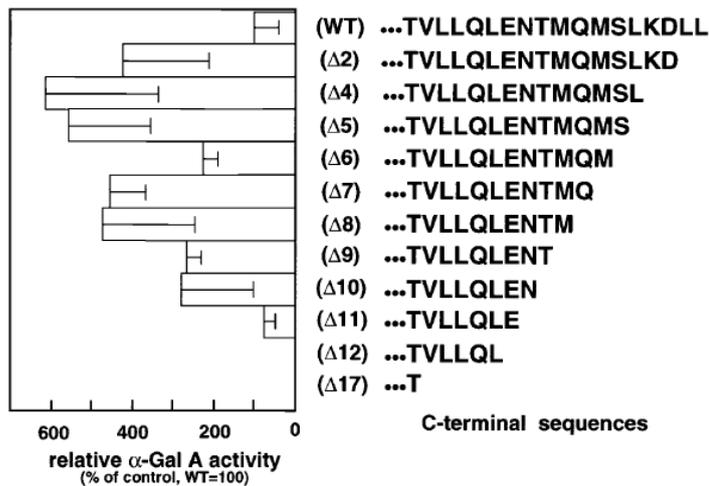


Abb. 2:

α -Galaktosidase A-Aktivität der abgebildeten Trunkationen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Δ 4 ist die in dieser Arbeit verwendete Trunkation Δ KDLL. Δ 17 ist die in dieser Arbeit verwendete Trunkation Y365X. Entnommen aus: Miyamura, 1996

Zum anderen wurde eine Trunkation gewählt, bei der im Vergleich zum Wildtyp die letzten vier Aminosäuren Lysin, Aspartat, Leucin und Leucin fehlen (Δ KDLL). Für diese Mutation wurde eine 6-fach erhöhte Aktivität im Vergleich zur Wildtyp α -Galaktosidase beschrieben (s. Abb. 2) (4).

Diese beiden Konstrukte wurden ausgewählt, um einerseits einen dominant-negativen Effekt auf die Eigenaktivität der α -Galaktosidase A in den verwendeten humanen Podozyten zu induzieren (Y365X), und um andererseits die α -Galaktosidase-Eigenaktivität der Podozyten zu erhöhen (Δ KDLL).

2. Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Händlerbezeichnung	Hersteller
Luminometer	Mithras LB 940	Berthold Technologies
Photometer	WPA biowave S2100	Biochrom
Spectrometer	PeqLAB Nanodrop 1000	PeqLab
Thermocycler	BioRad I Cycler IQ5	Bio-Rad

2.2 Chemikalien und Laborbedarf

Tabelle 2: Chemikalien und Laborbedarf

Bezeichnung	Hersteller
1 kb DNA Leiter	Peqlab
100 bp DNA Leiter	Peqlab
2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure (Zitronensäure)	Sigma
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
4-Methylumbelliferyl- α -D-galactopyranosid, MG 338	Sigma
4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranosid, MG 338,2	Sigma
6x Loading Dye Solution	Peqlab
Agarose	Peqlab
Ammoniumper(oxodi)sulfat (APS)	Merck
β -Methylumbelliferon MG 176,2	Sigma
BigDyeMix 3.1	Applied Biosystems, Warrington UK
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem; 10x: Biogen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Coumarinsäure	Sigma-Aldrich
Desoxyribonucleotidtriphosphat Mix (dNTP Mix; 10 mM)	Novagen
Dextrose	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithio-1,4-threitol (DTT)	Sigma-Aldrich

Ethanol	Roth
Ethidiumbromid 1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Promega
Glycin	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumchlorid (KCL)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Calciumchlorid	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Lipofectamin 2000	Invitrogen
L-Glutamin	GIBCO
Luminol	Fluka
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ , 25mM)	BioCat
Methanol	Roth
Normal Donkey Serum	Jackson
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
PolyScreen PVDF Transfer Membran	LifeScience
Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Warrington UK
Tetramethylethylenendiamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Roth
Wasserstoffperoxid 30%	Merck

2.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt. Die Puffer und Lösungen für molekular- und mikrobiologische Arbeiten sowie für die Zellkultur wurden steril filtriert oder bei 121°C autoklaviert. Die Lagerung erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonat-Lösung (HEPS) 2x	50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 12 mM Dextrose (pH7,09; steril filtriert), Gebrauchslösung: 4 °C, Lagerung: -20 °C
Acrylamid-Lösung	Rotiphorese Gel 40, Bisacrylamid (37, 5:1), Roth, 4 °C
α-Galactosidase Substratlösung	1,5mg 4-Methylumbelliferyl-α-D-galactopyranosid; 5ml PO ₄ -Citrat-Puffer bei 60°C gelöst; Lagerung bei 4°C
β-Galactosidase Substratlösung	3,11 mg 4-Methylumbelliferyl-β-D-galactopyranosid; 5ml PO ₄ -Citrat-Puffer bei 60°C gelöst; Lagerung bei 4°C
Calciumchloridlösung	0.25M
Glycin-NaOH-Puffer (1 M, pH 10,5)	a) NaOH, MG 40; 1M=40g/1000ml destilliertem Wasser b) Glycin, MG 75; 1M = 75g/1000ml destilliertem Wasser 50ml b) in ein Becherglas geben und mit ca. 50ml a) auf pH 10,5 titrieren
KOD-Reaction Buffer 10x	Novagen
Lämmli-Stammlösung	125 mM Tris 1M pH 6,8; 20 g SDS; 100ml Glycerol; 5mg Bromphenol Blau; 270 ml H ₂ O
Lämmli-Gebrauchslösung 1x	500 ml Stammlösung; 500 ml H ₂ O; 50 mmol DTT
Lämmli-Gebrauchslösung 2x	900 ml Stammlösung; 100 mmol DTT
PAA-Sammelgel-Puffer	500 mM Tris/HCL; 0,4 % (w/v) SDS
PAA-Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % (w/v) SDS
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,25 mM

	Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Phosphat-Citrat-Puffer (0,06 M, pH 4,7)	a) Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, MG178; 0,06M=1,068g in 100ml destilliertem Wasser b) Zitronensäure, MG 210; 0,03M = 0,63g in 100ml destilliertem Wasser Pufferlösung: 60ml a) in ein Becherglas geben und mit 40-60ml b) auf pH 4,7 titrieren; 0,02% Na-Azid hinzufügen (20mg/100ml); Lagerung bei 4 °C
PMSF	10 mg/ml in 100 % EtOH, -20 °C
Protein-Laufpuffer	192 mM Glycin, 1,0 % (w/v) SDS, 25 mM Tris pH 8,3
Protein-Waschpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 0,1% Tween 20
RNAse Wasser	10 mg/ml RNAse in H ₂ O, Lagerung bei 4 °C
STET-Lösung 1	40 g Sucrose; 5 ml TritonX-100; 50 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; 25 ml 1 M Tris pH 8,0; 380 ml H ₂ O
STET-Lösung 2	10 mg/ml Lysozym in STET-Lösung 1, -20 °C
T4-Ligation Buffer 1x	New England Biolabs
TAE-Puffer Gebrauchslösung	80 ml TAE-Puffer Stammlösung, 200 µl Ethidiumbromid-Lösung 1 % mit H ₂ O auf 3,6 Liter auffüllen
TAE-Puffer Stammlösung	121 g Trizma Base, 28,5 ml Eisessig, 18,6 g Na ₂ EDTA 2xH ₂ O; mit H ₂ O auf 1 Liter auffüllen
TE Buffer pH8,0	Invitrogen
Transfer-Puffer	25 mM Tris pH 8,3; 0,1 % SDS; 192 mM Glycin; 20 % Methanol, 4 °C

2.3.1 Enhanced chemiluminescence (ECL)

Die für die Peroxidasereaktion der verstärkten Chemilumineszenz (ECL, enhanced chemiluminescence) benötigten Lösungen wurden selbst hergestellt. Die Pipettier Volumina sowie finalen Konzentrationen der Einzelkomponenten können Tabelle 4 entnommen werden. Die Lösungen A und B sind 2 Tage bei 4 °C stabil. Die Lagerung des lichtempfindlichen Luminols sowie der Coumarinsäure erfolgte bei -20 °C. Zum Herstellen der Gebrauchslösung wurden die beiden Lösungen A und B im Verhältnis 1:1

vermischt. Für das Befeuchten einer PVDF-Membran ist ein Volumen von ca. 2 ml der ECL-Gebrauchslösung ausreichend.

Tabelle 4: ECL

Komponenten	Pipettiervolumen Lösung A	Pipettiervolumen Lösung B	Finale Konzentration in der Gebrauchslösung
H ₂ O	17,7 ml	18 ml	
1M Tris/HCl pH 8.5	2 ml	2 ml	100 mM
30 % H ₂ O ₂		12 µl	1,5 %
Luminol	200 µl	-	2,5 mM
Coumarinsäure	88 µl	-	0,4 mM

2.3.2 Gele für Gelelektrophorese

Tabelle 5: Gel für die Agarosegelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
1% Agarose-TAE-Gel	1% (w/v) Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgekocht

Tabelle 6: Gele für die SDS-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Zusammensetzung
Sammelgel (5%)	5% Polyacrylamid; 125 mM Tris pH 6,8 0,1 % SDS; 0,05% APS; 0,1% TEMED
Trenngel (10%)	10% Polyacrylamid; 375 mM Tris pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,05% APS; 0,05% TEMED

2.4 Medien

Alle aufgeführten Medien wurden, soweit nicht anders vermerkt, autoklaviert bzw. steril filtriert. Eine Lagerung der Medien sowie Agarplatten erfolgte bei 4 °C.

2.4.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

2.4.1.1 LB-Medium und Agarplatten

Zur Herstellung einer Flüssigkultur von Bakterien in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, s. Tabelle7) wurden 20g LB-Medium-Trockensubstanz in einem Liter H₂O gelöst. Als Selektionsantibiotikum wurde für die hier verwendeten Plasmide entweder 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. LB-Agarplatten wurden unter Verwendung von 20 g/l Agar analog zum LB-Medium hergestellt und je nach Plasmid zur Selektion entweder mit 100 µg/ml Ampicillin oder mit 100 µg/ml Kanamycin versetzt.

2.4.1.2 SOC-Medium

Das Soc-Medium wurde in der Zusammensetzung nach Tabelle 7 hergestellt und aliquotiert bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Medien zur Kultivierung von Bakterien

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
LB-Medium	Roth
SOC-Medium	640 ml ddH ₂ O, 20g Bacto Tryptone, 5 g Bacto Yeast Extract, 86 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose, pH=7

2.4.2 Medien zur Kultivierung von eukaryoten Zellen

Tabelle 8: Medien zur Kultivierung von eukaryoten Zellen

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
HEK 293T Zellkulturmedium	DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium) (BioWhittaker) supplementiert mit 4,5 g/l Glucose, 2,5 mM L-Glutamine sowie 10% FBS
Moin AB8/13 Zellkulturmedium	RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) (Gibco) supplementiert mit 10% FBS und 5ml ITS
FBS (fetales bovines Serumalbumin)	BioChrom AG
ITS (Insulin, Transferin, Selenium)	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA ohne Mg und Ca	Invitrogen

2.5 Enzyme

Alle aufgeführten Enzyme wurden bei -20°C gelagert.

Tabelle 9: Enzyme

Enzym	Hersteller
KOD Hot Start Polymerase	Novagen
LR-Clonase	Invitrogen
Lysozym	Roth
Proteinase K	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen (mlu, not, EcoRV, Xho, Afl II)	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Fermentas
RNAse	Fermentas

2.6 Verbrauchsmaterialien und Kits

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA (=bicinchoninic acid) Protein Assay KIT nach Pierce	ThermoScientific
Blottingpapier	Whatman
Dual Luciferase Assay Kit	Promega
ECL-Filme	FUJIFILM Super RX
GeneJet PCR-Purification-Kit	Fermentas
GeneJet Gel Extraction Kit	Fermentas
PlasmidMegaPrep Kit	Qiagen
PlasmidMidiPrep Kit	Qiagen
Qiashredder	Qiagen
Petrischalen für die Mikrobiologie	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt, Sorensen
Plastikschalen für die Zellkultur	Corning
QuantiTect SYBR Green RT PCR Kit	Qiagen
Reaktionsgefäße	Eppendorf
RNEasy Kit	Qiagen
Sterilfilter	Millipore
Superskript III Kit	Invitrogen
Zentrifugenröhrchen	BD Falcon

2.7 Antikörper für Westernblot

Tabelle 11: Primärantikörper

Antikörper	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Hersteller
FLAG	monoklonal	Maus	1:10.000	Sigma-Aldrich
V5	monoklonal	Maus	1:5000	Serotec
α -Galaktosidase A	polyklonal	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
α -Galaktosidase A	polyklonal	Huhn	1:500	Abcam
Podocin	polyklonal	Kaninchen	1:5000	Sigma-Aldrich

Tabelle 12: Sekundärantikörper

Antikörper	Markierung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Maus-Fc	HRP	Ziege	1:15.000	Dako
Anti-Kaninchen-Fc	HRP	Esel	1:10.000	Biochrom
Anti-Huhn	HRP	Ziege	1:10.000	Dako

2.8 Plasmide und Vektoren

Tabelle 13: Plasmide und Vektoren

Name	Vektor	Insert	Tag	Referenz
F9.h-alpha-Gal A WT FL	pcDNA6	Humane α -Galaktosidase A fulllength	F9	Nephrologisches Forschungslabor
F9.hEPS15L1 [1-225]	pcDNA6	Humanes EPS ¹⁻¹²⁵	F9	Nephrologisches Forschungslabor
V5.mirneg	pLenti6.2	Mirneg	V5	Nephrologisches Forschungslabor
alphaGal-hp2	pLenti 6.2	shRNA 459	V5	Nephrologisches Forschungslabor
alphaGal-hp4	pLenti 6.2	shRNA 894	V5	Nephrologisches Forschungslabor
Hp2-GFP	pcDNA6	shRNA 459 und eGFP	-	Nephrologisches Forschungslabor
Hp4-GFP	pcDNA6	shRNA 894 und eGFP	-	Nephrologisches Forschungslabor
V5.GFP	pcDNA6	eGFP	V5	Nephrologisches Forschungslabor

	pcDNA6			Invitrogen
	pEntr1aBe (pEntr1 Vektor von Invitrogen mit zusätzlichen mlu/not Schnittstellen)			Nephrologisches Forschungslabor
pLenti6.2.V5dest	pLenti6.2	emGFP	V5	Invitrogen
pLenti6.3.V5dest	pLenti6.3	emGFP	V5	Invitrogen
pLenti6.2em GFP	pLenti6.2	emGFP		Invitrogen
pLenti6.3emGFP	pLenti6.3	emGFP		Invitrogen
	psycheck2			Promega

2.9 Oligonukleotide

2.9.1 Primer

Alle aufgeführten Primer wurden von Biomers hergestellt. Folgende PCR-Primer wurden in den Versuchen verwendet:

Tabelle 14: Übersicht der PCR-Primer

Gen	Name	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
Humane α -Galaktosidase A	H alpha Gal a Mlu 1 fp	cgc ggg acg cgt ATG CAG CTG AGG AAC CCA GAA C	Fullgen Forwardprimer mit mlu-Schnittstelle
Humane α -Galaktosidase A	H alpha Gal a mlu kozak 1 fp	cgc ggg acg cgt gcc acc atg cag ctg agg aac cca gaa c	Fullgen Forwardprimer mit mlu-Schnittstelle und Kozak- Sequenz
Humane α -Galaktosidase A	H alpha Ga 429* not rp	cgc ggg gcg gcc gcc TTA AAG TAA GTC TTT TAA TGA C	Fullgen Reverseprimer mit not-Schnittstelle
Humane α -Galaktosidase A	H alpha Gal a not 365 rp	cgc ggg gcg gcc gcc aga gcg agg tcc acc aat	Reverseprimer für eine Trunkation mit einem Stoppcodon an Position 365
Humane α -Galaktosidase A	H alpha Gal 425 rp	cgc ggg gcg gcc gcc taa tga cat ctg tgt	Reverseprimer für eine Trunkation bei der die letzten 4 Aminosäuren (KDLL) fehlen
	pLenti6_2miRfp		Forwardprimer zum Einfügen der miRNA mirneg in den Vektor pLenti6.2
	Rsp pLenti6_2 miR	ccg gta ggt acc atc gtc at	Reverseprimer zum Einfügen der miRNA mirneg in den Vektor pLenti6.2

2.9.2 shRNA

Verschiedene shRNAs mit Hairpinstruktur wurden in den Versuchen getestet. Eine Übersicht gibt Tabelle 15.

Tabelle 15: Übersicht der Positionen der getesteten Hairpins in der Sequenz der humanen α -Galaktosidase

Hairpin	Position in der Sequenz von α -Galaktosidase
shRNA 361	bp 361-368
shRNA 459	bp 459-466
shRNA 726	bp 726-733
shRNA 894	bp 894-901
shRNA 1185	bp 1185-1192
shRNA 1227	bp 1227-1235

Die Sequenzen der beiden effektivsten und in den Folgeversuchen weiterverwendeten shRNAs sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten shRNAs

Zielgen	Name	Top-Sequenz der shRNA	Bottom Sequenz der shRNA
Humane α -Galaktosidase A	shRNA 459	TGCTGATAATTAGCTA GCTGGCGAATGTTTT GGCCACTGACTGACA TTCGCCATAGCTAATT AT	CCTGATAATTAGCTATGG CGAATGTCAGTCAGTGGC CAAACATTGCGCCAGCTA GCTAATTATC
Humane α -Galaktosidase A	shRNA894	TGCTGTAACATATCTG GGTCATTCCAGTTTTG GCCACTGACTGACTG GAATGACAGATATGTT A	CCTGTAACATATCTGTCA TTCCAGTCAGTCAGTGGC CAAACACTGGAATGACCCA GATATGTTAC

2.10 Bakterien

Tabelle 17: Bakterien

Stamm	Genotyp	Referenz
DH10 B	T1 F- endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ (mrrhsdRMS-mcrBC) λ-	Invitrogen
Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, modifiziert durch nephrologisches Forschungslabor

2.11 Eukaryote Zellen

Tabelle 18: Eukaryote Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
HEK 293T	Humane embryonale Nierenepithelzellen (<i>human embryonic kidney</i>) Kultivierung: 37 °C	Prof. Dr. B. Seed (Harvard Medical School, Boston, USA)
Humane Podozyten AB 8/13	immortalisierte humane Podozyten mit einem temperatursensitiven SV40-T Gen und einem Telomerasegen. Die Zellen wachsen bei 33°C und wechseln bei 37°C in eine nicht-proliferative Phase, in der sie Marker differenzierter in vivo Podozyten exprimieren. (Moin Saleem, 2007)	Prof. Dr. Moin Saleem (Childrens' Hospital, Bristol, UK)

3. Methoden

3.1 Klonierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte für eukaryotische Überexpression wurden mit Standardmethoden, basierend auf Restriktionsenzym-Verdau (s. 3.4) und T4-Ligation (s. 3.5) in den Expressionsvektor pcDNA6 oder mit dem Zwischenschritt einer LR-Rekombination (s. 3.6) in pLenti 6.2- und pLenti 6.3-Expressionsvektoren gebracht. Die pcDNA6-Konstrukte wurden im Luciferase-Assay und in der transienten Transfektion von HEK293T-Zellen verwendet, die pLenti-Konstrukte in der Transduktion der Podozyten. Die Hairpin-Konstrukte und die Patientenmutationen Δ KDLL und Y365X wurden aus dem pcDNA6-Konstrukt F9.h- α -GalA-fl-pcDNA6 durch Polymerasekettenreaktion (s. 3.2) kloniert. Das in der Arbeit verwendete α -Galaktosidase A-Konstrukt wurde aus einer humanen Podozyten-Library kloniert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Restriktionsenzymen verdaut und durch eine Ligrationsreaktion entweder direkt in pcDNA6 oder durch Gateway-Cloning in einen der pLenti-Vektoren gebracht. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung (s. 3.9) verifiziert. Zur Amplifikation der Konstrukte wurde das Plasmid MegaPrep Kit verwendet. Die entsprechenden Plasmide wurden in 1L- Kulturen des E. coli Stamms DH10 B-T1 phage resistant cells (Invitrogen) amplifiziert, die mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden waren.

3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Als Vorlage können sowohl einzelne Plasmide als auch komplette cDNA-Libraries verwendet werden. Der Prozess besteht aus ca. 20-40 Zyklen, in denen jeweils drei Schritte mit verschiedenen Temperaturstufen durchlaufen werden: Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation der DNA. Im ersten Schritt werden die beiden DNA-Einzelstränge bei einer Temperatur von 95°C durch Aufbrechen der

Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. Im folgenden Schritt wird die Temperatur gesenkt, und die Bindung der Primer an die DNA kann stattfinden. Im nun folgenden Elongationsschritt füllt das Enzym DNA-Polymerase, beginnend am 3' Ende, die fehlenden Stränge mit freien Nukleosidtriphosphaten auf. So entstehen neue Doppelstränge und der Zyklus beginnt erneut.

In dieser Arbeit wurde die KOD-DNA-Polymerase verwendet. Es wurde nach dem Protokoll in Tabelle 19 gearbeitet.

Tabelle 19: Protokoll für einen Versuchsansatz mit KOD-Polymerase

	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen in der Reaktion [μ l]
KOD Puffer	10 x	1 x	5
DMSO	100%	5%	2,5
Forward Primer	10 μ M	50 μ M	0,5
Reverse Primer	10 μ M	50 μ M	0,5
dNTPs	10 mM	10 μ M	5
Mg ²⁺	25 mM	2,25 mM	4,5
KOD Polymerase	5 U/ μ l	1 U/ μ l	1

Zum Ansatz wurden 100 ng F9.h- α -GalA-fl-pcDNA6 hinzugefügt und das Reaktionsvolumen mit ddH₂O auf 50 μ l aufgefüllt. Danach wurden die Proben im Thermocycler inkubiert. Das verwendete Programm ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Standardprogramm für den Thermocycler

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	02:00 min	Vollständige Denaturierung
2	95°C	00:20 min	Denaturierung
3	55°C (abh. von Primer)	00:15 min	Primerhybridisierung
4	72°C	00:20 min	Elongation
5			30mal Schritt 2-4
6	72°C	10:00 min	Finale Elongation
7	10°C		Aufbewahrungstemperatur bis Probenentnahme

3.3 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe und Quantität des PCR-Produkts zu überprüfen, wurden 5 µl der Reaktion sowie ein Größenstandard (DNA-Leiter) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Da der verwendete Puffer Ethidiumbromid enthält, welches mit der DNA interkaliert und daher unter Anregung mit UV-Licht fluoresziert, konnten die DNA Banden anschließend unter der UV-Lampe sichtbar gemacht werden.

3.4 Enzymatischer Verdau

War das PCR-Ergebnis zufriedenstellend, wurde die übrige Reaktion zunächst mit einem PCR-Aufreinigungs-Kit nach Herstelleranleitung aufgereinigt. Um das PCR-Produkt anschließend in den Zielvektor einfügen zu können, müssen die Enden des PCR-Produkts und Zielvektors zueinander kongruent sein. Mit Hilfe der Primer wurden bei der Amplifikation der DNA an den Enden Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingefügt, die auch der Zielvektor besitzt. Standardmäßig wurden die Restriktionsenzyme mlu1 (forward Primer) und not1 (reverse Primer) verwendet, wie in Tabelle 21 beschrieben.

Tabelle 21: Ansatz für den enzymatischen Verdau des PCR Produkts mit den Restriktionsenzymen mlu und not

Substanz	Pipettiervolumen
PCR Produkt	45 µl
10x Puffer	5,0 µl
BSA	0,5 µl
Mlu-Restriktionsenzym	0,5 µl
Not-Restriktionsenzym	0,5 µl

Zeitgleich wurde 1 µg Vektor-DNA auf gleiche Weise verdaut und der Ansatz mit ddH₂O auf ein Reaktionsvolumen von 30 µl aufgefüllt. Beide Ansätze inkubierten für zwei Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (1% Agarose) aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits auf gereinigt.

Die pLenti-Vektoren besitzen andere Schnittstellen. Daher wurden pLenti-Konstrukte in zwei nacheinander folgenden Reaktionsansätzen doppelt verdaut. Diese sind in Tabelle 22 und 23 aufgeführt.

Tabelle 22: Reaktionsansatz 1: Verdau von pLenti-Konstrukten mit dem Restriktionsenzym EcoR V

Substanz	Pipettiervolumen
10x Puffer	1,5µl
EcoR V	0,5µl
BSA (1:10)	1,5 µl
DNA	5 µg
ddH ₂ O	Reaktionsansatz auf 30 µl auffüllen

Tabelle 23: Reaktionsansatz 2: Verdau von pLenti-Konstrukten mit den Restriktionsenzymen Xho und Afl II

Substanz	Pipettiervolumen
10x Puffer	1,5µl
Xho	0,4µl
Afl II	0,4µl
BSA (1:10)	1,5 µl
DNA	5 µg
ddH2O	Reaktionsansatz auf 30 µl auffüllen

Beide Reaktionsansätze wurden 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (1% Agarose) aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und mit Hilfe eines Gel-Extraktions-Kits aufgereinigt.

3.5 Ligation von cDNA-Abschnitten in Zielvektoren

Während der Ligationsreaktion werden durch passende Restriktionsenzyme zuvor geschnittene DNA-Fragmente des Inserts und des Vektors miteinander verbunden. Die Pipettiervolumina können Tabelle 24 entnommen werden.

Tabelle 24: Ligationsreaktion

Substanz	Pipettiervolumen
ddH ₂ O	35 µl
T4-Ligase	0,8 µl
Ligationspuffer	5 µl
Vektor	1 µl

21 µl der Ligationsreaktion wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und 4 µl der einzufügenden DNA hinzugegeben. Die Probe, die allein den Vektor enthält, dient später als Kontrolle. Nach ein bis zwei Stunden Inkubationszeit folgte die Transformation der DNA in DH10 Bakterien (s.3.7).

3.6 LR-Rekombination: Gateway Cloning

Bei der LR-Rekombination werden die amplifizierten DNA-Abschnitte zunächst in einen Entry-Vektor ligiert (Ligationsverfahren s. 3.5) und dann in DH10 Bakterien transformiert (s.3.7). Anschließend werden die DNA-Abschnitte mittels der LR-clonase in den Zielvektor gebracht. Das Verfahren des Gatewayclonings wurde gewählt, da die Erfolgsrate hier höher ist als beim direkten Einbringen der cDNA-Abschnitte in den pLenti-Vektor.

Es wurde folgendes Protokoll verwendet: In einem Reaktionsansatz wurden 200 ng der Hairpin-Konstrukte bzw. Patientenmutationen im Entry-Vektor und 150 ng pLenti 6.2- oder 6.3-Vektor gemischt. Die Proben wurden auf 9 µl mit TE Puffer aufgefüllt. Danach wurde jeder Ansatz geteilt in zwei Ansätze à 4 µl. Einem Ansatz wurde 1 µl LR-Clonase zugefügt, dem anderen als Kontrolle 1 µl destilliertes Wasser. Die Mischung wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 µl ProteinaseK zum Stoppen der Reaktion zugefügt. Es folgten 10 min Inkubation bei 37 °C. Je 2 µl Reaktionsansatz wurden in 50 µl Top10-Bakterien transformiert.

3.7 Transformation chemokompetenter E.coli Bakterien

Die bei -80 °C gelagerten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Zwei bis fünf µl jeder Vektorprobe wurde zu je 50 µl Bakteriensuspension (E.coli, DH10 oder TOP10) hinzugefügt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der nun folgende Hitzeschock führt zur Aufnahme der DNA in die Zellen (45 Sekunden, 42 °C). Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis und Zugabe von 300 µl SOC Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C (DH10) bzw. 30 °C (TOP10) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 75 µl jeder Probe auf je eine Seite einer vorgewärmten, antibiotikahaltigen Agarplatte (100 mg/ml) ausgestrichen. Ampicillin wurde für die pcDNA6- und pLenti-Konstrukte verwendet und Kanamycin für die pENTR-Konstrukte. Es folgte eine Inkubation über Nacht für mindestens 8 Stunden bei 37 °C (DH10) beziehungsweise 36 Stunden bei 30 °C (TOP10).

Der vollständige Vektor, in welchem das gewünschte DNA Stück korrekt integriert ist, verleiht den Bakterien eine Antibiotikaresistenz. Auf der Kontrollseite, auf der die Bakterien nur mit geschnittenem Vektor transformiert wurden, sollten keine Kolonien zu sehen sein. Auf der Ligationseite haben die Bakterien durch Aufnahme des vollständigen Vektors eine Resistenz erworben, so dass zahlreiche Kolonien gewachsen sein sollten.

Hatte eine effiziente Ligation stattgefunden, das heißt es waren kaum Kulturen auf der Kontrollseite und viele Kulturen auf der Ligationseite gewachsen, wurden von der Ligationseite 2 bis 6 Kolonien entnommen. Die Kolonien der DH10-Bakterien die mit pcDNA6-Konstrukten transformiert worden waren, wurden einzeln in 3 ml LB-Medium + Ampicillin überführt und über Nacht für mindestens 8 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Kolonien der DH10-Bakterien die mit pENTR-Konstrukten transformiert worden waren, wurden einzeln in 3 ml LB-Medium + Kanamycin überführt und über Nacht für mindestens 8 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Die Kolonien der TOP10-Bakterien, die mit pLenti-Konstrukten transformiert worden waren, wurden einzeln in 3 ml LB-Medium + Carbenicillin überführt und 36 Stunden bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Carbenicillin wurde verwendet, da es bei einer Wachstumszeit von 36 Stunden stabiler ist als Ampicillin. Anschließend wurde eine Mini-DNA-Präparation durchgeführt.

3.8 DNA-Präparationen

Die DNA-Präparation dient der Extraktion der Plasmid-DNA aus zuvor transformierten Bakterien.

3.8.1 Mini-Präparation

Nachdem eine 3 ml Kultur einige Stunden gewachsen war, wurde die Extraktion der DNA nach dem STET-Prep Protokoll durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 ml der Kultur in einem Eppendorfgefäß zentrifugiert. Die Bakterien setzen sich als Pellet am Boden des Gefäßes ab. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 300 µl STET1-Lösung resuspendiert. Im nächsten

Schritt wurden die Bakterien durch Zugabe von 25 µl STET2-Lösung und anschließendes Kochen lysiert. Zelldetritus wurde in einem nun folgenden Zentrifugationsschritt entfernt, die im Überstand enthaltene DNA durch Zugabe von 300 µl Isopropanol gefällt und erneut zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und dann in 100 µl RNase-Wasser resuspendiert. Um die Richtigkeit des in den Bakterien produzierten Plasmids zu überprüfen, wurde ein Verdau mit Restriktionsenzymen durchgeführt.

3.8.2 Midi- und Maxipräparation

Um größere Mengen DNA zu präparieren, wurde aus dem Rest der Minipräparationskultur je nach Bedarf eine Midi- oder Megakultur angesetzt. Für Midipräparationen wurden 100 ml Bakterienkulturen über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert, für Megapräparationen wurden 1000 ml Bakterienkulturen angesetzt. Die Präparation erfolgte mit Hilfe eines Kits (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers. Nach Pelletierung der Bakterien wurden diese in 4 ml (Midi)/ 50 ml (Mega) Puffer P1 resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte durch Zugabe von natronlaugehaltigem Puffer P2 die Lyse der Bakterien. Anschließend wurde die Suspension durch Zugabe von Puffer P3 neutralisiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nun wurde der Zelldetritus abzentrifugiert und der Überstand auf zuvor equilibrierte Filtersäulen gegeben. Die Filter banden die DNA, die Flüssigkeit tropfte ab. Nach einem Waschschrift mit Waschpuffer wurde nun, um die DNA vom Filter zu lösen, 5 ml (Midi) / 30 ml (Mega) Elutionspuffer auf die Säule gegeben und der Durchlauf in einem Falcongefäß aufgefangen. Nach Fällung der DNA mit Isopropanol wurde diese abzentrifugiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und je nach Pelletgröße in 0,1-1 ml ddH₂O resuspendiert. Zur Kontrolle des Ergebnisses erfolgte nun wieder ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen.

3.9 Sequenzierung von DNA

Um Fehler wie Punktmutationen Fehler in der Basenabfolge der klonierten DNA zu erkennen, wurde eine Sequenzierung aller Konstrukte durchgeführt. Es wurde ein Sequenzierungsverfahren durchgeführt, dass auf der von Frederick Sanger 1977 beschriebenen Didesoxynukleotid-Terminationsmethode basiert. Die Sequenzierung wurde im Institut für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt. Die Proben wurden folgendermaßen vorbereitet: 500 ng DNA wurden auf 20 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Dem wurden 2 µl Sequenzierungspuffer, 0,5 µl Big Dye Mix und 2 µl Reverseprimer zugefügt. Es wurde eine PCR nach dem Protokoll in Tabelle 25 durchgeführt.

Tabelle 25: Thermocyclerprotokoll für DNA-Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Dauer
1	96 °C	01:00 min
2	96 °C	00:10 min
3	50°C	00:05 min
4	60°C	04:00 min
5		25mal Schritt 2-4
6	4°C	bis Ende

Anschließend wurden die Proben zur weiteren Analyse in das Institut für Genetik gebracht. Dort erfolgten alle weiteren Schritte. Die Ergebnisse konnten am Computer mit den Programmen Edit Seq und Map Draw von DNA-Star und Chromas von Technelysium analysiert werden.

diesem Fall den humanen Podozyten, zunächst als lange, doppelsträngige RNA (dsRNA) vor. Durch das endogene dsRNA spezifische RNA spaltenden Enzym Dicer wird diese dsRNA zu doppelsträngiger small interfering RNA (siRNA), auch short-hairpin RNA (shRNA) geschnitten, die eine Länge von etwa 21 Nukleotiden hat. Die durch Dicer entstandene shRNA besteht aus zwei Nukleotidsträngen, die jeweils eine 5'Phosphat- und eine 3'Hydroxylgruppe besitzen. Sie sind so gepaart, dass an jedem Strang zwei Nukleotide am 3'Ende überhängen. Der eine der beiden Stränge ist komplementär zur Ziel-mRNA und ist später für den knockdown verantwortlich, der andere Strang wird im Verlauf abgebaut. Der Enzymkomplex RISC (RNA induced silencing complex) vermittelt den Kontakt zwischen der shRNA und der Ziel-mRNA. RISC besteht aus einem Argonautenenzym, der doppelsträngigen shRNA und Hilfsproteinen. Zunächst wird der nicht komplementäre Strang der shRNA abgebaut. Dann wird die Ziel-mRNA an RISC angelagert. Die Interferenz-shRNA mit der Ziel-mRNA führt zur Degeneration dieser mRNA (25). Abbildung 4 stellt die Prozessierung der dsRNA bis zur mRNA-Degeneration dar.

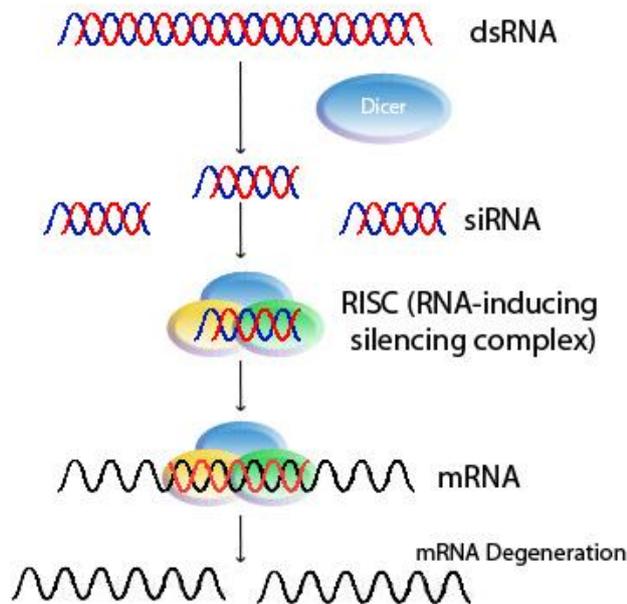


Abb. 4: RNA-Interferenz durch siRNA: dsRNA wird durch Dicer zu siRNA geschnitten. Die siRNA bindet an den Enzymkomplex RISC und der nicht zur Ziel-mRNA komplementäre Strang der siRNA wird abgebaut. Dann wird die Ziel-mRNA auf den Enzymkomplex RISC geladen. Durch Interferenz mit der siRNA kommt es zur Degeneration der mRNA. (In Anlehnung an eine Abbildung in „RNA interference - an comprehensive overview“ von Hooper C. erschienen auf Abcam.com)

Zur Regulierung der α -Galaktosidase A-Aktivität wurden zunächst 6 verschiedene, ca. 20 Basenpaare lange siRNAs erstellt. Das Design erfolgte mit einem Algorithmus und der online Software Block-it miR RNAi von Invitrogen (www.invitrogen.com) Die Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Biomers hergestellt. Alle short-hairpin-Konstrukte enthalten eine GFP Sequenz. GFP ist ein grün fluoreszierendes Protein, das unter UV-Licht nachgewiesen werden kann.

Diese wurden in den Vektor pcDNA6 und pLenti 6.2 kloniert. Alle Schritte wurden durch enzymatischen Verdau kontrolliert. Im Folgenden wurde mittels Luciferase-Assay die Effektivität gemessen und die beiden effizientesten short-hairpin Konstrukte, shRNA 459 und shRNA 894, ausgewählt. Diese wurden zur Herstellung der Zelllinien verwendet.

3.10.2 Herstellung von Lentiviren und Transduktion der Zielzellen

Zur Generierung von Lentiviren, deren Genom die gewünschte short-hairpin RNA-Sequenz enthalten sollte, wurden die entsprechenden short-hairpin RNA-Sequenzen in den Vektor pLenti6.2 kloniert.

Zur Produktion der Lentiviren wurden HEK-293T-Zellen mit den nötigen Hilfsplasmiden mit Hilfe der Calciumphosphatmethode transfiziert. Dabei wurden je Kondition 500 µl CaCl₂ mit ca. 5µl DNA versetzt. Unter vortexen wurden tröpfchenweise 500 µl HEPS-Puffer zugefügt. Es entstanden Calciumphosphat-Komplexe, die die DNA banden. Dieses Gemisch wurde nun direkt auf eine Zellschale mit Medium verteilt. Um die Effizienz zu überprüfen wurde eine Kondition als Kontrolle nur mit einem GFP-Konstrukt transfiziert.

Nach drei Tagen, in denen die Zellen Viren sezernierten, wurde das infektiöse Medium abgenommen, zentrifugiert und steril filtriert (0,45 µm Spritzenfilter). Das Virus enthaltende Medium wurde im Weiteren zur Transduktion von humanen Podozyten benutzt.

Bei der Transduktion von Zellen mit Lentivirus ist es wichtig, mit sich teilenden Zellen zu arbeiten. Das Lentivirus kann nur während der Teilung in das zelluläre Genom integriert werden. Danach wird die eingeführte genetische Information vom zellulären Transkriptionsapparat exprimiert. Daher wurden humane Podozyten die bei 33 °C inkubiert wurden verwendet. Zunächst wurden diese Zellen sehr dünn in 6-well Platten gesplittet. Zur Transduktion wurde am folgenden Tag früh das Nährmedium gegen Virus enthaltendes Medium ausgetauscht. Zur besseren Anlagerung der Viren an die Zellmembran wurde dem virushaltigen Medium Polybrene zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurde das Virusmedium wieder abgenommen und durch das regulär für humane Podozyten verwendete Medium ersetzt. Diese Prozedur wurde je nach Qualität des Virus 2-3 Mal alle 12-24 h wiederholt. Nach 2-3 Tagen wurden die Zellen auf Fluoreszenz untersucht. War die Transduktion erfolgreich, exprimierten die Zellen GFP und fluoreszierten grün. Die humanen Podozyten wurden für weitere Experimente bei 37 °C inkubiert, um ausdifferenzierte Podozyten zu erhalten.

3.11 SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot (Western-Blot)

Ziel der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist es, Proteine größenabhängig zu trennen und durch einen Western Blot dauerhaft auf einer Membran zu fixieren. Durch spezifische Antikörpernachweisreaktionen können einzelne Proteine sichtbar gemacht werden. Mit der Analyse im Western-Blot können Größe und relative Menge der aufgetragenen Proteine bestimmt werden.

Die Zellen wurden mit 1x PBS drei Mal gewaschen und dann mit einem Zellscraper gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die Proben wurden 5min bei 5000 rpm in einer 4 °C kalten Zentrifuge pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 40 µl 2x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Das darin enthaltene Reduktionsmittel DTT spaltet vorhandene Disulfidbrücken, wodurch Proteinkomplexe getrennt und Proteine aufgefaltet werden. Durch das Detergenz SDS werden die Proteine nicht nur solubilisiert, sondern sie erhalten auch eine stark negative Gesamtladung, weshalb ihre elektrophoretische Beweglichkeit ausschließlich von ihrer Größe abhängt.

Nachdem die Proben in die Taschen des Polyacrylamidgels (Acrylamid polymerisiert durch TEMED und APS) geladen wurden, wanderten die Proteine zunächst im Sammelgel (5%) bei 70 V für 30 min gemeinsam in Richtung Anode. Danach wurden die Proteine für ca. 2 Stunden im Trenngel (10%) bei 20 mA gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Unmittelbar im Anschluss erfolgte der elektrophoretische Transfer auf eine proteinbindende Membran im Semi-Dry-Verfahren. Dabei wurden die Proteine durch Anlegen einer Spannung (12 V, 50 min) aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF-Membran) übertragen.

Weil die Membran jegliches Protein, damit auch die Antikörper, unspezifisch bindet, ist es essentiell, alle noch nicht besetzten Membranbindungsstellen

durch eine mindestens einstündige Inkubation in BSA (5% BSA in Waschpuffer) bei 37°C oder bei 4°C über Nacht zu sättigen.

Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur. Zunächst wurde die Membran dreimal mit Waschpuffer gewaschen, dann für 30 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Antikörper, der keine Bindung eingegangen war, durch erneutes dreimaliges Waschen entfernt. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zur Detektion an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Nachdem die Membran erneut dreimal gewaschen worden war, wurde sie in ECL-Lösung im Dunkeln inkubiert, um die Banden sichtbar zu machen. Die Lichtreaktion wurde mit Röntgenfilmen in der Dunkelkammer detektiert.

3.12 QPCR

Die qPCR ist ein quantitatives Messverfahren zur Bestimmung von RNA- bzw. DNA-Gehalt. Das Verfahren wurde eingesetzt, um die Genexpression von α -Galaktosidase A in den transduzierten Moinzelllinien zu bestimmen. Dazu wird zunächst die RNA aus den Zellen isoliert. Da in der qPCR RNA nicht direkt nachgewiesen werden kann, wird die DNA mittels einer reversen Transkriptase in komplementäre cDNA umgeschrieben. Danach erfolgt die real-time PCR mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff: SYBR Green. Die Fluoreszenz wird während der PCR vom Cyclor erfasst. Als Referenz wurde HRPT 1 (hypoxantine phosphoribosyltransferase) gemessen. HRPT 1 ist ein sogenanntes housekeeping gen, das heißt ein nicht-reguliertes Gen, das unabhängig von Zellart und äußeren Einflüssen exprimiert wird. Aus dem Verhältnis zwischen der Fluoreszenz der Ziel-DNA und des housekeeping-Gens erfolgt die relative Quantifizierung der Proben.

3.12.1 RNA Präparation

RNA-Präparation erfolgte weitestgehend nach Herstelleranleitung. Der im Kit enthaltene RLT-Puffer wurde für jeden Versuch neu steril unter dem Abzug mit β -Mercaptoethanol gemischt: 10 μ l β -Mercaptoethanol/1ml RLT-Puffer. Dieser Puffer wurde auf die mit 1xPBS gewaschenen Zellschalen gegeben, die Zellen mit einem Scraper gelöst und in ein Eppendorf tube überführt und gevortext. Anschließend wurden die Zellen auf eine Qiashredder-Säule gegeben und 2min mit Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Qiashredder ist eine bipolymere Säule in der genomische DNA und andere Zellbestandteile mit hohem Molekulargewicht homogenisiert werden und so die Probe aufgereinigt wird.

Bei der Präparation wurde auf RNase-freie Arbeitsbedingungen geachtet. Ein Teil der Probe wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die RNA sichtbar zu machen und zu überprüfen, ob die Aufreinigung gelungen ist.

Die Konzentration der RNA-Proben wurde am Nanodrop gemessen.

3.12.2 Reverse Transkription

Zur Synthese der cDNA aus der isolierten RNA erfolgte die reverse Transkription. Die RT-Reaktion wurde mit dem Superskript III Kit durchgeführt. Hierzu wurde jeweils ca. 1 µg RNA in einen 20 µl Reaktionsansatz mit 10 µl Reaktionsmix, 2 µl Enzym-Mix gegeben. Aufgefüllt auf 20 µl wurde mit DEPC Wasser, das im Kit enthalten ist. Die Reaktion der reversen Transkription erfolgte nach einer 10 minütigen Inkubation bei 25°C für 30 min bei 50°C, gefolgt von einer Denaturierung bei 85°C für 5 min. Die Proben wurden kurz auf Eis runter gekühlt, dann wurde 1 µl RNase H dazugegeben und die Proben wurden für 20 min bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Zugabe von reverser Transkriptase.

3.12.3 QPCR

Der Thermocycler wurde nach Standard kalibriert. Anschließend wurde die QPCR nach Herstelleranleitung mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit von Qiagen durchgeführt. Tabelle 26 zeigt das verwendete Thermocyclerprogramm.

Tabelle 26: Thermocyclerprogramm für die QPCR

Schritt	Temperatur	Dauer	Beschreibung
1	95°C	15:00 min	Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase
2	94°C	00:15 min	Denaturierung
3	55°C	00:33 min	PrimerHybridisierung/Annealing; Datenaufnahme 1
4	72°C	00:30 min	Polymerasition/Extension; Datenaufnahme 2
5			45 mal Schritt 2-4
6	65°C	00:10 min	zusätzliche Datenaufnahme
7			150 mal Schritt 6
8	25°C		bis Ende

3.13 Luciferase-Assay

Im Luciferase-Assay wurde die Effizienz der Regulation der α -Galactosidase anhand der Lichtemission des Enzyms Luciferase gemessen. Dazu musste die Sequenz der Hairpins in den Vektor pscheck2 kloniert werden, damit sie als künstlicher 3'-UTR der *Renilla reniformis* Luciferase transkribiert werden kann. Das pscheck2 Plasmid exprimiert eine „firefly“ Luciferase, die der Normalisierung dient.

Im Weiteren wurden HEK 293t-Zellen in einem 96-well kultiviert und am nächsten Tag mit Hilfe von Lipofectamin2000 zu gleichen Anteilen mit pscheck2 Vektor und den pcDNA6-Konstrukten der Hairpins transfiziert. Am darauffolgenden Tag wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen mit 100 μ l Lysepuffer aus dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Kit für 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Herstellungsanleitung mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay-Kit. Es wurden 10 μ l des Lysats für die Messung im Luminometer Mithras LB940 eingesetzt. Alle Konditionen wurden in dreifacher Ausführung transfiziert und gemessen. Anhand der Relation von „Renilla“ und „Firefly“ Luciferase lässt sich die Effizienz der siRNAs in der Herunterregulierung der α -Galaktosidase A bestimmen.

3.14 Galaktosidase-Aktivitätsassay

Mit dem Galaktosidase-Aktivitätsassay lässt sich die Aktivität der α -Galaktosidase und der β -Galaktosidase messen, die beide in jeder Zelle vorhanden sind. Bei dem Assay wird den beiden Enzymen ein jeweils spezifisches Substrat dargeboten, das diese zu dem fluoreszierenden Produkt β -Methylumbelliferon umsetzen. Dessen Konzentration kann in einem Photometer gemessen werden. Im Vergleich zu Kontrollzellen lässt sich dann eine Aussage über die jeweilige Enzymaktivität treffen.

Vor Beginn des Assays wurden transduzierte ausdifferenzierte Zellen aus den Petrischalen geerntet. Dazu wurden die Zellschalen einmal mit 1xPBS

gewaschen und möglichst trocken abgesaut. Danach wurde ca. 1 ml 1x PBS auf die Zellen gegeben und je 3 bis 5 Zellschalen einer Kondition mit einem Zellscraper gelöst. Danach wurden die Zellen in ein Eppendorfggefäß überführt.

Die Eppendorgefäße wurden 5 min bei 5000 rpm in einer 4 °C kalten Zentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit dem doppelten Volumen, ca. 15 µl destilliertem Wasser durch auf und ab pipettieren gelöst. Dann wurden die Zellen fünf Mal in flüssigem Stickstoff gefroren und unter Schütteln bei Raumtemperatur wieder aufgetaut.

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden je 10 µl mit dem BCA Protein Assay KIT nach Pierce nach Herstelleranleitung gegen einen Albuminstandard am Photometer bei 570 nm gemessen.

Für den Messansatz wurden die Zellproben folgendermaßen auf eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben:

Es wurde alles im Doppelansatz pipettiert. Es wurde ein Doppelansatz mit α -Galaktosidase-Substrat und einer mit β -Galaktosidase-Substrat pipettiert. Die Pipettierolumina können Tabelle 27 entnommen werden. Für die Ansätze mit α -Galaktosidase-Substrat wurden für die jeweilige Zellprobe 9µg Protein mit ddH₂O auf 10µl aufgefüllt. Für die Ansätze mit β -Galaktosidase-Substrat wurden für die jeweilige Zellprobe 4µg Protein mit ddH₂O auf 10µl aufgefüllt.

Tabelle 27: Pipettierolumina des α -Galaktosidase A-Aktivitätsassays für die Reaktionsansätze der Zellproben und des Leerwerts

Substanz	Pipettierolumen für den Hauptwert	Pipettierolumen für den Leerwert
Zellprobe	10 µl	-
Substrat	20 µl	20 µl
ddH ₂ O	-	10 µl

Die Proben wurden anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Dann wurde in jeden Reaktionsansatz 200 µl Glycin-NaOH zugefügt.

Zur Größeneinordnung der Enzymaktivität wurde eine Eichkurve angelegt. Als Eichsubstanz diente β -Methylumbelliferon. Folgende Verdünnungen wurden angesetzt:

Vorratslösung (VL): 1mg β -Methylumbelliferon (MU)/ 100 ml aqua dest = 100 ng/10 μ l

20ng MU/10 μ l = 20 μ l VL + 80 μ l aqua dest

40ng MU/10 μ l = 40 μ l VL + 60 μ l aqua dest

60ng MU/10 μ l = 60 μ l VL + 40 μ l aqua dest

80ng MU/10 μ l = 80 μ l VL + 20 μ l aqua dest

100ng MU/10 μ l = 100 μ l VL unverdünnt

Auch die Eichkurve wurde zur Messung im Doppelansatz pipettiert. Die Pipettiervolumina können Tabelle 28 entnommen werden.

Tabelle 28: Pipettiervolumina des α -Galaktosidase A-Aktivitätsassays der Eichkurve mit β -Methylumbelliferon

Substanz	Pipettiervolumen für den Hauptwert	Pipettiervolumen für den Leerwert
Methylumbelliferonverdünnung der Eichkurve	10 μ l	-
Citrat-Phosphat-Puffer	20 μ l	20 μ l
ddH ₂ O	-	10 μ l
Glycin-NaOH	200 μ l	200 μ l

Anschließend wurden die Proben am Luminometer mit folgenden Filtern gemessen:

Anregung 355 nm

Sekundärfilter 460 nm

Schichtdicke 0,5 cm

3.15 Statistik

Es wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests nach Welch geprüft.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung und Validierung von short-hairpin RNA-Konstrukten gegen humane α -Galaktosidase A

Die Aktivität der α -Galaktosidase A ist bei M. Fabry in den Zellen der betroffenen Patienten drastisch reduziert. Insbesondere die Podozyten der Niere sind bei M. Fabry stark betroffen. Daher haben wir ein humanes Podozyten-Zellkulturmodell etabliert, in dem wir die α -Galaktosidase A-Aktivität reduziert haben (32). Um dies zu erreichen, haben wir zunächst humane α -Galaktosidase A kloniert und die Technik der RNA-Interferenz verwendet.

4.1.1 Klonierung von humaner α -Galaktosidase A

Als Grundlage für alle weiteren Klonierungen und als Kontrolle für Westernblotexperimente wurde zunächst humane α -Galaktosidase A PCR-basiert aus einer humanen Podozytenlibrary mit Restriktionsverdau in den Expressionsvektor F9.pcDNA6 kloniert, der zur besseren Detektion im Westernblot mit einem Flag-Tag (F9) versehen ist. Die Richtigkeit der Sequenz wurde mit einem standardisierten Sequenzierungsverfahren kontrolliert. Das humane- α -Gal-fulllength-Konstrukt wird im Folgenden als F9.h- α -GalA-fl-pcDNA6 bezeichnet.

4.1.2 Klonierung und Testung der Hairpin-Sequenzen gegen humane α -Galaktosidase A

Mit Hilfe einer Prädiktionsoftware von Qiagen wurden 6 Hairpin-Konstrukte hergestellt, die sich nach Prozessierung in der Zielzelle als Einzelstrang-RNA komplementär an die α -Gal-mRNA anlagern und zu einem Abbau dieser spezifischen mRNA in der Zelle führen. Dadurch kommt es zu einer verminderten Expression der α -Galaktosidase A in den Podozyten.

Die Hairpin-Sequenzen wurden zunächst in F9.pcDNA6-Vektoren kloniert, die eine transiente Expression der shRNA-Konstrukte in der Zellkultur

ermöglichen. Die Richtigkeit der Sequenz wurde in einem standardisierten Sequenzierungsverfahren kontrolliert.

Anschließend wurden die Konstrukte in einem Luciferase-Assay zur Überprüfung der Effizienz der shRNA getestet (32). Als Kontrolle diente zum einen die sh-RNA mirneg, zum anderen die shRNA PKD, eine shRNA deren Sequenz unabhängig von der α -Galaktosidase-Sequenz ist und demnach deren Aktivität nicht beeinflusst. Der Luciferase-Assay ergab wie erwartet eine unterschiedliche Effizienz der verschiedenen Hairpin-Konstrukte (Abb. 5). Aus den erhobenen Daten wurde zum besseren Vergleich das Verhältnis der Renilla-Aktivität zur Firefly-Aktivität gebildet (RL/FL). Die Firefly-Aktivität dient hier der Normalisierung, um einen eventuellen Fehler unterschiedlicher Probenmengen auszugleichen. Die Probe, die mirneg enthielt, zeigt ein Verhältnis von 1,09, die andere Kontrollprobe mit shRNA-PKD zeigt ein Verhältnis von 0,94. Bei beiden Kontrollen ist also die Renilla- und die Firefly-Aktivität im Verhältnis zu einander etwa gleich hoch. Für die Hairpinkonstrukte ergaben sich deutlich kleinere Verhältnisse. Die shRNA361 zeigt ein Verhältnis von 0,13, shRNA459 eines von 0,08. Die shRNA 726 weist ein Verhältnis von 0,14 auf, shRNA 894 von 0,15, shRNA 1185 von 0,39 und shRNA1227 von 0,42. Diese Verhältnisse sprechen für eine deutlich geringere Renilla-Aktivität. Die shRNA-Konstrukte können also tatsächlich die α -Galaktosidase A-Aktivität reduzieren, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Für die weitere Testung im Westernblot wurden daher nur die drei shRNA-Konstrukte mit der stärksten Reduktion der Aktivität verwendet: shRNA 459, shRNA 726 und shRNA 894.

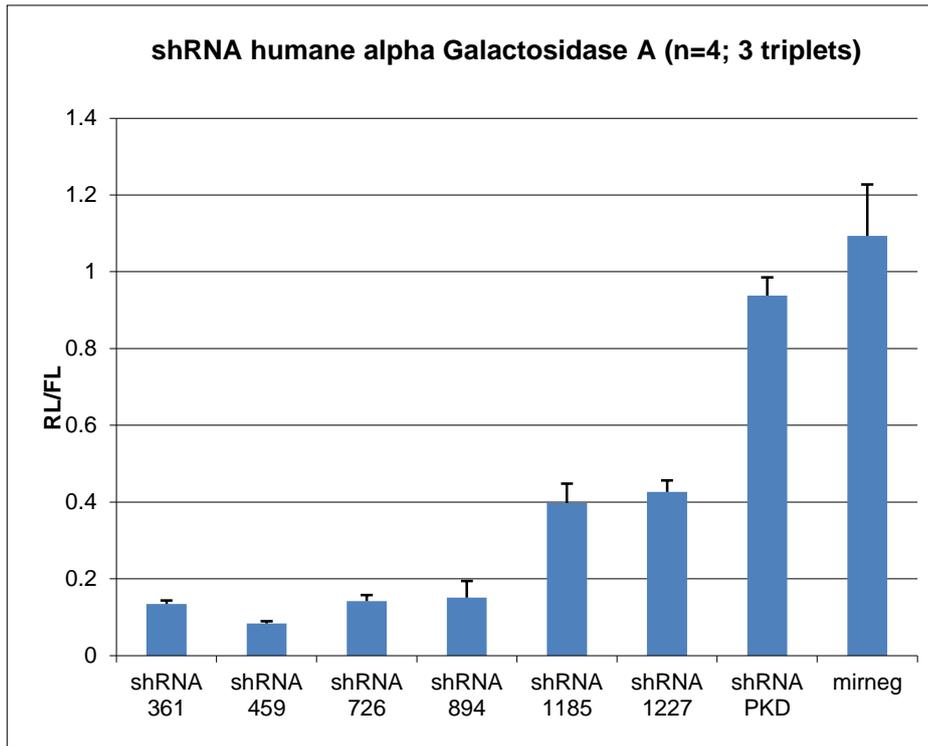


Abb. 5: Luciferase-Assay der Hairpin-Konstrukte: Alle Konstrukte wurden für den Versuch in den Vektor pscheck2 kloniert. Als Kontrollen dienten mirneg und die von der α -Galaktosidase-A-Sequenz unabhängige shRNA PKD. Gemessen wurde die Veränderung der Renilla Aktivität. Die Messung der Firefly-Aktivität dient der Normalisierung der Ergebnisse. Zum Vergleich der Daten wurde das Verhältnis Renilla/Firefly (RL/FL) gebildet. Für die beiden Kontrollkonstrukte wurde wie erwartet eine ähnlich hohe Renilla- wie Firefly-Aktivität gemessen. Für die Hairpinkonstrukten ergaben sich deutlich niedriger Verhältnisse. Diese Ergebnisse lassen auf eine reduzierte α -Galaktosidase A Aktivität durch die Hairpin-Konstrukte schließen.

Da die Aktivität der verschiedenen Hairpin-Konstrukte im Luciferase-Assay nur indirekt über die Transkription von Luciferase gemessen wird, haben wir die hairpin-induzierte verringerte Proteinexpression der α -Galaktosidase A zusätzlich im Western Blot nachgewiesen (32). Das α -Gal-fulllength-Konstrukt F9.h- α -GalA-fl-pcDNA6 wurde parallel mit shRNA459.pcDNA6, shRNA726.pcDNA6 oder shRNA894.pcDNA6 transient in HEK-293T-Zellen transfiziert. Um zu überprüfen, ob eine gleichmäßige Proteinladung gewährleistet ist, wurde zusätzlich ein unabhängiges Konstrukt (F9.EPS.pcDNA6; EPS = Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-like 1) transfiziert, das ebenso wie die anderen Konstrukte mit einem Flag-Tag versehen war. Als Kontrolle diente mirneg (Co-shRNA). Die Effizienz der

durchgeführten transienten Transfektion wurde überprüft, indem zugleich HEK-293T-Zellen mit dem Konstrukt V5.GFP.pcDNA6 transfiziert wurden, so dass die transfizierten Zellen eGFP, ein grün fluoreszierendes Protein, exprimierten. Aus den mit shRNAs transduzierten Zellen wurden Zellysate präpariert und im Westernblot mit einem Antikörper gegen das Flag-Tag gefärbt. (Abb. 6)

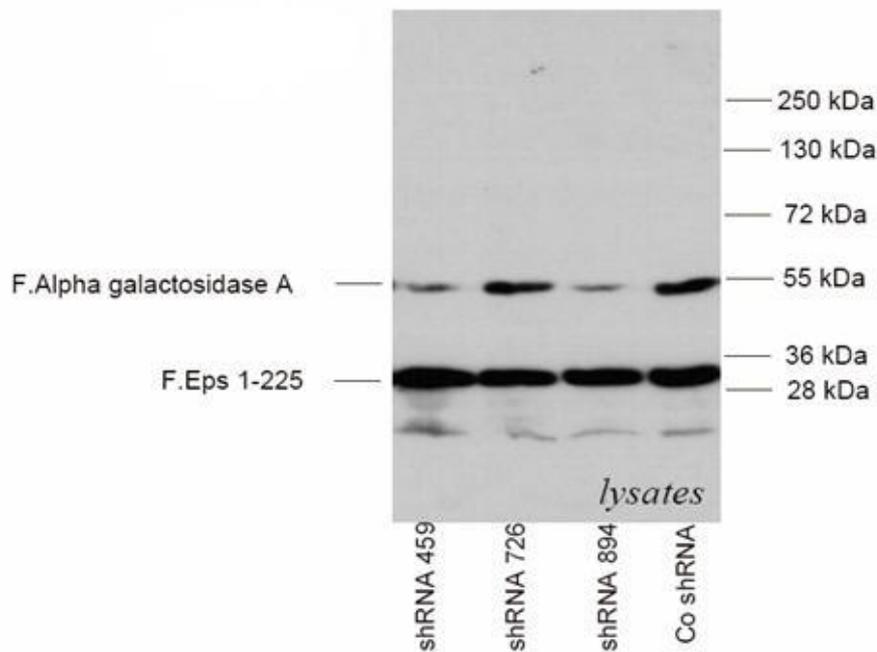


Abb. 6: Validierung der shRNA-Konstrukte im Westernblot: HEK293T-Zellen wurden parallel mit dem Flag. α -GalaktosidaseAfulllength-Konstrukt, dem Kontrollplasmid Flag.EPS¹⁻¹²⁵ und jeweils einer shRNA transfiziert. Es wurden die shRNAs 459, 726, 894, sowie die KontrollshRNA mirneg transfiziert. Die Detektion der Proteinexpression erfolgte durch einen monoklonalen Anti-Flag-Antikörper. Der Westernblot zeigt eine vergleichbar starke Expression von Flag.EPS¹⁻¹²⁵ in allen Proben, was für eine ähnlich hohe Proteinladung in allen Proben spricht, so dass diese untereinander vergleichbar sind. Das α -Galaktosidase A-Signal ist in den Proben mit shRNA 459 und shRNA 894 geringer, als in der Kontrollprobe. In der Probe mit shRNA 726 lässt sich kein Unterschied der α -Galaktosidase A-Expression im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

Im Westernblot (Abb.6) zeigt sich in allen Proben eine annähernd gleiche Expression des ko-exprimierten Kontrollproteins F.EPS¹⁻¹²⁵. Bei shRNA 459 sowie shRNA 894 ist eine deutliche Reduktion der α -Galaktosidase A-Expression im Vergleich zu den mit Kontroll-shRNA-transfizierten Zellen nachweisbar. Es ist also anzunehmen, dass diese beiden Konstrukte

erfolgreich die Expression von α -Galaktosidase A senken. Die Transfektion von shRNA 726 zeigt nur einen geringen Effekt auf die Proteinexpression, so dass dieses shRNA-Konstrukt die alpha-Gal-Proteinexpression weniger effektiv reduziert. Aufgrund dieser Ergebnisse haben wir uns entschieden, in den weiteren Experimenten humane Podozyten mit den zwei shRNA-Konstrukten shRNA 459 und shRNA 894 zu transduzieren.

4.2 Etablierung und Validierung einer humanen Podozytenzelllinie mit verminderter α -Galaktosidase A-Aktivität

Wir transduzierten die etablierte humane Podozytenzelllinie, AB8/13 (53), mit dem aus dem Überstand von HEK-293T-Zellen gewonnen spezifischen Virus. Dadurch wurden die verschiedenen vorher klonierten shRNA-Konstrukte stabil in das Genom der humanen Podozyten integriert. Alle Hairpin-Konstrukte enthalten zusätzlich eine eGFP-Sequenz, so dass nur Zellen, die Hairpin-Konstrukte nach erfolgreicher Transduktion in das Genom integriert haben, unter UV-Licht grün leuchten (Abb. 7). Dies dient als Kontrolle der Transduktionseffizienz der verschiedenen Hairpin-Konstrukte und ermöglicht jederzeit, auch nach längerer Zellkulturphase, die Expression des eGFP zu kontrollieren. Dabei ist impliziert, dass Zellen, die eine eGFP-Expression zeigen, auch das entsprechende Hairpinkonstrukt exprimieren.

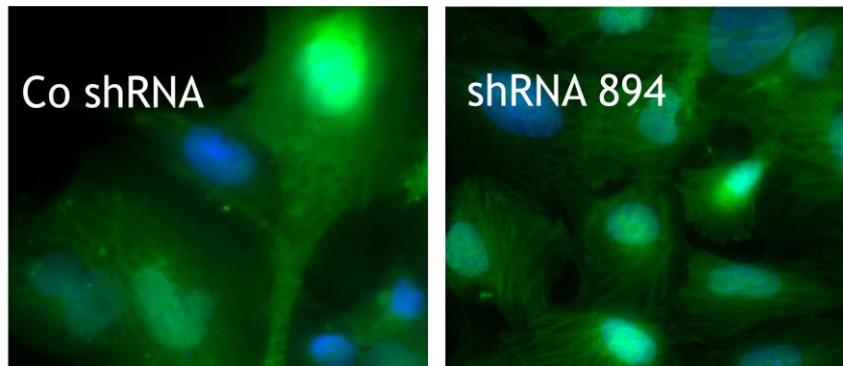


Abb. 7: Nachweis der Transduktionseffizienz mittels eGFP am Beispiel von mit mirneg (Co shRNA) bzw. shRNA 894 transduzierten humanen Podozyten. Mittels UV-Licht wird eGFP in den Zellen angeregt, so dass sie grün leuchten, wenn sie eGFP exprimieren. In allen verwendeten Zellkulturen für CoshRNA (mirneg), shRNA459 und shRNA894 lag die Transduktionseffizienz zwischen 90-95%.

4.2.1 Die Transduktion humaner Podozyten mit shRNA 459 und shRNA 894 führt zu einer Reduktion der zellulären α -Galaktosidase-mRNA

Um zu überprüfen, ob es durch die zelluläre Expression der verschiedenen Hairpin-Konstrukte tatsächlich zu einer Reduktion der α -Galaktosidase A im humanen Podozytenzellkulturmodell kommt, präparierten wir Gesamt-RNA aus unseren verschiedenen stabil transduzierten Zelllinien (32). Diese Proben wurden nach Herstellung von entsprechender cDNA in einer Real-Time-PCR mit spezifischen Primern für humane α -Galaktosidase A untersucht (Abb.8). Mit dieser Methode kann die Menge der in den Zellen vorhandenen spezifischen mRNA für α -Galaktosidase A bestimmt werden. Für diese Versuche wurden Podozyten verwendet, die bei 37°C ausdifferenziert waren und somit podozytenspezifische Markerproteine exprimierten.

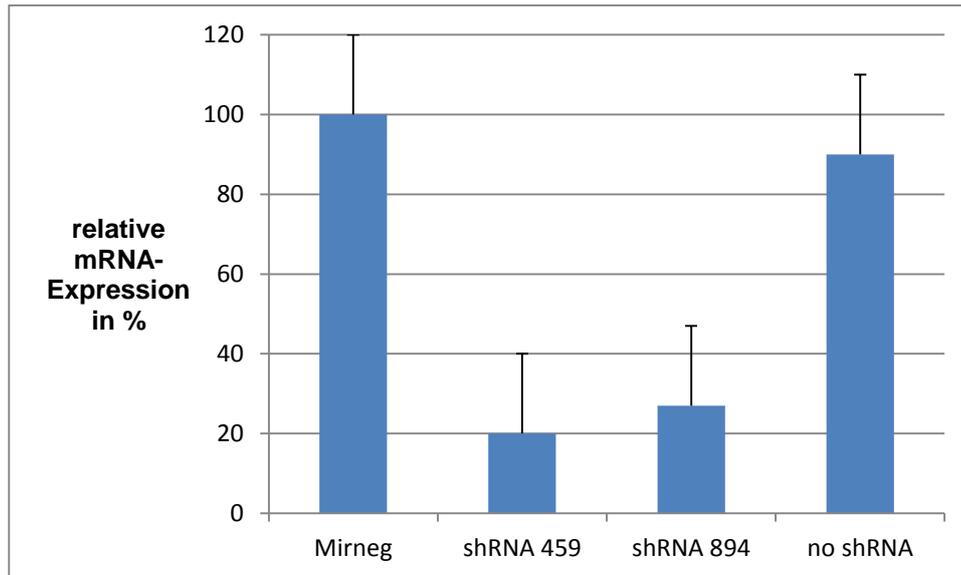


Abb. 8: In einer real-time-PCR gemessene relative Expression von α -Galaktosidase A-spezifischer mRNA in Podozyten, die mit shRNA 459 oder shRNA 894 transduziert wurden. Im Vergleich dazu untransduzierte Podozyten (no shRNA), sowie mit einer Kontroll-shRNA transduzierte Podozyten (mirneg). Im Vergleich zu den Kontrollzellen zeigen Podozyten, die α -Galaktosidase A-spezifische Hairpin-Konstrukte exprimieren, eine um 80% (shRNA 459) bzw. um 73% (shRNA 894) geringere Expression von α -Galaktosidase A.

In den mit shRNA 459- und shRNA 894-transduzierten Zellen zeigt sich in der real-time-PCR wie erwartet eine deutlich geringere Menge an α -Galaktosidase-A-spezifischer mRNA. shRNA 459-transduzierte Podozyten zeigen 27%, shRNA 894-transduzierte Podozyten nur 20% der mRNA-Menge im Vergleich zu mir neg-transduzierten Kontroll-Podozyten (normalisiert auf 100%). Untransduzierte Podozyten weisen ebenfalls nahezu normale Mengen an α -Galaktosidase A-mRNA auf:

Indirekt lässt sich aus den real-time-PCR-Daten darauf schließen, dass in den verwendeten humanen Podozyten, die mit shRNA 459 oder shRNA 894 transduziert wurden, analog zur Abnahme der mRNA-Menge auch eine deutlich verminderte Expression des Proteins α -Galaktosidase A stattfindet.

Im nächsten Schritt versuchten wir daher, die verminderte Expression des Proteins α -Galaktosidase A direkt im Westernblot nachzuweisen. Uns standen dazu zwei verschiedene polyklonale α -Galaktosidase A-Antikörper zur Verfügung. Wir untersuchten Zelllysate von humanen Podozyten, die mit

shRNA 459, shRNA 894 transduziert waren. Als Kontrolle dienten untransduzierte Podozyten (no shRNA) und mit der Kontroll-RNA mirneg transduzierte Podozyten (Abb. 9 bzw. 10).

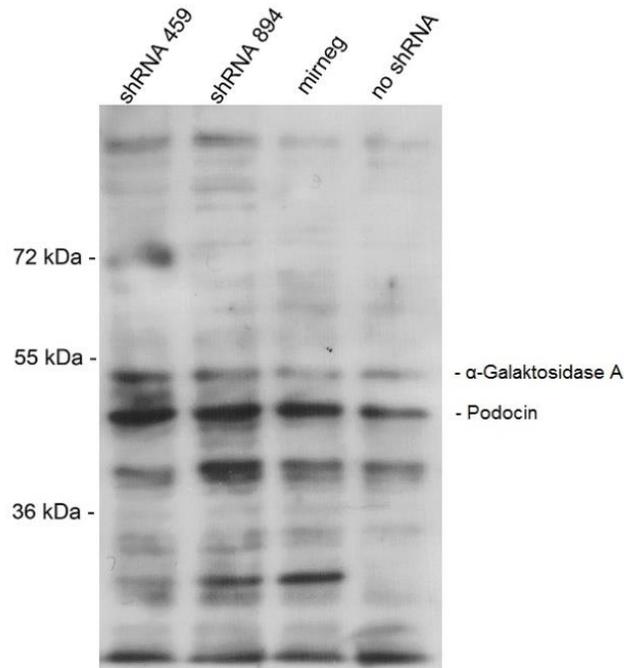


Abb.9: Westernblot zum Nachweis der verminderten Proteinexpression von endogener α -Galaktosidase A. A-Galaktosidase A wurde mit einem polyklonalen Antikörper aus der Spezies Huhn detektiert. Der Westernblot zeigt Zellysate von Podozyten, die stabil mit shRNA 459 oder shRNA 894 transduziert wurden. Als Kontrolle dienten Podozyten die mit der Kontroll-RNA mirneg transduziert worden waren, sowie untransduzierte Podozyten (no shRNA). Die α -Galaktosidase A-spezifische Bande läuft unterhalb der 55 kDa Markierung bei 49 kDa. Es ist kein Unterschied in der Proteinexpression erkennbar zwischen den Kontrolllysaten und den Lysaten von shRNA 459 beziehungsweise shRNA 894 transduzierten Podozyten. Als Ladungskontrolle diente Podocin (42kDa).

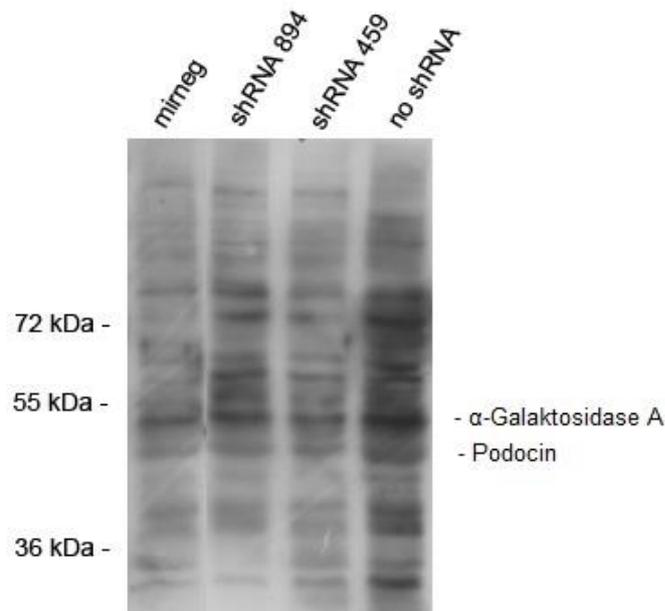


Abb.10: Westernblot zum Nachweis der verminderten Proteinexpression von endogener α -Galaktosidase A. α -Galaktosidase A wurde mit einem polyklonalen Antikörper aus der Spezies Kaninchen detektiert. Der Westernblot zeigt Zellysate von Podozyten, die stabil mit shRNA 459 oder shRNA 894 transduziert wurden. Als Kontrolle dienten Podozyten die mit der Kontroll-RNA mirneg transduziert worden waren, sowie untransduzierte Podozyten (no shRNA). Als Ladungskontrolle diente Podocin (42kDa). Die α -Galaktosidase A spezifische Bande läuft unterhalb der 55 kDa Markierung bei 49 kDa. Es ist kein Unterschied in der Proteinexpression erkennbar zwischen den Kontrolllysaten und den Lysaten von shRNA 459 beziehungsweise shRNA 894 transduzierten Podozyten.

Das Ergebnis war für beide getesteten Antikörper ähnlich. Wir konnten mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern keinen relevanten Unterschied in der Proteinexpression von endogener α -Galaktosidase A zwischen den einzelnen Proben nachweisen, insbesondere keine Abnahme in den mit short-hairpin-Konstrukten transduzierten Podozyten. Insbesondere ist auffällig, dass sich eine Vielzahl von unspezifischen Banden im Westernblot zeigt. Dies macht die Identifizierung der Bande, die α -Galaktosidase A entspricht, sehr schwierig und legt Zweifel an der Spezifität der Antikörper nahe.

4.2.2 Verminderte α -Galaktosidase A-Aktivität in mit shRNA 459 und shRNA 894-transduzierten Podozyten

Das Enzym α -Galaktosidase A ist in der Lage aus Globotriaosylceramid, das in allen Körperzellen im Sphingolipidstoffwechsel anfällt, ein Molekül Galaktose abzuspalten. Dadurch entsteht Lactosylceramid. Diese Enzymaktivität kann gemessen werden, indem als Substrat, statt Globotriaosylceramid, 4-Methyl-umbelliferyl- α -D-galactopyranosid eingesetzt wird. Nach Abspaltung von Galaktose durch α -Galaktosidase A entsteht β -4-Methylumbelliferon, das als fluoreszierendes Produkt in einem Fluoreszenzphotometer gemessen werden kann. Als interner Standard dient die Messung der beta-Galaktosidase-Aktivität der selben Probe mit 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-galactopyranosid. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung undifferenzierter Podozyten.

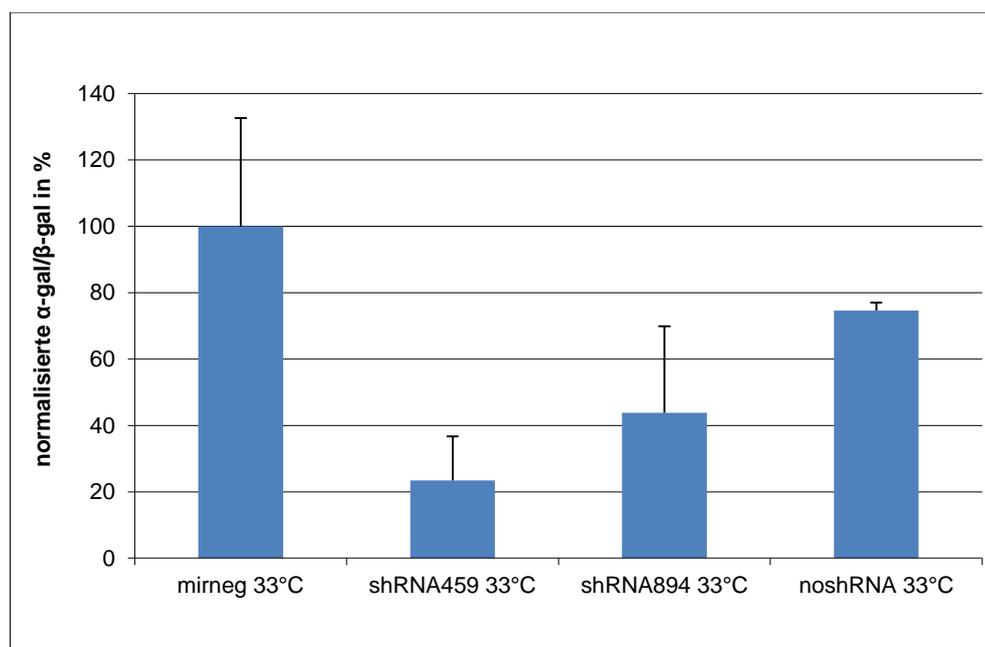


Abb. 11: α -Galaktosidase A-Aktivitätsmessung (n=2) von Zelllysaten aus undifferenzierten Podozyten bei 33°C, die entweder mit dem Hairpin-Konstrukt shRNA 459, dem Hairpinkonstrukt shRNA 894 oder der Kontroll-shRNA mirneg transduziert worden waren. Als weitere Kontrolle dienten untransduzierte undifferenzierte Podozyten (noshRNA). Im Vergleich zu mirneg (normalisiert auf 100%) lag die α -Galaktosidase A- Aktivität in den mit shRNA-Konstrukten transduzierten Podozyten bei 23,5% (shRNA459) beziehungsweise bei 43,8% (shRNA894). Die α -Galaktosidase A-Aktivität der untransduzierten Podozyten war im Vergleich zu mirneg ebenfalls geringer (74,7%).

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der α -Galaktosidase A-Aktivitätsmessung von bei 37 °C kultivierten differenzierten Podozyten.

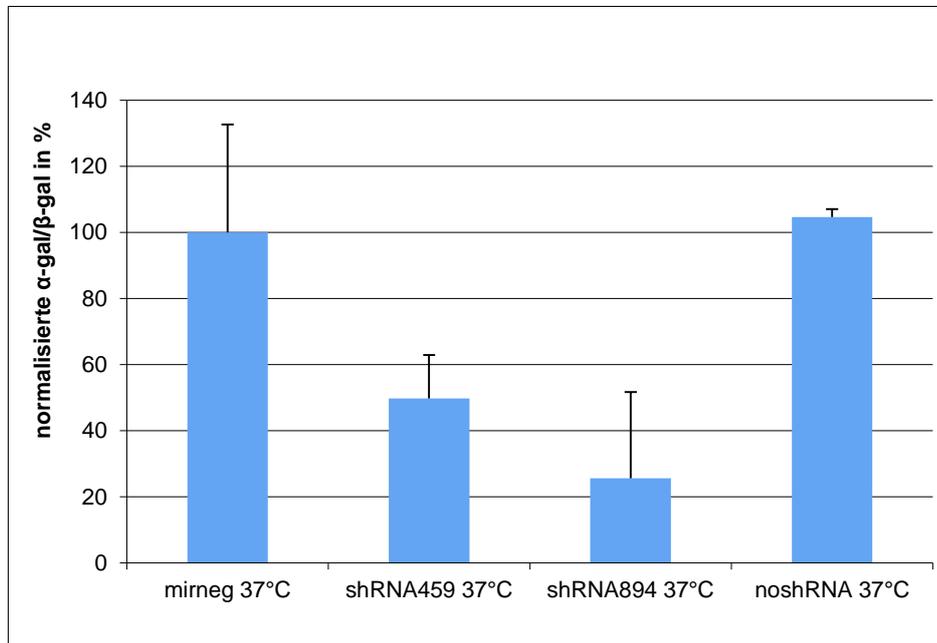


Abb. 12: α -Galaktosidase A-Aktivitätsmessung (n=7) von Zellysaten aus differenzierten Podozyten, die entweder mit dem shRNA-Konstrukt shRNA 459, dem Hairpinkonstrukt shRNA 894 oder der Kontroll-shRNA mirneg transduziert worden waren. Als weitere Kontrolle dienten untransduzierte differenzierte Podozyten (noshRNA). Im Vergleich zu mirneg (normalisiert auf 100%) lag die α -Galaktosidase A Aktivität in den mit shRNA-Konstrukten transduzierten Podozyten bei 49,7% (shRNA459) beziehungsweise bei 25,6% (shRNA894). Die untransduzierten Podozyten wiesen eine ähnlich hohe Aktivität auf, wie die mit mirneg transduzierten Podozyten.

Die Bestimmung der α -Galaktosidase A-Aktivität in den verschiedenen Zelllinien ergab, dass es durch die Transduktion der shRNA-Konstrukte wie erwartet zu einer Abnahme der α -Galaktosidase A-Aktivität in humanen Podozyten kommt. Bei einer Temperatur von 33°C in der Zellkultur kommt es in den mit shRNA 459-transduzierten Zellen zu einer Reduktion der α -Galaktosidase A-Aktivität um 76,5% im Vergleich zu mir neg-transduzierten Podozyten (normalisiert auf 100%). Mit shRNA894 transduzierte Zellen zeigen eine um 56,2% reduzierte Aktivität. Bei 37°C Kulturtemperatur, die dazu führt, dass die kultivierten Zellen podozytäre Markerproteine exprimieren, zeigen die

mit shRNA459 transduzierten Podozyten eine um 50,3% reduzierte Aktivität im Vergleich zu den mit mirneg transduzierten Zellen. Mit shRNA894 transduzierte Zellen zeigen eine um 74,4% reduzierte Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Es gab deutliche Unterschiede in der Aktivität der α -Galaktosidase A zwischen undifferenzierten und differenzierten Podozyten. Im Folgenden wurden nur die differenzierten Podozyten betrachtet. Diese Untersuchungen konnten, wie bereits mit der real-time-PCR gemessen, zeigen, dass die transduzierten shRNA-Konstrukte in der Podozytenkultur funktionell sind und sowohl zu einer Abnahme der α -Galaktosidase A-RNA als auch zur Abnahme der Enzymaktivität in den Zellen führen.

Zur Beurteilung der Signifikanz der gemessenen Werte wurde ein t-Test nach Welch berechnet. (Tabelle 29) Mit Hilfe des t-Tests wurde die Signifikanz der Messwerte in Bezug auf die Proben mit mirneg verglichen.

shRNA/ Versuchsan- zahl n	Mittelwert ($\mu\text{mol MU}/\mu\text{g}$ Protein)	Standardabw. ($\mu\text{mol MU}/\mu\text{g}$ Protein)	Ist-t-Wert	Soll-t-Wert	Signifikanz
mirneg n=8	0,1625	0,049	/	/	/
shRNA459 n=7	0,0767	0,0315	4,08 p<0,01	1,97	+
shRNA894 n=7	0,0358	0,015	6,95 p<0,01	2,08	+
noshRNA n=4	0,1513	0,024	0,53	2,02	n.s.

Tabelle 29: Signifikanzprüfung der α -Galaktosidase Aktivitätsmessung der shRNA 459 und shRNA 894 bei 37°C. Die Ergebnisse der mit shRNA459 und shRNA894 transduzierten Zellen und die Ergebnisse für untransduzierte Podozyten (noshRNA) wurden jeweils mit mirneg-transduzierten Zellen verglichen. Der Unterschied der α -Galaktosidase A-Aktivität in den mit shRNA transduzierten Podozyten war im Vergleich zu mit mirneg transduzierten Podozyten signifikant. Untransduzierte Podozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Aktivität im Vergleich zu mit mirneg transduzierten Podozyten.

Es zeigt sich wie erwartet kein signifikanter Unterschied zwischen untransduzierten Podozyten und mit mirneg transduzierten Kontrollpodozyten.

Die Reduktion der α -Galaktosidase A-Aktivität in mit shRNA 459- und shRNA 894-transduzierten Podozyten ist signifikant.

Somit konnten wir sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Enzymaktivitätsebene zeigen, dass die im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Podozytenzelllinien analog zu den Patienten mit Morbus Fabry eine deutlich reduzierte α -Galaktosidase A-Aktivität aufweisen. Diese Zelllinien können daher als Modell für weitere Untersuchungen des Podozytenschadens bei Morbus Fabry dienen.

4.3 Klonierung von Δ KDLL und Y365X

Um eine weitere Technik zur Reduktion der α -Galaktosidase A-Aktivität in unseren Zellen zu etablieren, wurden humane Podozyten mit einem Konstrukt transduziert, das eine Trunkation des α -Galaktosidase A-Proteins zur Folge hat, dessen Proteinsynthese nach der Aminosäure 365 abbricht: Y365X. Es ist bereits bekannt, dass diese Trunkation einen dominant-negativen, das heißt reduzierenden Effekt auf die Aktivität der α -Galaktosidase A ausübt (Miyamura, 1996). Ebenfalls klonierten wir eine α -Galaktosidase A-Variante, die bekanntermaßen eine deutliche Zunahme der α -Galaktosidase A-Aktivität zeigt: Δ KDLL, eine Trunkation der humanen α -Galaktosidase A-Sequenz (Miyamura, 1996). Diese Trunkationen wurden PCR-basiert in den Vektor V5.pcDNA6 kloniert. Dieser Vektor enthält ein V5-Tag, das in Zellen, die das Konstrukt exprimieren. Mittels eines Anti-V5-Antikörpers im Westernblot nachgewiesen werden kann. Wir zeigten im Westernblot, dass beide Trunkationen nach transienter Transfektion der klonierten Plasmide in 293T-Zellen tatsächlich in den Zellen exprimiert werden (Abb. 13).

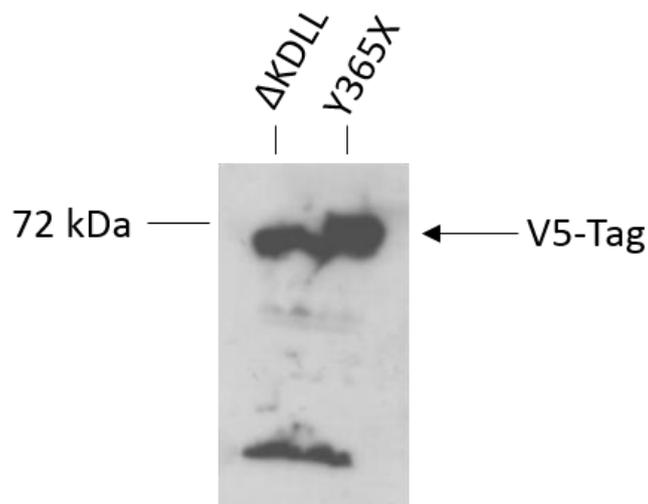


Abb. 13: Westernblot der Zellysate von HEK293T-Zellen, die transient mit den Plasmiden transfiziert wurden, die für die α -Galaktosidase A-Trunkationen Δ KDLL und Y365X kodieren. Die Proteinexpression wurde durch einen monoklonalen Antikörper gegen das V5-Tag detektiert, dessen Expressionssequenz zusätzlich zu den α -Galaktosidase A-Trunkationen auf dem gleichen Plasmid vorhanden ist. Im Westernblot lässt sich in beiden Proben die Expression des V5-Tags nachweisen. Beide Konstrukte werden daher in HEK293T-Zellen exprimiert.

Nach Umklonierung in den lentiviralen Vektor pLenti6.2 wurden humane Podozyten mit dem Y365X-Konstrukt und dem Δ KDLL-Konstrukt stabil transduziert. Der dominant negative Effekt von Y365X lässt erwarten, dass die α -Galaktosidase A-Aktivität in unseren transduzierten Podozyten reduziert ist. In den durchgeführten Aktivitätsmessungen im α -Galaktosidase A-Aktivitätsassay zeigte sich allerdings keine signifikante Abnahme im Vergleich zu Kontrollzellen (Abb. 14).

Für die mit dem Δ KDLL-Konstrukt transduzierten Podozyten erwarteten wir eine höhere α -Galaktosidase A-Aktivität, als für die Kontrollpodozyten. Die Messungen im α -Galaktosidase A-Aktivitätsassay zeigten tatsächlich eine deutlich höhere Aktivität in den mit der trunkierten α -Galaktosidase A transduzierten Podozyten als in den Kontrollpodozyten. (Abb.14)

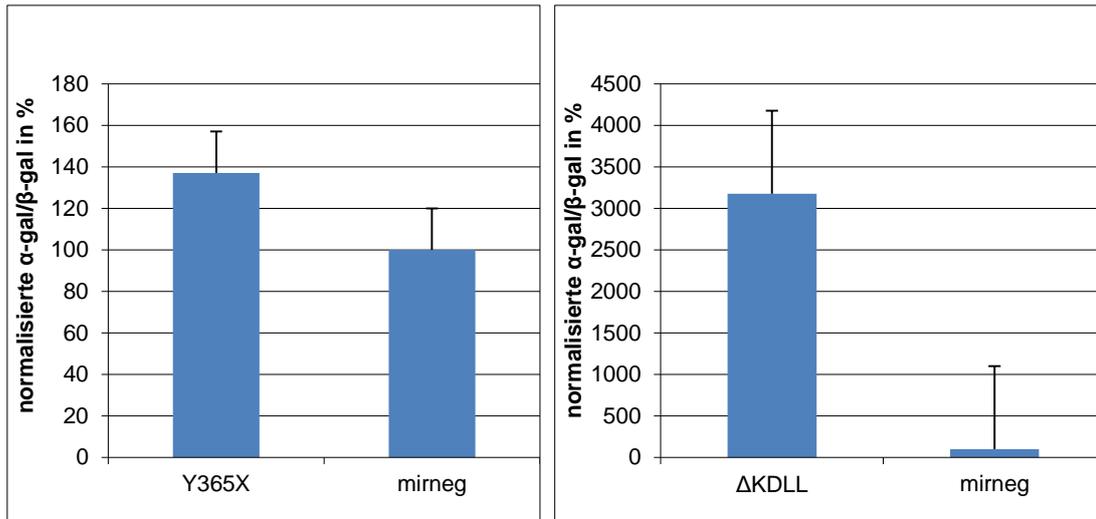


Abb. 14: α-Galaktosidase A-Aktivitätsassay (n=4 für Y365X; n=3 für ΔKDLL) von Zelllysaten aus differenzierten Podozyten, die entweder mit der α-Galaktosidasetrunkation Y365X, der Trunkation ΔKDLL oder der Kontroll-shRNA mirneg transduziert worden waren. Im Vergleich zu mirneg (100%) lag die α-Galaktosidase A Aktivität der mit der Trunkation Y365X transduzierten Podozyten bei 137%. Somit ließ sich kein dominant negativer Effekt dieser Trunkation beobachten. Im Vergleich zu mirneg (100%) lag die α-Galaktosidase A Aktivität der mit der Trunkation ΔKDLL transduzierten Podozyten bei 3176%. Die α-Galaktosidase A Aktivität ist also deutlich höher als in den Vergleichszellen.

Die Signifikanz der Ergebnisse der α-Galaktosidase A Aktivitätsassays wurde mit einem t-Test nach Welch berechnet. Als Kontrolle dienten mit mirneg transduzierte Zellen (Tabelle 30).

shRNA/ Versuchs- anzahl n	Mittelwert (μmol MU/μg Protein)	Standardabw(μmol MU/μg Protein)	Ist-t-Wert	Soll-t- Wert	Signifikanz
mirneg n=8	0,1625	0,049	/	/	/
Y365X n=4	0,1915	0,052	0,92	2,28	n.s.
ΔKDLL n=3	4,4150	0,589	12,49	4,05 p<0,02	+

Tabelle 30: Signifikanzprüfung der α-Galaktosidase A-Aktivitätsmessung der mit dem Konstrukt Y365X bzw. ΔKDLL transduzierten ausdifferenzierten Podozyten mittels t-Test. Der Unterschied der α-Galaktosidase A-Aktivität für die mit Y365X transfizierten Zellen war nicht signifikant. Die mit ΔKDLL transduzierten Zellen wiesen eine signifikant höhere α-Galaktosidase A Aktivität auf.

Im t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied in der α -Galaktosidase A Aktivität zwischen mit mirneg transduzierten Zellen und den mit Y365X transduzierten Zellen. Das von uns klonierte Konstrukt Y356X verhielt sich in transduzierten Podozyten nicht wie erwartet dominant negativ. Hingegen zeigten die mit Δ KDLL transduzierten Zellen eine signifikant höhere α -Galaktosidase A-Aktivität im Vergleich zu mit mirneg transduzierten Zellen. Mit diesen Zellen sind Vergleichsstudien des Effektes einer verstärkten α -Galaktosidase A-Aktivität in humanen Podozyten möglich.

5. Diskussion

Derzeit steht kein ausreichendes Tiermodell zur Erforschung der Pathogenese der Nierenveränderungen bei Morbus Fabry zur Verfügung, da im Mausmodell keine Nierenfunktionseinschränkungen nachweisbar sind (1, 27). Das Gen der α -Galactosidase A beim Menschen besteht aus 1290 Basenpaaren, die sich auf sieben Exons aufteilen und 429 Aminosäuren codieren. In der publizierten Literatur sind mehr als 450 Mutationen bekannt, darunter mehr als 300 Punktmutationen und über 150 neue Zusammenstellungen nach Chromosomenbrüchen. (22, 56). Diese Varianz zeigt die Problematik auch mit Zelllinien ein klinisch relevantes Modell zur Erforschung der Nierenpathologie beim Morbus Fabry zu etablieren.

Ich habe während meiner Doktorarbeit ein Zellkulturmodell entwickelt, das eine Untersuchung der Podozytenschädigung bei Patienten mit der lysosomalen Speichererkrankung Morbus Fabry ermöglicht (32). Podozyten sind spezialisierte glomeruläre Nierenzellen, deren Schädigung zu einer Proteinurie führt. In Nierenbiopsien von Patienten mit Morbus Fabry zeigt sich eine massive Einlagerung des Sphingolipids Gb3 in Podozyten, und es besteht eine Korrelation zwischen morphologischen Veränderungen der Podozyten und der Entwicklung einer Proteinurie (21, 42). Auch zeigte sich, dass in den Glomeruli Podozyten diejenigen Zellen mit den ausgeprägtesten Gb3 Ablagerungen sind (3). Darüberhinaus haben Podozyten im Vergleich zu anderen Nierenzellen eine geringere Kapazität zur Erneuerung, sind also auch durch schädigende Lipidablagerungen stärker betroffen (47). Daher kommt den Podozyten eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese der Morbus Fabry-induzierten Nierenerkrankung zu.

2008 etablierten Thomaidis et al. zwei verschiedene Zelllinien von immortalisierten Nierentubuluszellen (HK2-Zellen) und nicht-immortalisierten proximalen Tubuluszellen der Niere mit einer verminderten Aktivität der α -Galaktosidase A. Tubuläre Nierenepithelzellen zählen neben Podozyten zu den stark betroffenen Nierenzellen bei Morbus Fabry. Die Reduktion der α -

Galaktosidaseaktivität erfolgte, wie auch in unserer Arbeit, über virale Transduktion mit einem Gen, das für eine anti- α -Galaktosidase-A-small-hairpin-RNA kodiert. Anders als in unseren Experimenten benutzte die Gruppe von Thomaidis einen Retrovirus, um das entsprechende Gen in die Zellen zu transferieren. Der Effekt der reduzierten α -Galaktosidase-A-Aktivität konnte in der Kultur nur 5 Tage lang nachgewiesen werden, mit einem Maximum nach zwei Tagen. Wir haben in unserer Arbeit einen Lentivirus als Vehikel für unser Zielgen benutzt. Dies ist ein stabiles System, bei dem es zu einer permanenten Integration des Zielgens in das Genom der infizierten Zelle kommt. Die Stabilität des Gentransfers durch ein Lentivirus ist im Vergleich zum retroviralen Gentransfer oftmals stabiler.

Wir konnten zeigen, dass es möglich ist, humane Podozyten zu kultivieren, die eine stark reduzierte α -Galaktosidase A-Aktivität aufweisen. Dabei zeigte sich, dass wie erwartet sowohl die mRNA des Enzyms als auch die Aktivität signifikant erniedrigt waren. Im Gegensatz zu Thomaidis et al. konnten wir auch in den Zellen, die 14 Tage lang im Inkubator in einen podozytären Phänotyp differenzierten eine signifikante Enzymreduktion nachweisen (Abb. 11 und 12). Wir gehen daher von einer stabilen Transduktion aus.

Eine schwedische Arbeitsgruppe konnte mittels Immunhistochemie kein endogenes α -Galaktosidase A-Protein in Podozyten gesunder humaner Nieren nachweisen (12). Sie fanden lediglich eine relevante Menge α -Galaktosidase A in tubulären und interstitiellen Zellen. Unsere Daten im humanen podozytären Zellkulturmodell zeigen, dass eine endogene α -Galaktosidase im Westernblot nachweisbar ist. Ebenfalls weisen unsere kultivierten humanen Podozyten eine endogene α -Galaktosidase Aktivität auf. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es möglich ist, diese endogene α -Galaktosidase A-Aktivität zu hemmen. Bisher ist unklar, ob die Schädigung der Podozyten durch resorbiertes Gb3 aus dem Serum oder durch endogenes Gb3 erfolgt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint auch ein endogener Schädigungsmechanismus in vivo möglich.

Die von uns neu etablierte podozytäre Zelllinie wird in Zukunft weiter charakterisiert werden. In einem ersten Schritt werden wir die Expression verschiedener podozytärer Markerproteine wie z.B. Schlitzmembranproteine oder WT1 überprüfen, um Unterschiede in der Expression dieser Markerproteine in Abhängigkeit von der alphaGalaktosidase-Aktivität zu überprüfen. Ebenfalls stellt sich die Frage, ob unser Zellkulturmodell weitere Merkmale der in vivo Podozyten bei Morbus Fabry aufweist. Hierzu zählen Ablagerungen von Gb3 und eine erhöhte Apoptoserate. Thomaidis et al. konnten in ihren Zelllinien die charakteristischen Gb3-Ablagerungen detektieren, indem sie eine erhöhte Gb3-Akkumulation an der Membranoberfläche feststellten. Dies werden wir in weiteren geplanten Experimenten für unser podozytäres Modell durchführen.

Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen Autophagie und lysosomalen Speicherkrankheiten (13, 26, 28). Autophagie ist ein intrazellulärer Prozess, beim dem Zellbestandteile in Autophagosomen abgebaut werden, um wieder verwertet werden zu können. Dadurch werden den Zellen neue Energiereserven zur Verfügung gestellt (37). In Fibroblasten der Haut und Nierenbiopsien von Fabrypatienten, sowie in Gehirnproben von α -Galaktosidase A defizienten Mäusen konnte eine vermehrte LC3-II-Aktivität, ein Marker für Autophagolysosomen, nachgewiesen werden (11, 44). In den ersten Untersuchungen, die in unserer Arbeitsgruppe mit dem in dieser Arbeit etablierten Zellmodell durchgeführt wurden, erbrachten auch eine erhöhte LC3-II-Aktivität in Podozyten (32). Daher erscheint auch eine vermehrte Autophagosomenbildung in den geschädigten Podozyten wahrscheinlich, welche wir in weiteren Experimenten untersuchen werden.

In vivo konnte bereits gezeigt werden, dass sich Gb3-Ablagerungen in Podozyten nach Gabe von Enzymersatztherapie verringern lassen. Auch das Stadium der Nierenerkrankung kann zum Teil verbessert werden (59), welches für eine Erholung der Podozyten und der Proteininteraktion an der

Schlitzmembran spricht. Hier stellt sich die Frage, ob es durch die Zugabe der für die Enzyersatztherapie zugelassenen Medikamente möglich ist, das Krankheitsstadium der von uns kultivierten Podozyten zu verbessern.

Um die α -Galaktosidase-Aktivität in unserem Zellkulturmodell anzuheben, etablierten wir zusätzlich eine Zelllinie mit einer deutlich erhöhten Aktivität der α -Galaktosidase A. In der Publikation von Myamura et al. wurde beschrieben, dass sich die Aktivität der α -Galaktosidase deutlich steigern lässt, wenn die letzten vier Aminosäuren des Proteins fehlen (41). Wir klonierten daher ein Konstrukt ohne diese letzten vier Aminosäuren, Lysin, Asparaginsäure, Leucin und Leucin (= Δ KDLL). Wir konnten nachweisen, dass diese Mutante auch in unserer podozytären Zellkultur eine deutlich erhöhte Enzymaktivität aufweist. Da wir bisher nur die Gesamtaktivität der α -Galaktosidase A gemessen haben, lässt sich nicht sagen, ob diese Steigerung durch eine vermehrte Expression des Enzyms oder durch eine tatsächlich effektivere α -Galaktosidase A-Aktivität hervorgerufen wurde.

Für die Δ KDLL-Zelllinie stellt sich die Frage, wie sich die α -Galaktose A-Aktivität verhält, wenn wir transient eines der α -Galaktosidase-hairpin-Konstrukte zusätzlich in die Zellen transfizieren. Es wäre möglich, dass das hairpin-Konstrukt die α -Galaktosidase-Aktivität in gleichem Maß wie in nicht-mutierten α -Galaktosidasezellen vermindern kann. Möglicherweise bliebe aber eine Restaktivität der α -Galaktosidase bestehen, die der normalen zellulären Aktivität entspräche oder sogar noch darüber läge. Es ist interessant zu spekulieren, dass ein Fehlen der letzten vier Aminosäuren der α -Galaktosidase bei Patienten mit Morbus Fabry möglicherweise eine Steigerung der Rest-Enzym-Aktivität ermöglicht und somit eine potenzielle Therapieform darstellt.

In der Fabry-knockout-Maus, der das Gen für die α -Galaktosidase fehlt, konnte gezeigt werden, dass es durch Applikation eines Plasmids, das für die humane α -Galaktosidase A kodiert, zu einer nachweisbaren α -

Galaktosidase A-Aktivität in den Nieren kommt (43). Eine ähnliche Möglichkeit wäre auch mit einem für α -Galaktosidase- Δ KDLL kodierenden Plasmid denkbar, mit dem Ziel, die zelluläre α -Galaktosidase A-Aktivität zu erhöhen und dadurch eine effektive Gentherapie für Morbus Fabry-Patienten zu entwickeln.

Wir haben zusätzlich eine stabile podozytäre Zelllinie etabliert, die eine dominant-negative Form der α -Galaktosidase exprimiert (41). Miyamura et al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass es bei Kotransfektion eines Plasmids, das für die Y365X- α -Galaktosidase-Mutation kodiert, und eines Plasmids, das für die Wildtyp- α -Galaktosidase kodiert, in COS-1 Zellen zu einer verringerten Aktivität der Gesamt- α -Galaktosidase A kommt (41). In unserem Modell konnten wir eine erfolgreiche lentivirale Transduktion unseres α -Galaktosidase-Y365X-Konstruktes in Podozyten erreichen. Allerdings war die α -Galaktosidase-Aktivität in den beschriebenen Podozyten nicht reduziert. Die Ursache dieser Diskrepanz kann zum einen darin liegen, dass es sich um zwei unterschiedliche Zellkulturmodelle handelt. Zum anderen wäre es auch möglich, dass es in Podozyten zum Abschalten des Promotors für die Expression der Y365X- α -Galaktosidase kommt und selektiv nur GFP exprimiert wird. Dadurch würden wir weiterhin eine normale α -Galaktosidase A-Aktivität des endogenen Proteins messen.

Von einer stabilen Zelllinie mit einer dominant-negativen Form der α -Galaktosidase A hatten wir uns ein alternatives Modell zur Erforschung möglicher pathogenetischer Vorgänge bei der Fabry-Erkrankung erhofft. So wäre insbesondere im Hinblick auf die wahrscheinliche Rolle der Autophagie in der Pathogenese des Morbus Fabry die Frage spannend gewesen, ob die Aufnahme einer pathologisch veränderten α -Galaktosidase A ebenfalls für die Fabryerkrankung pathognomonische Veränderungen in den Zellen hervorruft. In diesem Fall wäre zu überlegen gewesen, ob die Morbidität der Fabry-Erkrankung nur durch intrazelluläre Gb3-Ablagerungen entsteht oder ob auch die Weitergabe eines defekten dominant-negativen α -Galaktosidase A-

Proteins. Denkbar wäre z.B. eine zunehmende Dysfunktion benachbarter Zellen durch Aufnahme des defekten Proteins, ähnlich wie man sich den Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen wie des M. Parkinson vorstellt (23).

6. Zusammenfassung

Morbus Fabry ist eine x-chromosomal vererbte lysosomale Speicherkrankheit bei der die Patienten unter diversen Organmanifestationen leiden. Die Ursache der Krankheit ist ein Defekt in dem Gen das für das Enzym α -Galaktosidase A codiert. α -Galaktosidase A baut Sphingolipide ab. Die Patienten haben gar keine oder eine eingeschränkte Funktion der α -Galaktosidase A, mit der Folge, dass die Patienten das Stoffwechselabbauprodukt Globotriaosylceramid in den Zellen einlagern. Die Niere ist eines der stark betroffenen Organe. Die klinische Symptomatik geht bis hin zum Nierenversagen und bedeutet eine starke Einschränkung für die Lebensqualität und das Überleben der Patienten. Podozyten spielen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Pathogenese. Derzeit gibt es aber kein ausreichendes Modell zur Erforschung der Pathogenese von Morbus Fabry in der Niere.

In unserer Arbeitsgruppe wollten wir ein einfaches Modell entwickeln, das eine weitere Forschung ermöglicht. Wir konnten zeigen, dass es möglich ist humane Podozyten mit einer stabilen Herunterregulierung von α -Galaktosidase A zu kultivieren. Per retroviralem Gentransfer wurde shRNA-Konstrukte in die Zellen eingebracht und die Exprimierung der α -Galaktosidase A eingeschränkt. Wir konnten sowohl eine quantitative Verringerung des Enzyms, als auch eine verringerte Aktivität nachweisen. Des Weiteren konnten wir eine Zelllinie etablieren, deren Herunterregulation der α -Galaktosidase A auf einer Trunkation des Enzyms, die einer Patientenmutation entspricht, beruht. Auch entwickelten wir ein Gegenmodell, ebenfalls mit einer Trunkation von α -Galaktosidase A, das eine stark erhöhte Aktivität des Enzyms aufweist.

Die neuen Zelllinien bieten in Zukunft ein Modell zur Erforschung der molekularen Mechanismen der Pathogenese von Morbus Fabry in Podozyten und bieten vielleicht neue Möglichkeiten einer Therapieentwicklung.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abe A**, Gregory S, Lee L, Killen PD, Brady RO, et al.: Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation. *J Clin Invest* 2000; 105: 1563–1571.
2. **Adler S.**: Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *Am J Pathol* 1992; 141: 571-578
3. **Alroy J.**, Sabnis S., Kopp J.B.: Renal pathology in fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:S134-S138
4. **Anderson W.**: A case of angiokeratoma. *BR J Dermatol* 1898; 18:113-117
5. **Barison L.**, Mundel P.: Podocyte Biology and the emerging understanding of podocyte diseases. *Am J Nephrol* 2003; 23:353-360
6. **Beck M.**: Agalsidase alfa for the treatment of Fabry disease: new data on clinical efficacy and safety. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Feb;9(2):255-261.
7. **Beck M.**: Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 2010; 62(1):33–40
8. **Benzing, T.**: Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15:1382-1391
9. **Branton M.**, Schiffmann R., Kopp J.B.: Natural history and treatment of renal involvement in fabry disease. *J AM Soc Nephrol* 2002; 13:S139-S143
10. **Brosius F.C.**: Susceptible mice: identifying a diabetic nephropathy disease locus using a murine model. *Kidney international* 2010; 78:431-432
11. **Chevrier M**, Brakch N, Celine L, Genty D, Ramdani Y, et al.: Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy* 6 2010
12. **Christensen EI**, Zhou Q, Sorensen SS, Rasmussen AK, Jacobsen C, Feldt-Rasmussen U, Nielsen R: Distribution of α -galactosidase A in normal human kidney and renal accumulation and distribution of recombinant α -galactosidase A in Fabry mice. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 698–706
13. **Cina DP**, Onay T, Paltoo A, Li C, Maezawa Y, et al.: Inhibition of MTOR Disrupts Autophagic Flux in Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 412–420.
14. **Desnick R.J.**, Ioannou, Y.A. and Eng, C.M. (1995) α -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds.), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 7th ed. McGraw-Hill, New York, 2741–2784.
15. **Desnick R.J.**, Brady R., Barranger J., Collins A.J., Germain D.P., Goldman M., Grabowski G., Packman S., Wilcox W.R.: Fabry disease, an under-recognized multisystemic disorder: Expert recommendation for diagnosis, management, and enzyme replacement therapy. *ANN Intern Med* 2003; 138:338-346
16. **El Dib R.P.**, Pastores G.M.: Enzyme replacement therapy for Anderson-Fabry disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010 May 12; (5):CD006663.
17. **Fabry J.**: Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch Derm Syph* 1898; 43:187-200
18. **Fervenza FC**, Torra R, Warnock DG.: Safety and efficacy of enzyme replacement therapy in the nephropathy of Fabry disease. *Biologics.* 2008;2(4):823-843.

- 19. Feriozzi S.**, Schwarting A., Sunder-Plassmann G., West M., Cybulla M.: Agalsidase alfa slows the decline in renal function in patients with fabry disease. *Am J Nephrol* 2009; 29:353-361.
- 20. Feriozzi S.**, Torras J., Cybulla M., Nicholls K., Sunder-Plassmann G., West M.: The effectiveness of long-term agalsidase alfa therapy in the treatment of Fabry nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2012; 7(1):60-9.
- 21. Fischer EG**, Moore MJ, Lager DJ.: Fabry disease: a morphologic study of 11 cases. *Mod Pathol*. 2006; 19(10):1295-1301.
- 22. Gal A**, Schäfer E, Rohard I.: The genetic basis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis 2006; Chapter 33.
- 23. George S**, Rey NL, Reichenbach N, Steiner JA, Brundin P: α -Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol*. 2013; 23(3):350-7.
- 24. Germain D.P.**: Fabry Disease, *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:30. Review
- 25. Ghildiyal M.**, Zamore P.D.: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009; 10(2):94-108.
- 26. Hartleben B**, Godel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, et al.: Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J Clin Invest* 2010; 120: 1084–1096.
- 27. Haskins ME**, Giger U, Patterson DF., Animal models of lysosomal storage diseases: their development and clinical relevance. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis 2006; Chapter 6.
- 28. Inoki K**, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, et al.: mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. *J Clin Invest* 2011; 121: 2181–2196.
- 29. Karczewska J**, Piwkowska A, Rogacka D, Stepinski J, Angielski S, Jankowski M: Purinergic modulation of glucose uptake into cultured rat podocytes: Effect of diabetic milieu. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 404:723-727
- 30. Lewko B.**, Bryl E., Witkowski JM, Latawiec E, Gołos M, Endlich N, Hähnel B, Koksich C, Angielski S, Kriz W, Stepinski J: Characterization of Glucose Uptake by Cultured Rat Podocytes. *Kidney Blood Press Res* 2005; 28:1–7
- 31. Lidove O**, West ML, Pintos-Morell G, Reisin R, Nicholls K, Figuera LE, Parini R, Carvalho LR, Kampmann C, Pastores GM, Mehta A.: Effects of enzyme replacement therapy in Fabry disease--a comprehensive review of the medical literature. *Genet Med*. 2010; 12(11):668-679.
- 32. Liebau MC**, Braun F, Höpker K, Weitbrecht C, Bartels V, et al.: Dysregulated Autophagy Contributes to Podocyte Damage in Fabry's Disease. *PLoS ONE* 2013; 8(5): e63506. doi:10.1371/journal.pone.0063506
- 33. MacDermot K.D.**, Holmes A., Miners A.H.: Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet*. 2001; 38:769-775

- 34. Maier E.M.**, Osterrieder S., Whybra C., Ries M., Gal A. Beck M., et al.: Disease manifestation and X activation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr* 2006; 95 (Suppl451): 30-38
- 35. Mehta A.**, Clarke JT. R., Giugliani R., Elliott P., Linhart A., Beck M., Sunder-Plassmann G.: Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS – Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* 2009; 46:548-552
- 36. Mehta A.**, West ML, Pintos-Morell G, Reisin R, Nicholls K, Figuera LE, Parini R, Carvalho LR, Kampmann C, Pastores GM, Lidove O.: Therapeutic goals in the treatment of Fabry disease. *Genet Med.* 2010; 12(11):713-720.
- 37. Mizushima N.**, Komatsu M: Autophagy: renovation of cells and tissues. 2011; *Cell* 147: 728–741.
- 38. Motabar O.**, Sidransky E, Goldin E, Zheng W.: Fabry disease - current treatment and new drug development. *Curr Chem Genomics* 2010;4:50-56.
- 39. Mundel, P.**, and Shankland, S. J.: Glomerular podocytes and adhesive interaction with glomerular basement membrane. *Exp Nephrol* 1999; 7: 160-166.
- 40. Mignani R.**, Feriozzi S, Schaefer RM, Breunig F, Oliveira JP, Ruggenti P, Sunder-Plassmann G.: Dialysis and transplantation in Fabry disease: indications for enzyme replacement therapy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010; 5(2):379-385.
- 41. Miyamura N.**, Araki E., Matsuda K., Yoshimura R., Furukawa N., Tsuruzoe K., Shirotani T., Kishikawa H., Yamaguchi K, Shichiri M.: A carboxy-terminal truncation of human α -Galaktosidase in a heterozygous female with fabry disease and modification of the enzymatic activity by caboxy-terminal domain. *Am Soc* 1996; 98:1809-1817
- 42. Najafian B.**, Svarstad E, Bostad L, Gubler MC, Tøndel C, Whitley C, Mauer M.: Progressive podocyte injury and globotriaosylceramide (GL-3) accumulation in young patients with Fabry disease. *Kidney Int.* 2011; 79(6):663-670.
- 43. Nakamura G.**, Maruyama H, Ishii S, Shimotori M, Kameda S, Kono T, Miyazaki J, Kulkarni AB, Gejyo F.: Naked plasmid DNA-based alpha-galactosidase A gene transfer partially reduces systemic accumulation of globotriaosylceramide in Fabry mice. *Mol Biotechnol.* 2008; 38(2):109-19.
- 44. Nelson MP.**, Tse TE, O'Quinn DB, Percival SM, Jaimes EA, Warnock DG, Shacka JJ: Autophagy-lysosome pathway associated neuropathology and axonal degeneration in the brains of alpha-galactosidase A-deficient mice. *Acta Neuropathol Commun.* 2014 Feb 14;2:20.
- 45. Obrador G.T.**, Ojo A., Tadhani R.: End-Stage Renal Disease in Patients with Fabry Disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:144-146
- 46. Oshima T.**, Murray G.J., Swaim W.D., Longenecker G., Quirk J.M., Cardarelli C.O., Sugimoto Y., Pastan I., Gottesman M.M., Brady R.O., Kulkarni A.B.: α -Galactosidase A deficient mice: A model of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 2540–2544
- 47. Pavenstädt H.**, Kriz W., Kretzler M.: cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003; 83:253-307

- 48. Prabakaran T.**, Nielsen R., Larsen J.V., Sørensen S.S., Rasmussen UF., et al.: Receptor-Mediated Endocytosis of α -Galactosidase A in Human Podocytes in Fabry Disease. *PLoS ONE* 2011; 6(9): e25065.
- 49. Prabakaran T.**, Nielsen R., Satchell S.C., Mathieson P.W., Feldt-Rasmussen U., et al.: Mannose 6-Phosphate Receptor and Sortilin Mediated Endocytosis of α -Galactosidase A in Kidney Endothelial Cells. *PLoS ONE* 2012; 7(6): e39975.
- 50. Raats H.M.**, van der Born J., Bakker MA, Oppers-Walgreen B., Pisa B.J., Dijkman H.B., Assmann K.J., Berden J.H.: expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 2000; 156(5):1749-65.
- 51. Robertson G.L.**, Norgaard J.P.: Renal regulation of urine volume: potential implications for nocturia. *BJU International* 2002; 90:7–10.
- 52. Saito S, Ohno K, Sakuraba H.**, Fabry-database.org: database of the clinical phenotypes, genotypes and mutant α -galactosidase A structures in Fabry disease. *J Hum Genet.* 2011 Mar 17.
- 53. Saleem M.A.**, O'Hare M.J., Reiser J., Coward R.J., Inward C.D., Farren T., Xing C.Y., Ni L., Mathieson P.W., Mundel P.: A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13(3):630-8.
- 54. Schaefer R.M.**, Tyłki-Szymańska A., Hilz M.J., Enzyme replacement therapy for Fabry disease: A systematic review of available evidence. *Drugs.* 2009; 12;69(16):2179-2205.
- 55. Schiffmann R.**, Roscoe O.B.: Development of enzyme replacement therapy for Fabry disease. Kapitel 36 in *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Edited by Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G.; Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006.
- 56. Shabbeer J.**, Yasuda M., Benson S.D., Desnick R.J.: Fabry disease: Identification of 50 novel α -galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Human Genomics* 2006; 2:297-309
- 57. Tesmoingt C.**, Lidove O, Reberga A, Thetis M, Ackaert C, Nicaise P, Arnaud P, Papo T., Enzyme therapy in Fabry disease: severe adverse events associated with anti-agalsidase cross-reactive IgG antibodies. *Br J Clin Pharmacol.* 2009; 68(5):765-769.
- 58. Thomaidis T.**, Relle M., Golbas M., Brochhausen C., Galle P.R., Beck M., Schwarting A.: Downregulation of α -galactosidase A upregulates CD77: functional impact for Fabry nephropathy. *Kidney international* 2009; 75:399-407
- 59. Thurberg B.L.**, Rennke H., Colvin R.B., Dikman S., Gordon R.E., Collins A.B., Desnick R.J., O'Callaghan M., Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int.* 2002; 62(6):1933-46.
- 60. Tryggvason K.**, Pettersson E.: Causes and consequences of proteinuria: the kidney filtration barrier and progressive renal failure. *J Intern Med* 2003; 254: 216–224.
- 61. Valbuena C.**, Oliveira J.P., Carneiro F., Relvas S., Ganhao M., Sá-Miranda M.C., Rodrigues L.G.: Kidney histologic alterations in α -Galactosidase-deficient mice. *Virchows Arch* 2011; 458:477-486
- 62. Vedder AC.**, Breunig F, Donker-Koopman WE, Mills K, Young E, Winchester B, Ten Berge IJ, Groener JE, Aerts JM, Wanner C, Hollak CE: Treatment of Fabry disease with different

dosing regimens of agalsidase: effects on antibody formation and GL-3. *Mol Genet Metab.* 2008 Jul;94(3):319-25.

63. Zampetti A.,Orteu C.H., Antuzzi, D., Bongiorno M.R.,Manco S., Gnarra M., Morrone A., Cardinali G.,Kovacs D., Aspite D.,Linder D., Parini R., Feliciani C.: Angiokeratoma: decision-making aid for the diagnosis of Fabry disease. *British Journal of dermatology* 2012; 166(4):712-722

Anhang 2: Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Proteine des Zell-Zell-Kontaktes zweier Podozyten und mögliche Schädigungsorte	12
Abb. 2 : α -Galaktosidase A Aktivität der Trunkationen	17
Abb. 3: Struktur eines Hairpins am Beispiel des von uns verwendeten Kontrollkonstrukts mirneg	40
Abb. 4: RNA-Interferenz durch siRNA	42
Abb. 5: Luciferase-Assay der Hairpin-Konstrukte	54
Abb. 6: Validierung der shRNA-Konstrukte im Westernblot	55
Abb. 7: Nachweis der Transduktionseffizienz mittels eGFP am Beispiel von mit mirneg (Co shRNA) bzw. shRNA 894 transfizierten HEK293T-Zellen	57
Abb. 8: In einer real-time PCR gemessene relative Expression von α -Galaktosidase A-spezifischer mRNA in Podozyten, die mit shRNA 459 oder shRNA 894 transduziert wurden	58
Abb. 9: Westernblot zum Nachweis der verminderten Proteinexpression von endogener α -Galaktosidase A. Polyklonaler Antikörper aus der Spezies Huhn	59
Abb.10: Westernblot zum Nachweis der verminderten Proteinexpression von endogener α -Galaktosidase A. Polyklonaler Antikörper aus der Spezies Kaninchen	60
Abb. 11: α -Galaktosidase-Aktivitätsassay von Zelllysaten aus undifferenzierten Podozyten bei 33°C, die mit entweder mit dem Hairpin-Konstrukt shRNA 459, dem Hairpinkonstrukt shRNA 894 oder der Kontroll- shRNA mirneg transduziert worden waren	61
Abb. 12: α -Galaktosidase-Aktivitätsassay von Zelllysaten aus differenzierten Podozyten bei 37°C, die mit entweder mit dem Hairpin-Konstrukt shRNA 459, dem Hairpinkonstrukt shRNA 894 oder der Kontroll-shRNA mirneg transduziert worden waren	62
Abb. 13: Westernblot der Zelllysate von HEK293T-Zellen, die transient mit den α -Galaktosidase A Trunkationen Δ KDLL und Y365X transfiziert wurden	65
Abb. 14: α -Galaktosidase A- Aktivitätsassay von Zelllysaten aus differenzierten Podozyten, die mit entweder mit der α -Galaktosidase-trunkation Y365X, Δ KDLL oder der Kontroll-shRNA mirneg transduziert worden waren	66

Anhang 3: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	17
Tabelle 2: Chemikalien und Laborbedarf	17
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	19
Tabelle 4: ECL	21
Tabelle 5: Gel für die Agarosegelelektrophorese	21
Tabelle 6: Gele für die SDS-Gelelektrophorese	21
Tabelle 7: Medien zur Kultivierung von Bakterien	22
Tabelle 8: Medien zur Kultivierung von eukaryoten Zellen	23
Tabelle 9: Enzyme	23
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien und Kits	24
Tabelle 11: Primärantikörper	25
Tabelle 12: Sekundärantikörper	25
Tabelle 13: Plasmide und Vektoren	25
Tabelle 14: Übersicht der PCR-Primer	27
Tabelle 15: Übersicht der Positionen der getesteten Hairpins in der Sequenz von α -Galaktosidase A	28
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten shRNAs	28
Tabelle 17: Bakterien	29
Tabelle 18: Eukaryote Zellen	29
Tabelle 19: Protokoll für einen Versuchsansatz mit KOD-Polymerase	31
Tabelle 20: Standardprogramm für den Thermocycler	32
Tabelle 21: Ansatz für den enzymatischen Verdau des PCR Produkts mit den Restriktionsenzymen mlu und not	33
Tabelle 22: Reaktionsansatz 1: Verdau von pLenti-Konstrukten Restriktionsenzym EcoR V	33
Tabelle 23: Reaktionsansatz 2: Verdau von pLenti-Konstrukten mit den Restriktionsenzymen Xho und Afl II	34
Tabelle 24: Ligationsreaktion	34
Tabelle 25: Thermocyclerprotokoll für DNA-Sequenzierung	38
Tabelle 26: Thermocyclerprogramm für die QPCR	45

Tabelle 27: Pipettierolumina des Umbelliferon-Assays für die Reaktionsansätze für die Zellproben und den Leerwert	47
Tabelle 28: Pipettierolumina des Umbelliferon-Assays für die Eichkurve mit β -Methylumbelliferon	48
Tabelle 29: Signifikanzprüfung der α -Galaktosidase A Aktivitätsmessung der shRNA459 und shRNA894 bei 37°C mittels t-Test	59
Tabelle 30: Signifikanzprüfung der α -Galaktosidase A Aktivitätsmessung der shRNA Y365X bei 37°C mittels t-Test	62
Tabelle 31: Signifikanzprüfung der α -Galaktosidase A Aktivitätsmessung der shRNA Δ KDLL bei 37°C mittels t-Test	63

8. Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Die Ergebnisse aus 4.1-4.2 wurden in Liebau MC, Braun F, Höpker K, Weitbrecht C, Bartels V, et al.: Dysregulated Autophagy Contributes to Podocyte Damage in Fabry's Disease. PLoS ONE 2013; 8(5): e63506. doi:10.1371/journal.pone.0063506 veröffentlicht.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.