Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Charakterisierung des Interaktoms verschiedener Spleißvarianten des Transkriptionsfaktors Wt1 durch stabile Integration in murine Podozyten in vitro

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Katrin Marieke Siebers
aus Mainz

promoviert am 26. Februar 2026

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2026

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. M. Kann
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. H. Grüll

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift 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 Unterstützungsleistungen von folgender Person erhalten:

Priv.-Doz. Dr. Martin Kann

Weitere Personen waren an der Erstellung 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 Dissertationsschrift stehen.

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

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Priv.-Doz. Dr. Martin Kann von mir selbst ausgeführt worden.

Bei der finalen Probenaufbereitung für die massenspektrometrische Analyse wurde ich teilweise von der medizinisch-technischen Assistentin Ruth Herzog unterstützt.

Die proteomische Analyse kultivierter muriner Podozyten wurde zum Großteil von Priv.-Doz. Dr. Martin Kann, PhD Martin Höhne und mir gemeinsam durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 17.11.2025

Unterschrift: .....

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Benzing und Prof. Dr. med. Bernhard Schermer für die Möglichkeit meine experimentelle Doktorarbeit im Nierenforschungszentrum Köln durchführen und dabei wertvolle Erfahrungen in der Forschung sammeln zu können.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Martin Kann, danke ich herzlich für seine wissenschaftliche Betreuung, die geduldige Einführung in die Methodik und Analyse der Proteomik und seine anhaltende Unterstützung bei dieser Arbeit.

Dem gesamten Team des Nephrolabs möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen anregenden Diskussionen danken. Ein besonderer Dank gilt auch meinen Mitdoktorandinnen und -doktoranden für den gemeinsamen Austausch und die vielen schönen Momente im Laboralltag.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich von Herzen für ihre unermüdliche und bedingungslose Unterstützung und ihre Geduld und Liebe zu jeder Zeit.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 8

1. ZUSAMMENFASSUNG 11

2. EINLEITUNG 12

2.1. Podozyten und ihre Bedeutung für die Nierenfunktion 12

2.2. Wilms-Tumor-Suppressorprotein (Wt1) 12

2.3. Nierenerkrankungen und Wt1 14

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit 15

3. MATERIAL UND METHODEN 17

3.1. Klonierungen 17
3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 17
3.1.2. Restriktionsverdau 18
3.1.3. Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung 18
3.1.4. Ligation 19
3.1.5. Gibson Assembly 19
3.1.6. Transformation und Amplifikation von Bakterien 20
3.1.7. Sequenzierung 20
3.1.8. Material für Klonierungen 21

3.2. Zellkultur 24
3.2.1. HEK293T 24
3.2.2. HSMP 25
3.2.3. Material für die Zellkultur 25

3.3. Transfektion 26
3.3.1. Transiente Transfektion mit Calciumphosphat 26
3.3.2. Stabile Transfektion mit TALEN-mediiertem genome engeneering 26
3.3.3. Material für Transfektionen 27

3.4. Ernten und Lysieren von Zellen 28
3.4.1. Material zum Ernten und Lysieren von Zellen 28

3.5. Proteindarstellung im Western Blot 28
3.5.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) 29

3.5.2. Western Blot 29
3.5.3. Coomassie Färbung 29
3.5.4. Material zur Proteindarstellung 29

3.6. Extraktion Genomischer DNA 32
3.6.1. Material für die Extraktion von genomischer DNA 32

3.7. Immunfluoreszenzfärbung (IF) 33
3.7.1. Material für Immunfluoreszenzfärbungen 33

3.8. Immunpräzipitation (IP) 35
3.8.1. Material für Immunpräzipitationen 35

3.9. Massenspektrometrie (MS) 35
3.9.1. Funktionsweise der MS 36
3.9.2. HSMP-Zelllinien für die MS 36
3.9.3. Material für die Massenspektrometrie 37

3.10. Statistik 37

4. ERGEBNISSE 38

4.1. Generierung stabiler Zelllinien 38
4.1.1. Klonierung 39
4.1.2. Transfektion 42

4.2. Validierung der generierten stabilen Zelllinien 44
4.2.1. Whole Cell Lysates 44
4.2.2. Integrations-PCR 45
4.2.3. Immunfluoreszenzfärbung 47
4.2.4. Immunpräzipitation 49
4.2.5. Coomassie Färbung 51

4.3. Ergebnisse der Massenspektrometrie 52
5.3.1 LFQ-Intensitäten 52
5.3.2 PCA 54
5.3.3 Volcano-Plots 55

5. DISKUSSION 61

5.1. Stand der Forschung 61

5.2. Methodendiskussion 62
5.2.1. Zelllinien 62

5.2.2. TALEN-mediierte Genom-Integration 62
5.2.3. Massenspektrometrie 63

5.3. Ergebnisdiskussion 63
5.3.1. Etablierung und Validierung der Wt1-Zelllinien 63
5.3.2. Proteinexpression und Datenqualität 64
5.3.3. Differenzielle Proteinexpression 64
5.3.4. Bewertung der Signifikanz und methodische Grenzen 65
5.3.5. Bedeutung identifizierter Protein-Kandidaten 65

5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick 66

6. LITERATURVERZEICHNIS 68

7. ANHANG 73

7.1. Abbildungsverzeichnis 73

7.2. Tabellenverzeichnis 73

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bGH	Bovine groth hormone
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Cdh1	Cadherin-1
CMV	Cytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddH_2O	Double distilled water
DDS	Denys-Drash-Syndrom
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiotreitol
e. Coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemo Luminescence
Ex	Exon
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal bovine serum
FDR	False Discovery Rate
FoxC2	Forkhead box protein C2
FS	Frasier-Syndrom
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde/n
HEK	Human embryonic kidney
HSMP	Heat sensitive mouse podocytes
IAA	Iodacetamid
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IFN-γ	Interferon Gamma
Ift3	Interferon-induced transmembrane protein 3
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
ITR	transposon-specific inverted terminal repeats
kb	Kilo-Basen
kDa	KiloDalton (1.000 Dalton)

Kdelc1	KDEL motif-containing protein 1
KTS	Aminosäuren Lysin (K), Threonin (T), Serin (S)
Letm1	LETM1 and EF-hand domain-containing protein 1
LFQ	Label-Free Quantification
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
mA	Milliampere
MCS	Multiple Cloning Site
MEACHS	Meacham-Syndrom
MESOM	Malignes Mesothelioma
Min	Minute/n
MS	Mass Spectrometry / Massenspektrometrie
Naga3	Alpha-N-acetylgalactosaminidase-like protein 3
NDS	Normal donkey serum/Eselserum
NEB	New England Biolabs
NPHS1	Nephrin
NPHS2	Podocin
NPHS4	Nephrotisches Syndrom 4
Nr.	Nummer
ori	Origin of replication / Replikationsursprung
Pax-2	Paired box gene 2
PBS	Phosphat buffered saline
PCA	Principale Component Analysis / Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF-α	Platelet-derived growth factor α
PFA	Paraformaldehyd
Pno1	Partner of NOB1 Homolog
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QC	Quick change
RFP	Red Fluorescent Protein
RIPA	Radio immunorprecipitation assay
RNA	Ribonucleic Acid
ROSA26	Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
Scel	Sciellin
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Snail1	zinc finger protein SNAI1
Spp1	Osteopontin OPN
SYNPO	Synaptopodin
TALEN	Transcription Activator-like Effector Nucleases
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF-β1	Transforming growth factor β1
Tjp1	Tight Junction Protein 1
V	Volt
W	Watt
WAGR	Wilms-Tumor, Aniridie, Fehlbildungen, Retadierung
Wnt4	Wnt family member 4
Wt	Wilms-Tumor
Wt1	Wilms-Tumor-Suppressorprotein 1

1. Zusammenfassung

Das Wilms-Tumor-Protein (Wt1) spielt als Transkriptionsfaktor eine tragende Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems und als Tumorsuppressor. Es reguliert die Expression zahlreicher Gene und steht vermutlich mit zahlreichen anderen Proteinen in Wechselwirkung.[1,2] Wt1 existiert in vier Isoformen durch das Vorhandensein oder Fehlen von Exon 5 und den Aminosäuren KTS und wird hauptsächlich in den Nieren von Podozyten gebildet.[3]
Mutationen im Wt1-Gen haben zahlreiche Nierenerkrankungen zur Folge und münden nicht selten in einer Dialysepflichtigkeit oder terminalen Niereninsuffizienz.[4] Ebenso sind diverse Fehlbildungen des Urogenitaltraktes Konsequenz aus Mutationen des Wt1-Gens.[5,6]

Für diese Arbeit wurde deshalb ein neuer, modular aufgebauter Vektor mittels TALEN-mediierter Genom-Integration kloniert, der die zielgerichtete und effiziente Generierung stabiler Zelllinien ermöglicht. Durch sein Design kann er durch wenige Klonierungsschritte auf nahezu jedes Protein modifiziert werden und stellt damit ein vielseitiges Werkzeug dar, das im nephrologischen Forschungslabor über diese Arbeit hinaus bereits genutzt werden konnte.
Für diese Arbeit wurden vier Podozyten-Zelllinien für die Überexpression der Wt1-Isoformen und eine Kontrolllinie mit RFP generiert und in verschiedenen Experimenten validiert. Immortalisierte Podozyten werden weltweit zur in-vitro Forschung in der Zellkultur genutzt und stellen ein wichtiges Werkzeug zur Sammlung grundwissenschaftlicher Erkenntnisse dar.
In dem anschließenden massenspektrometrischen Experiment konnten Daten für das Wt1-Interaktom erhoben werden. Einzelne Proteine, wie Spp1, SCEL, Zo-1 oder Pno1 zeigten Expressionsunterschiede zwischen den Bedingungen. Da klassische Signifikanzschwellen nicht erreicht wurden, wurde ein explorativer Cutoff gewählt.
Insgesamt stützen die Ergebnisse die Hypothese auf isoformspezifische Unterschiede im Wt1-Interaktom und dass Wt1 in verschiedenen Spleißvarianten unterschiedliche Funktionen ausübt. Die detektierten Proteine können zudem als Ausgangspunkt dienen für künftige funktionelle Studien zur Rolle von Wt1.

2. Einleitung

Um die Bedeutung von Wt1 einordnen zu können, werden im Folgenden relevante Grundlagen über die Niere und Podozyten, sowie Nierenerkrankungen dargestellt.

2.1. Podozyten und ihre Bedeutung für die Nierenfunktion

Die Niere, als paarig angelegtes Organ, erfüllt wichtige Aufgaben wie Blutfiltration, Aufrechterhaltung des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts sowie Hormonproduktion. Zentrales funktionelles Element ist die glomeruläre Filtrationsbarriere, welche aus fenestriertem Endothel, Basalmembran und Podozyten besteht.

Podozyten sind sternförmige Zellen, die mit ihren Fußfortsätzen die Kapillaren im Glomerulus umgreifen und über die Schlitzmembran eine selektive Filterfunktion gewährleisten. Neben dieser strukturgebenden Funktion spielen Podozyten zudem durch intrazelluläre Adapter- und Strukturproteine eine Rolle in Signaltransduktion und Stoffwechselprozessen.[7,8]

Ein (sekundärer) Podozytenschaden tritt bei nahezu allen chronischen Nierenerkrankungen auf. Zusätzlich gibt es Podozytopathien, bei denen diese Zellen primär geschädigt werden und zu nachhaltigen Problemen führen. In beiden Fällen geht ein Podozytenschaden praktisch immer mit einer Modulation des Transkriptoms einher, was auf die Existenz regulatorischer Faktoren schließen lässt.

Einer der zentralen Transkriptionsfaktoren in Podozyten ist Wt1 (Wilms-Tumor-Suppressorprotein). Wt1 wird beim Podozytenschaden herunterreguliert, Mutationen von Wt1 verursachen hereditäre Podozytopathien und weitere Syndrome mit Nierenschäden, zudem werden Wt1-Zielgene in geschädigten Podozyten deutlich herunterreguliert. Dieser Transkriptionsfaktor ist für die korrekte Funktion der Podozyten daher offensichtlich hochrelevant.

2.2. Wilms-Tumor-Suppressorprotein (Wt1)

Das Wilms-Tumor-Protein (Wt1) ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher Gene reguliert, es kann dabei aktivierende und reprimierende Wirkungen haben. Wt1 spielt zudem eine Rolle bei der Entwicklung des Urogenitalsystems und als Tumorsuppressor. Es wird hauptsächlich in den Nieren von Podozyten gebildet und existiert in verschiedenen Isoformen.[2,9]

Das Wt1-Gen besteht aus 10 Exonen, den Genabschnitten, die nach dem Splicen erhalten bleiben und für Proteine codieren (Abbildung 1A). Durch alternatives Splicing existieren mindestens 36 Transkript-Isoformen, von denen viele in Proteine translatiert werden. Zwei Hauptorte für alternatives Splicing resultieren in vier verschiedenen Isoformen des Wt1-Proteins. Diese haben je nach Isoform eine molekulare Masse von 52-54 kDa und enthalten

vier Zinkfinger[10,11] (Abbildung 1B). Diese Region kann spezifisch an DNA oder RNA binden und findet sich meist bei Transkriptionsfaktoren.[12]
Die vier Isoformen von Wt1 zeichnen sich durch das Fehlen oder Vorhandensein von Exon 5 (17 Aminosäuren) und drei zusätzlichen Aminosäuren zwischen dem dritten und vierten Zinkfinger aus. Bei Letzteren handelt es sich um Lysin, Threonin und Serin, abgekürzt KTS.

Kent et al. (1995) zeigten anhand von Sequenzvergleichen, dass die Insertion von Exon 5 säugerspezifisch ist, während die KTS-Varianten in allen untersuchten Wirbeltierarten detektiert wurden.[13] Ob die Isoform das Exon 5 exprimiert oder nicht, ist zudem gewebespezifisch reguliert. Außerdem konnten Haber et al. (1991) nachweisen, dass die Expression von Exon 5 während der Nierenentwicklung dynamisch variiert.[3]
Auch die Häufigkeit der Isoformen unterscheiden sich, so konnte Morrison et al (2008) nachweisen, dass die Isoform (+Ex5, +KTS) in Podozyten am stärksten exprimiert ist, während (-Ex5, -KTS) am seltensten vorkommt.[6]
Auch funktionell zeigen die Isoformen Unterschiede, so demonstrierte Schnerwitzki et al. (2014), dass -KTS-Isoformen spezifisch an DNA binden und als klassische Transkriptionsfaktoren wirken, während +KTS-Isoformen eine geringere DNA-Bindung besitzen, dafür aber direkt an RNA binden und mit Komponenten des Spliceosoms interagieren.[14]
Diese Daten verdeutlichen, dass die biologischen Aufgaben von Wt1 isoformspezifisch organisiert sind. Es wurde zudem gezeigt, dass Wt1 hoch- und runterregulierende Einflüsse auf die Expression verschiedener Wachstumsfaktoren (PDGF-α, TGF-β1), anderer Transkriptionsfaktoren (FoxC2, Pax-2, Snail1), verschiedener Proteine (Cdh1, NPHS1, NPHS2, SYNPO, Wnt4) und zytoskelettbeeinflussender Proteine ausübt.[2,10,15,16]
Etwa die Hälfte aller podozytenspezifischen Gene sind so direkte Ziele des Transkriptionsfaktors Wt1 und werden isoformabhängig von ihm reguliert.[16]

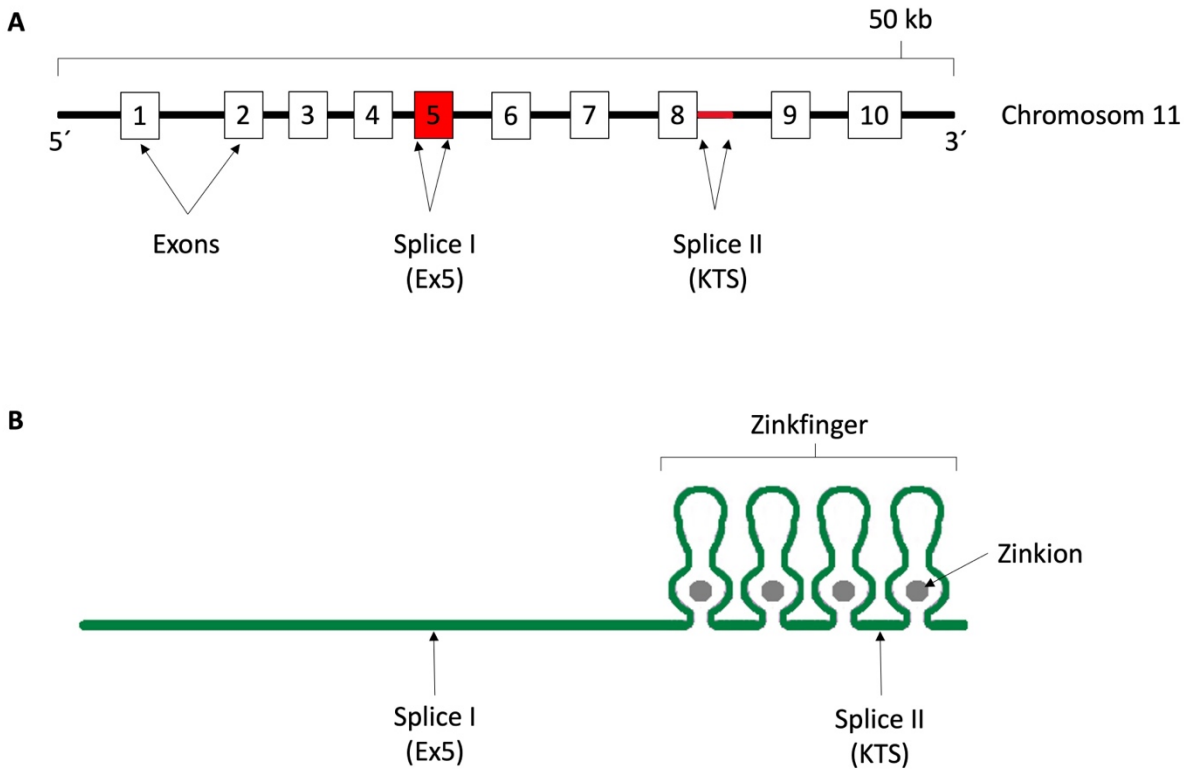


Abbildung 1: Wilms-Tumor-Gen und Wilms-Tumor-Protein

A) Organisation des Wt1-Gens. Es ist beim Menschen auf Chromosom 11 lokalisiert, umspannt 50 kb genomische DNA und besteht aus 10 Exonen. In Rot sind die beiden alternativen Splicestellen hervorgehoben, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

B) Strukturen des Wt1-Proteins. Die aus dem Wt1-Gen resultierenden Wt1-Proteine enthalten vier Zinkfinger, eine Proteindomäne, bei der ein Zinkion gebunden ist und dadurch eine schleifenförmige Struktur der Polypeptidkette verursacht.

2.3. Nierenerkrankungen und Wt1

Chronische Nierenerkrankungen zeigen eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung und können in einer terminalen Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit münden.[4] Zumeist sind sie Folge einer Erkrankung des Glomerulus und seiner Filtrationsbarriere, die aus den drei Kompartimenten fenestriertes Endothel der Kapillaren, Basalmembran und Podozyten besteht.[17] Sind letztere betroffen kommt es häufig zu einem nephrotischen Syndrom mit Proteinurie, Ödemen und Dyslipidämie. Die Podozyten verändern bei Schädigungen ihre Genexpression und aktivieren unter Beteiligung des Zellkerns verschiedene Signalwege. Der Transkriptionsfaktor Wt1 spielt auch hier eine Rolle als Pionier-Transkriptionsfaktor im Wt1-abhängigen Genregulationsnetzwerk der Podozyten.[1]

Mutationen im Wt1-Gen können verschiedene Nierenerkrankungen verursachen, meist gehen sie mit Proteinurie einher und können bis zum terminalen Nierenversagen führen.

Fehlbildungen des Urogenitaltraktes können ebenfalls auf eine Mutation im Wt1-Gen zurückzuführen sein.[5,6]

Folge von Mutationen des Wt1-Gens sind neben dem Wilms-Tumor (WT) beispielsweise das Frasier-Syndrom (FS), das Denys-Drash-Syndrom (DDS), eine Form des Nephrotischen Syndroms (NPHS4), das Meacham-Syndrom (MEACHS) und maligne Mesotheliome (MESOM).[6,18,19]

Das Nephroblastom, auch Wilms-Tumor (WT) nach seinem Entdecker Max Wilms genannt, ist der häufigste maligne Nierentumor im Kindesalter. Der WT geht von embryonalen Geweberesten der Niere aus und wird in 10-15% mit einer Mutation im Wt1-Gen assoziiert. Damit einher geht zudem häufig eine Aniridie, urogenitale Fehlbildungen und eine mentale Retadierung; in diesem Fall spricht man vom WAGR-Syndrom und häufig geht dieses neben einer Mutation in Wt1 auch mit einer Mutation im Pax-6 einher.[6,10,20–22]

Das seltene Frasier-Syndrom (FS) entsteht durch eine Spontanmutation von Wt1 in der Keimbahn (häufig in Intron 9), wodurch es zu einem Mangel der Isoform Wt1(+KTS) und einem Missverhältnis der KTS-Isoformen zueinander kommt. Geht man normalerweise von einem +KTS/-KTS-Verhältnis von 60:40 aus, ändert sich dies auf 40:60. FS ist charakterisiert durch eine unspezifische fokal segmentale Glomerulosklerose, XY-Gonadendysgenesie und einem erhöhten Risiko für Gonadoblastome.[2,16,23,24]

Das Denys-Drash-Syndrom (DDS) zeichnet sich durch diffuse Mesangiosklerose, Genitalfehlbildungen, nephrotisches Syndrom, ein 90 % Risiko für Wilms-Tumoren und durch terminales Nierenversagen in den ersten drei Lebensjahren aus. In den meisten Fällen findet sich eine Punktmutation in der Zinkfingerregion bei Exon 8 oder 9.[2,16,25,26]

Wt1 spielt also bei vielen Nierenerkrankungen eine zentrale Rolle. Dennoch sind die Interaktionspartner von Wt1 bislang nur unzureichend charakterisiert, und insbesondere ist unklar, ob und wie die verschiedenen Isoformen von Wt1 das Interaktom beeinflussen.

2.4. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Wt1 ist ein zentraler Transkriptionsfaktor der Podozyten, der ca. 50 % der rund 200 podozytenspezifischen Gene reguliert und damit eine Schlüsselrolle in Entstehung und Funktion der Nieren spielt. Mutationen im Wt1-Gen verursachen hereditäre Podozytopathien und sind mit verschiedenen Nierenerkrankungen assoziiert.[16]

Studien deuten darauf hin, dass Wt1 in Podozyten einen dominanten Effekt auf das Transkriptom, ein ganzes Netzwerk aus Proteinen und Transkriptionsfaktoren und auf viele Zielgene ausübt.[16] Dieses durch Wt1 kontrollierte Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren und Proteinen ist bisher jedoch wenig erforscht und verstanden. Ebenso ist weitgehend unklar,

inwiefern sich die verschiedenen Wt1-Isoformen in ihrem Interaktom unterscheiden und in dieses Netzwerk integriert sind.[1]

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Interaktome der Wt1-Isoformen in Podozyten zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden stabile Podozytenzelllinien etabliert, die die jeweiligen Wt1-Isoformen überexprimieren, um mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie die Interaktionspartner der Isoformen zu ermitteln. Als methodische Grundlage wurde ein Vektor designt und kloniert, mit dem per Genom-Integration eine stabile Transfektion bestimmter Gene in das Genom von Zellen möglich wird, um transgene Podozytenzelllinien zu generieren. Der Zielvektor wurde so konstruiert, dass durch einfaches Klonieren eine Modifizierung möglich wird und beinahe jedes Protein eingebracht werden kann. Auf diese Weise können geschickt neue stabile Zelllinien etabliert werden und durch Überexpression des jeweiligen Proteins Experimente angeschlossen werden, um das generelle Verständnis vieler Proteine und ihrer Interaktionspartner zu erweitern.

Auf diese Weise erhobene neue Daten zum Interaktom der Wt1-Isoformen könnten helfen, die Transkriptions- und Regulationsvorgänge in gesunden und kranken Podozyten und damit podozytäre Erkrankungen besser zu verstehen.

3. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit eingesetzten Methoden und dafür verwendeten Materialien beschrieben, auf die im Ergebnisteil zurückgegriffen wird. Auf die methodische Vorgehensweise und den Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte wird dort näher eingegangen (schematische Darstellung zur Übersicht im Ergebnisteil Abbildung 2).

3.1. Klonierungen

Das molekulare Klonieren beinhaltet verschiedene Methoden mit dem Ziel bestimmte DNA-Fragmente zu zerschneiden, neu zusammenzusetzen, zu vermehren und letztendlich mit Hilfe einer Träger-DNA in einem Wirtsorganismus zu vervielfachen.

Bei dieser Träger-DNA handelt es sich um einen Plasmidvektor. Plasmide sind kleine, ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle in Bakterien, die extrachromosomal gelegen sind und selbstständig repliziert werden. Als Wirtsorganismus wurden in diesem Fall kompetente E. coli Bakterien (DH-10) verwendet.

3.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung eines vordefinierten Nukleinsäure-Fragmentes in vitro.[27]

Dieser zu amplifizierende DNA-Strang wird mit weiteren Reagenzien (Tabelle 1) in einen Thermocycler gegeben und in repetitiven Zyklen spezifischen Temperaturen ausgesetzt (Tabelle 2).

	50 µl Reaktion	**Konzentration**
5x Q5 Reaction Buffer	10 µl	1X
10 mM dNTPs	1 µl	200 µM
10 µM Forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	1 µl	< 1 ng
Q5 Hot Start High-Fidelity-DNA-Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
ddH_2O	32,5 µl	

Tabelle 1: Reaktionsansatz PCR

Verwendete Reagenzien in den jeweiligen Konzentrationen

	Temperatur	Dauer	Wiederholung
Initiale Denaturierung	98 °C	30 Sek	
Denaturierung	98 °C	10 Sek	
Hybridisierung	60 °C	15 Sek	34 x
Elongation	72 °C	60 Sek	
Finale Elongation	72 °C	2 Min	
Kühlung	10 °C	∞	

Tabelle 2: Reaktionszyklus PCR

Zur Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 98 °C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die anschließende Hybridisierung bei 60 °C dient der Anlagerung der Primer an die DNA und bei der abschließenden Elongation bei 72 °C füllt die DNA-Polymerase schließlich die fehlenden Stränge mit Nukleotiden auf. Durch die sich wiederholenden Zyklen ist eine exponentielle Vervielfältigung möglich.

3.1.2. Restriktionsverdau

Nach einer PCR wird ein Restriktionsverdau mit bestimmten Restriktionsenzymen durchgeführt. Diese schneiden an speziellen Stellen innerhalb der DNA, sodass sich die charakteristischen Sequenzen mittels Gelelektrophorese analysieren lassen oder PCR-Produkte für das Klonieren vorbereitet werden können. Der Ansatz wird nach dem Pipettieren für eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

	20 µl Reaktion
Puffer	2 µ
DNA	0,5 µl
Enzym 1	0,5 µl
Enzym 2	0,5 µl
ddH_2O	16,5 µl

Tabelle 3: Reaktionsansatz Restriktionsverdau

Verwendete Reagenzien

3.1.3. Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung

Um die PCR-Produkte im Anschluss an einen Restriktionsverdau zu analysieren, wird eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Hierzu werden 5 µl der Probe auf ein 1 % Agarosegel aufgeladen und neben einem 1-kb-DNA-Marker für 35 Minuten bei 90 Volt nach Größe aufgetrennt. Das Gel enthält Ethidiumbromid als DNA-bindenden Farbstoff, der es ermöglicht die DNA-Stränge bei 302 nm UV-Licht

sichtbar zu machen. Sollen einzelne DNA-Stränge weiterbenutzt werden, kann nach Herausschneiden der Bande aus dem Gel mittels Gene JET Gel Extraction Kit die DNA aufgereinigt und aus dem Gel gelöst werden.
Um die PCR-Produkte für Klonierungen weiterzuverwenden, werden sie unter Zuhilfenahme des Gene Jet PCR Purification Kit aufgereinigt.

3.1.4. Ligation

Mit einer Ligation ist es möglich DNA-Fragmente zu verknüpfen. Dazu werden diese mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut und dann enzymkatalysiert mit einer T4-Ligase verknüpft. Beispielsweise können so DNA-Sequenzen in zuvor durch Restriktionsverdau linearisierte Plasmide eingebracht werden.
Der Reaktionsansatz wird nach dem Pipettieren 30 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 72 °C abgestoppt.

	20 µl Reaktion	**20 µl Kontrolle**
T4 Ligase Buffer	2 µl	2 µl
Vektor	1 µl	1 µl
Insert	4 µl	-
T4 Ligase	1 µl	1 µl
ddH_2O	12 µl	16 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz Ligation

Verwendete Reagenzien

3.1.5. Gibson Assembly

Die Gibson Assembly ist eine weitere Methode zur Klonierung.[28] Die zusammenzufügenden DNA-Fragmente müssen dabei überlappende DNA-Sequenzen besitzen, die zuvor durch eine overlap-PCR angefügt werden können. Inkubiert man dann die Fragmente 30 Minuten bei 50 °C mit Gibson Assembly Mastermix, so verdaut die darin enthaltene Exonuklease die 5´Enden der DNA-Doppelstränge und die nun überhängenden Einzelstränge ergänzen sich gegenseitig. Eine DNA-Polymerase füllt die Lücken auf und schließlich verbindet eine Ligase alle Nukleotide miteinander.
Man stellt den Ansatz auf Eis und schließt die Transformation in DH-10 Bakterien an.

	20 µl Reaktion
Vektor	3 µl
Insert	1 µl
Insert	1 µl

Assembly Master Mix	10 µl
ddH_2O	5 µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz Gibson Assembly

Verwendete Reagenzien

3.1.6. Transformation und Amplifikation von Bakterien

Plasmidvektoren, die durch Klonierung per Ligation oder Gibson Assembly erstellt wurden, können mittels Transformation in Bakterien eingebracht werden. Wenn diese wachsen, vermehren sie auch den Plasmidvektor und DNA-Abschnitte können auf diese Weise sehr häufig vervielfältigt bzw. amplifiziert werden.[29]

Man bringt 2 µl freie DNA, meist ein kloniertes Plasmid, mit 50 µl kompetenten DH-10 Bakterien zusammen. Bei 30 minütiger Inkubation auf Eis wird die fremde DNA aufgenommen, die anschließende 30 sekündige Erhitzung auf 42 °C erhöht die Effizienz, bevor das Gemisch wieder 2 Min auf Eis abgekühlt wird. Zusammen mit 950 µl SOC-Medium inkubiert man den Ansatz 60 Minuten bei 37 °C und 250 rpm auf dem Heizschüttler und streicht 100 µl davon auf einer Agarplatte aus, die mit Ampicillin versetzt ist und so eine Selektion der Plasmid-enthaltenden Bakterien bei 37 °C über Nacht ermöglicht. Am nächsten Tag können mehrere Kolonien aufgenommen und je in 1,5 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert werden. Um die DNA aus den Bakterien zu extrahieren, wird ein MiniPrep Kit verwendet und anschließend mittels Restriktionsverdau, Agarose-Gelelektrophorese und Sequenzierung positive Kulturen identifiziert. Diese können in einer Midiprep in 200 ml LB-Medium weiter vervielfältigt und mittels MidiPrep Kit aufgereinigt werden.

3.1.7. Sequenzierung

Mit der Sequenzierung nach Sanger können Nukleotidabfolgen in DNA-Molekülen bestimmt werden.[30] Beispielsweise lassen sich so neu klonierte Plasmide auf ihre Richtigkeit überprüfen.

Ausgehend von einem bekannten DNA-Abschnitt wird in der PCR ein einzelner Primer verwendet, der so Einzelstränge erzeugt. Es werden fluoreszierende Dideoxynukleotide benutzt, die zum Abbruch der DNA-Stränge führen, so lassen sich unterschiedlich große, fluoreszierende Sequenzen ermitteln, die im Institut für Genetik der Universität zu Köln analysiert werden können.

	10 µl Reaktion
BigDye Sequenzierungspuffer	2 µl
Sequenzierungsprimer (1:100 verdünnt)	2 µl
Plasmid	200 ng

BigDye Terminator v3.1	0,5 µl
ddH_2O	ad 10 µl

Tabelle 6: Reaktionsansatz Sequenzierung

Verwendete Reagenzien

	Temperatur	**Dauer**	**Wiederholung**
Initiale Denaturierung	96 °C	2 Min	
Denaturierung	96 °C	20 Sek	40 x
Hybridisierung	50 °C	10 Sek	
Elongation	60 °C	4 Min	
Kühlung	10 °C	∞	

Tabelle 7: Reaktionszyklus Sequenzierung

3.1.8. Material für Klonierungen

Material	**Hersteller**	**Bestellnummer**
Q5-Polymerase	NEB	M0491L
Q5-Reaktionspuffer	NEB	B9027S
dNTPs	NEB	N0447S
Restriktionsenzyme (AflIII, BglII, EcoRI, HindIII, MluI, NotI, NsiI, PacI, SalI) + Puffer	NEB	-
1 % Agarose Gel in TAE-Puffer:	Sigma	A9539-500G
20 mM Tris	Roth	A411
0,06 % Eisessig	Roth	3738
1 mM Na_2EDTA	Sigma	E5134-50G
0,00005 % Ethidiumbromid	Roth	HP47.1
1-kb-DNA-Marker	ThermoScientific	11823963
Gene JET Gel Extraction Kit	ThermoScientific	K0692
Gene JET PCR Purification Kit	ThermoScientific	K0701
T4 DNA Ligase	NEB	M0202L
T4 DNA Ligase Puffer	NEB	B0202S
Gibson Assembly Mastermix	NEB	E2611S
DH-10 Bakterien	ThermoScientific	12331013
SOC-Medium: 2% Bacto(TM)-Trypton (Difco) (w/v)	MP Biomedicals	91079-40-2

0,5% Hefe-Extrakt (w/v)	Roth	2363.1
2,5 mM KCl	Roth	6781.1
10 mM NaCl	Roth	9265.1
20 mM D-Glucose	Sigma	G8270-1KG
10 mM MgCl2	Roth	KK36.1
Ampicillin-Agar-Platten	Nephrolabor	-
LB-Medium	Roth	X964.1
MiniPrep Kit	Qiagen	27104
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel	740410
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ThermoScientific	4337455

Tabelle 8: Material für Klonierungen

Verwendete DNA-Konstrukte

Name	**Insert**	**Tag**	**Vektor**	**Herkunft**
pDonor MCS Rosa26	MCS		pZDonorAAVS1	Addgene (37200)
3xFL.eRFP pcDNA6	RFP	Flag	pcDNA6	Nephrolabor
3xFlag.hPodocin PiggyBac – Dual	Podocin	Flag	PiggyBac	Nephrolabor
Rosa26_TV_CMV-3xFL-mRuby-STOP_EF1a-Puro-T2A-copGFP	RFP	Flag GFP	pcDNA6 PiggyBac	Für diese Arbeit kloniert
3xFlag.mWt1 FL -KTS -Ex5 pcDNA6	Wt1	Flag	pcDNA6	Nephrolabor
3xFlag.mWt1 FL -KTS +Ex5 pcDNA6	Wt1	Flag	pcDNA6	Nephrolabor
3xFlag.mWt1 FL +KTS +Ex5 pcDNA6	Wt1	Flag	pcDNA6	Nephrolabor
3xFlag.mWt1 FL +KTS -Ex5 pcDNA6	Wt1	Flag	pcDNA6	Nephrolabor
Rosa26_TV_CMV-3xFL-Wt1(-exon 5, -KTS) _EF1a-Puro-T2A-copGFP	Wt1	Flag GFP	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
Rosa26_TV_CMV-3xFL-Wt1(+exon 5, -KTS) _EF1a-Puro-T2A-copGFP	Wt1	Flag GFP	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert

Rosa26_TV_CMV-3xFL-Wt1(+exon 5, +KTS) _EF1a-Puro-T2A-copGFP	Wt1	Flag GFP	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
Rosa26_TV_CMV-3xFL-Wt1(-exon 5, +KTS) _EF1a-Puro-T2A-copGFP	Wt1	Flag GFP	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
TALEN-mROSA26 KKR	TALEN-ROSA26		phRL-SV40	Addgene (60025)
TALEN-mROSA26 ELD	TALEN-ROSA26		phRL-SV40	Addgene (60026)

Tabelle 9: Verwendete DNA-Konstrukte

Verwendete Primer

Zielsequenz	**Bezeichnung**	**Sequenz**	**Hersteller**
pcDNA6	pcDNA6_same_fwd	ctccagtctttctagagttaattaaGGCGTTTTGCGCTGCTTC	IDT
pcDNA6	pcDNA6_same_rev	ccttagatcatgcatAGCTGGTTCTTTCCGCCTC	IDT
PiggyBac	PiggyBac_Puro2AGFP_same_fwd	aaccagctatgcatGATCTAAGGATCTGCGATC	IDT
PiggyBac	PiggyBac_Puro2AGFP_both_rev	ccatctgccgccccgcttaagAACCCAGTTTGGGAACAC	IDT
Wt1	Wt1_fl_fp_MluI	CGCGGG ACGCGT ATGGACTTCCTCCTGTCGCAGGAGC	IDT
Wt1	Wt1_fl_rp_NotI	CGCGGG GCGGCCGC TCAAAGCGCCAGCTGGAGTTTGGT	IDT
RFP	HR120PR1 RFP f MluI	TAT TAC GCG TAT GGC CAG CTC CGA GGA TGT CA	IDT
RFP	HR120PR1 RFP r STOP NotI	TAT TGC GGC CGC TCA TCC AGC GCC TGT GCT ATG T	IDT
Sequenzierungsprimer:			
Wt1	Wt1_seq_600rev	GGT GAA GGC GCT CAG GCA CTG	IDT

Rosa26TV	Rosa26TV_forward	GAG TTC TCT GCT GCC TCC TG	IDT
Rosa26TV	Rosa26TV_reverse	CCG ACA AAA CCG AAA ATC TG	IDT
PiggyBac	PiggyBac f BglII EF1a-Puro-T2A-GFP-Sv40pA	TAT TAG ATC TAA GGA TCT GCG ATC GCT CC	IDT
PiggyBac	PiggyBac r SalI EF1a-Puro-T2A-GFP-Sv40pA	TAT TGT CGA CAC CCA GTT TGG GAA CAC TGC TG	IDT
pcDNA6	pcDNA6 (-mlu) fsp1	cgt gta cgg tgg gag gtc ta	IDT
pcDNA6	pcDNA6 (-mlu) rsp 1	agg aaa gga cag tgg gag tg	IDT
pcDNA6	pcDNA6_seq_2	CAG TAC ATC AAT GGG CGT GG	IDT
pcDNA6	pcDNA6_seq_3	CAT CTG TTG TTT GCC CCT CC	IDT
PiggyBac	piggyB_seq_613	AGA TCG AGT GCC GCA TCA	IDT
PiggyBac	piggyB_seq_990	ACA AGA TCA TCC GCA GCA AC	IDT
PiggyBac	piggyB_seq_1390	TAT GAC CGA GTA CAA GCC CA	IDT
PiggyBac	piggyB_seq_1790	CCA GGG CAA GGG TCT GGG	IDT

Tabelle 10: Verwendete Primer

3.2. Zellkultur

Beim Umgang mit Zellen wurde stets auf sterile Bedingungen geachtet. So wurde unter einem sterilen Abzug und mit steril filtrierten Lösungen gearbeitet. Die Arbeitsfläche der Werkbank und alle darauf verwendeten Gegenstände wurden vor und nach der Verwendung mit Ethanol (70 %) desinfiziert.

Die verwendeten Zelllinien (HEK293T und HSMP) wurden in 10 cm-Schalen in einem befeuchteten Brutschrank bei 5 % CO_2 kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS mittels 1 ml Trypsin für zwei Minuten inkubiert, sodass die Zellen mit Verlust der Adhärenz durch Zugabe des jeweiligen Mediums leicht gelöst und im Verhältnis 1:6 in 10 cm-Schalen oder 12-well-Platten mit Glasplättchen aufgeteilt werden konnten.

3.2.1. HEK293T

HEK293T-Zellen sind abgeleitet von humanen embryonalen Nierenzellen, die eine Mutation des SV40 large T Antigen durch stabile Transfektion enthalten.[31] Dadurch zeichnet die Zelllinie sich durch eine besonders effiziente Transfizierbarkeit mittels Plasmid-DNA, die den SV40

Replikationsursprung enthalten, aus. So kann eine große Anzahl an Protein von den Zellen produziert werden.

Die Zellen werden in Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM) mit Zusatz von 10 % Kälberserum in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 in 10 cm Zellschalen kultiviert.

3.2.2. HSMP

HSMP-Zellen (Heat sensitive mouse podocytes) sind isolierte Podozyten aus der H-2Kb-tsA58 transgenen Maus.[32] Sie beinhalten ein thermosensibles SV40 large tumor antigen und sind dadurch bei 33 °C immortalisiert, während sie bei 37 °C terminal differenzieren.[33]

Die Zellen werden in RPMI-1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute) mit Zusatz von 5 ml 1M HepesPuffer, 5ml 100mM Natrium Pyruvat und 10% Kälberserum kultiviert. Die 10 cm Zellschalen werden mit Kollagen A beschichtet und je INF-γ hinzugefügt um eine zusätzliche Expression des SV40-Antigens, das unter der Kontrolle einer MHC-Klasse 1-Promotors liegt, herbeizuführen.[34]

3.2.3. Material für die Zellkultur

Material	**Hersteller**	**Bestellnr.**
HEK293T-Zellen (humane embryonale Nierenzellen)	Prof. Dr. B. Seed	-
HEK293T Kulturmedium:		
DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)	ThermoScientific	31966
10% Kälberserum	Biochrom AG	S0115
HSMP (Wärme-sensible Mauspodozyten)	Prof. Dr. Stuart J. Shankland	-
HSMP Kulturmedium:		
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma	61870
5 ml 1M HepesPuffer		
5ml 100mM Natrium Pyruvat	Sigma	D6421
10% Kälberserum	Sigma	S8636
	Biochrom AG	S0115
Ethanol	Roth	5054
PBS Puffer:		
136 mM NaCl	Roth	9265.1
2,7 mM KCl	Roth	6781.1
6,25 mM Na2HPO4	Merck	1065860500
1,5 nM KH2PO4	Merck	1048730250

pH 7,4		
Trypsin EDTA	ThermoScientific	R001100
Zellschalen für HEK293T	Corning	10445102
Zellschalen für HSMP	Corning Primaria	353803
Stripetten (5 ml, 10 ml, 15 ml, 30 ml)	Corning	-
Pipettenspitzen	Sarstedt	-
IFN-γ	ThermoScientific	PHC4031
Kollagen A	Biochrom AG	L7220

Tabelle 11: Material für die Zellkultur

3.3. Transfektion

Die Transfektion bezeichnet verschiedene Methoden zur Einbringung fremder DNA oder RNA in eukaryote Zellen. Es lässt sich zwischen der vorübergehenden, transienten und dauerhaften, stabilen Transfektion unterscheiden. Bei ersterer wird das Plasmid kurzweilig in die Wirtszelle eingebracht und nach einiger Zeit von dieser wieder abgebaut, während die stabile Transfektion die DNA dauerhaft in das Zellgenom integriert.

3.3.1. Transiente Transfektion mit Calciumphosphat

Eine transiente Transfektion der HEK293T-Zellen fand mithilfe der Calciumphosphatmethode statt. Dabei wird das zu transfizierende Plasmid an Calciumphosphat gebunden, um von den Wirtszellen aufgenommen werden zu können.[35,36]

In ein 1,5 ml Eppendorfreagenzgefäß werden 5 µg Plasmid-DNA pipettiert, 500 µl 0,25 M $CaCl_2$ hinzugefügt und unter starkem Schütteln auf einem Vortex tropfenweise 500 µl 2x HEBS-Puffer dazugegeben. Davon werden schließlich 970 µl tropfenweise auf eine 10 cm-Schale mit am Vortag passagierten 293T-Zellen pipettiert. Nach sieben Stunden im Brutschrank wird das Medium gewechselt und bis zum Folgetag für die geplanten Versuche inkubiert.

3.3.2. Stabile Transfektion mit TALEN-mediiertem genome engeneering

Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) sind Fusionsproteine, bestehend aus DNA-bindenden Domänen und Endonukleasen. Die spezifischen Domänen sind so konstruiert, dass sie an einen bestimmten DNA-Abschnitt binden und die Endonuklease dort die DNA schneidet. Auf diese Weise können gezielt Gene entfernt (knock-out) oder Fremd-DNA stabil in das Genom integriert (knock-in) werden.[37,38] Letzteres ist möglich durch Transfektion der TALEN-Plasmide und eines Donorplasmids, dieses kodiert für die zu integrierende Sequenz des Transgens und für homologe Sequenzen zum Rosa26 (Reverse Oriented Splice Acceptor, Clone 26) Lokus in Mauszellen. Dieser Rosa26 Lokus zeichnet sich

durch eine starke Transkription von inserierten Genen aus.[39] Durch den Reparaturmechanismus der Zelle wird so an der geschnittenen Stelle mit Doppelstrangbruch das Donorplasmid eingebaut. Das Donorplasmid kodiert zudem für eine Antibiotika-Resistenz, so können die Zellen nach der Transfektion unter dem Antibiotikum selektioniert werden, sodass ausschließlich stabil integrierte Zellen überleben können.[37,40–42]

Für die Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie wurden Wildtyp HSMP-Zellen am Vortag gesplittet, um eine Konfluenz von 60 % zu erreichen. In einem Eppendorfgefäß wird zuvor auf 35 °C erwärmtes Optimem mit 60 µl GeneJuice transfection reagens auf einem Vortex vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden je 5 µg der TALEN-codierenden Plasmide und des Donorvektors hinzugegeben und durch Pipettieren vorsichtig vermischt, sowie weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Tropfenweise wird dann die 10 cm-Schale bedeckt und bei 33 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 14 Stunden wird das Medium gewechselt und am zweiten Tag nach Transfektion kann eine Selektion mit 2 µg/ml Puromycin für 10 Tage begonnen werden.

3.3.3. Material für Transfektionen

Material	**Hersteller**	**Bestellnr.**
Eppendorfreagenzgefäß (1,5 ml)	Sarstedt	72.701
Calciumchlorid (0,25 M)	Roth	A119.1
2x Hepes buffered saline (HEBS):		
50 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid	Sigma	H3375-25G
280 mM NaCl	Roth	9265.1
10 mM KCL	Roth	6781.1
12 mM Dextrose	Sigma	50-99-7
1,5 mM Na_2HPO_4	Merck	1065860500
pH 7,09		
Optimem	Invitrogen	31985062
GeneJuice transfection reagens	Novagen	70967
TALEN-codierende Plasmide:		
TALEN-mROSA26 KKR	Addgene (60025)	-
TALEN-mROSA26 ELD	Addgene (60026)	-
Puromycin	Invivogen	A1113802

Tabelle 12: Material für Transfektionen

3.4. Ernten und Lysieren von Zellen

Um aus den oben genannten Zellen Proteine zu isolieren oder DNA zu extrahieren und für weitere Versuche werden die Zellschalen auf Eis gestellt, das alte Medium abgesaugt und mit 10 ml 4 °C kaltem PBS gewaschen. HEK293T-Zellen lassen sich dann einfach per Auf- und Abpipettieren von der Schale lösen, während für die HSMP-Zellen ein Zellschaber benutzt wurde. Sie werden dann in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C mit 1500 rpm 5 Minuten lang herabzentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abgesaugt und es folgt ein weiterer Waschschritt mit Absaugen des Überstands.

Das Zellpellet lässt sich schließlich in flüssigem Stickstoff schockfrieren oder je nach Versuch in Lysepuffer resuspendieren.

3.4.1. Material zum Ernten und Lysieren von Zellen

Material	**Hersteller**	**Bestellnr.**
PBS Puffer:		
136 mM NaCl	Roth	9265.1
2,7 mM KCl	Roth	6781.1
6,25 mM Na2HPO4	Merck	1065860500
1,5 nM KH2PO4	Merck	1048730250
pH 7,4		
Zellschaber	Corning	10385981
Falcon (15 ml)	Sigma	32119210

Tabelle 13: Material zum Ernten und Lysieren von Zellen

3.5. Proteindarstellung im Western Blot

Im Anschluss an das Ernten der Zellen können die Pellets in 1 ml Lysepuffer, hier wurde modifizierter RIPA-Puffer verwendet, resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert werden. Im Eisbad werden die Proben dann per Ultraschall homogenisiert, erneut herunterzentrifugiert und der Überstand als Lysat 1:1 mit 2xLaemmli-Puffer und DTT gemischt und 5 Minuten bei 95 °C komplett denaturiert. Im Laemmli enthaltenes Natriumduodecylsulfat (SDS) lagert sich an die Proteine an und sorgt so für eine bessere Löslichkeit und für eine Überdeckung der Eigenladung der Proteine durch negative Gesamtladung. Dem Laemmli-Gemisch zugegebenes Dithiotreitol (DTT) spaltet zusätzlich Disulfidbrücken zwischen den Proteinen.

Die Probe lässt sich nun für später schockfrieren oder direkt auf eine SDS-PAGE laden, um daraufhin beispielsweise im Western Blot Proteine darstellen zu können.

3.5.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht eine ladungsunabhängige Auftrennung der Proteine von Stoffgemischen nach deren Größe durch ein elektrisches Feld.[43] Die Proben werden zusammen mit einem Größenmarker auf das Gel aufgetragen, bestehend aus zwei Phasen (Sammel- und Trenngel) und Strom angeschlossen. Die Proteine bewegen sich dann zuerst 30 Minuten bei 70 V, 500 mA und 150 W zusammen im 5 prozentigen Sammelgel; woraufhin sie 1 h 40 Min bei 300 V, 25 mA und 150 W im 10 prozentigen Trenngel nach Größe aufgetrennt werden. Es wird ein Western Blot oder eine Färbung angeschlossen.

3.5.2. Western Blot

Das Gel wird nach der Elektrophorese von der Sammelphase getrennt und kurz im Transferpuffer inkubiert, während eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran in Methanol aktiviert wird. Mit 12 V und 300 W werden die Proteine 1 h elektrophoretisch im Semidry-Verfahren[44] vom Gel auf die Membran übertragen.

Daraufhin inkubiert man die Membran 30 Min bei RT in 5 % BSA (in Waschpuffer) auf einem Schüttler, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blocken. Es folgen dreimal 5 Min Waschschritte bevor die Membran 1 h im Primärantikörper zur Antigen-Antikörper-Bindung inkubiert werden kann, danach wird erneut dreimal gewaschen und die 30 minütige Inkubation im Sekundärantikörper angeschlossen. Dieser richtet sich gegen den F_C-Teil des Primärantikörpers und enthält das Enzym Meerrettich-Peroxidase. Nach weiteren drei Waschschritten wird die Membran mit Enhanced Chemo Luminescence (ECL)-Lösung benetzt, diese enthält Luminol, welches die Meerrettich-Peroxidase detektiert. Diese Lichtreaktion kann mittels Fusion Solo Chemiluminometer Kamera festgehalten werden.

3.5.3. Coomassie Färbung

Im Anschluss an die SDS-PAGE können die Proteine im Polyacrylamid-Gel angefärbt werden. Dazu wird das Gel von der Sammelphase getrennt und direkt in Coomassie-Färbelösung gegeben. Hier wurde InstantBlue staining solution verwendet und nach ca. 15 Min Inkubation bei RT auf einem Schüttler die optimale Färbung erreicht. Der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau lagert sich an basische und aromatische Seitenketten der Aminosäuren an und färbt so unspezifisch alle Proteine an. Das angefärbte Gel lässt sich dann zur Dokumentation abfotografieren.

3.5.4. Material zur Proteindarstellung

Material	Hersteller	Bestellnr.

Modifizierter RIPA-Puffer:		
10 mM Tris pH 8	Roth	A411
1 mM EDTA	Sigma	1233508
0,5 mM EGTA	Sigma	67-42-5
1 % Triton X-100	Roth	3051.3
0,1 % Natrium-Deoxycholat	AppliChem	302-95-4
Protease-Inhibitor	Sigma	P8340
BioRuptor Pico Sonicator	Diagenode	B01060010
2xLaemmli-Puffer:		
150 mM Tris HCl	Roth	9090.1
20 % Glycerol	Sigma	G9012
0,002 % Bromphenolblau	Sigma	115-39-9
0,1 M DTT	Roth	6908
4 % SDS	AppliChem	A2263
pH 6,8		
Sammelgel (5 %):		
1,2 ml 40 % Acrylamid/Bis Solution	Roth	A121.1
3,8 ml H_2O	Nephrolab	-
100 µl APS	Sigma	A3678
15 µl TEMED	Roth	2367.3
5 ml Sammelgel-Puffer		
Sammelgel-Puffer:		
500 mM Tris/HCL	Roth	9090.1
0,4 % (w/v) SDS	AppliChem	A2263
Trenngel (10 %):		
5 ml 40 % Acrylamid/Bis Solution	Roth	A121.1
5 ml H_2O	Nephrolab	-
200 µl APS	Sigma	A3678
30 µl TEMED	Roth	2367.3
10 ml Trenngel-Puffer		
Trenngel-Puffer:		
1,5 M Tris/HCl	Roth	9090.1
0,4 % (w/v) SDS	AppliChem	A2263
Gelkassetten + Probenkämme	Invitrogen	-
Größenmarker	ThermoScientific	LC5615
Laufpuffer:		

192 mM Glycin	Roth	0079.1
0,1% SDS	AppliChem	A2263
25 mM Tris Base	Roth	4855.1
Transferpuffer:		
187 mM Glycin	Roth	0079.1
0,1% SDS	AppliChem	A2263
25 mM Tris Base	Roth	4855.1
15% Methanol	Roth	67-56-1
Waschpuffer:		
90 mM NaCl	Roth	9265.1
9 mM Tris HCl pH 7,5	Roth	9090.1
0,1% Tween-20	Sigma	9005-64-5
PVDF-Membran	Millipore	IPVH00010
Blotting-Papier	VWR	732-0596
BSA (5 % in Waschpuffer)	Sigma	A9418-500G
Enhanced Chemo Luminescence -Lösung:		
100 mM Tris pH 8,5	Roth	A411
1.25 mM Luminol	Sigma	A8511-5G
0,2 mM Coumarinsäure	Roth	9908.1
0,75% H_2O_2	Sigma	H1009
Fusion Solo Chemiluminometer	PeqLab	SL-3500 WL
InstantBlue staining solution	Sigma	ISB1L

Tabelle 14: Material zur Proteindarstellung

Primärantikörper zur Proteindarstellung

Antikörper	**Herkunft**	**Spezifität**	**Verdünnung**	**Hersteller**	**Bestellnr.**
Anti Flag	Kaninchen polyklonal	Tag	1:2.000	Sigma	F7425-.2MG
Anti Flag	Maus monoklonal	Tag	1:1.000	Sigma	F3165-.2MG
Anti V5	Kaninchen polyklonal	Tag	1:1.000	Millipore	V8137-.2MG
Anti Wt1	Kaninchen polyklonal	Human	1:1.000	Santa Cruz	sc-393498
Anti Wt1	Ziege polyklonal	Human	1:1.000	Santa Cruz	sc-393498

Anti Wt1	Maus monoklonal	Human	1:1.000	Santa Cruz	sc-7385
Anti GFP	Maus monoklonal	Tag	1:2.000	Santa Cruz	Sc-9996
Anti Tubulin	Maus monoklonal	ß-Tubulin	1:500	DSHB	E7

Tabelle 15: Primärantikörper

Sekundärantikörper zur Proteindarstellung

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Anti-Kaninchen Ziegen-IgG HRPkonjugiert	Ziege	Kaninchen	1:30.000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
Anti-Maus Ziegen-IgG HRPkonjugiert	Ziege	Maus	1:30.000	Jackson ImmunoResearch	115-035-003
Anti-Ziege Maus-IgG HRPkonjugiert	Maus	Ziege	1:30.000	Jackson ImmunoResearch	115-035-164
Anti-Maus Ziege-IgG light chain specific HRP	Ziege	Maus	1:15.000	Jackson ImmunoResearch	112-035-175
Anti-Kaninchen Ziege-IgG light chain specific HRP	Ziege	Kaninchen	1:15.000	Jackson ImmunoResearch	111-005-003

Tabelle 16: Sekundärantikörper

3.6. Extraktion Genomischer DNA

Um aus den stabil transfizierten HSMP-Zellen die genomische DNA zu extrahieren und dann mithilfe einer PCR die Transfektion, also den Einbau des Wt1-Plasmids, zu überprüfen, wurde das DNeasy Kit benutzt.

3.6.1. Material für die Extraktion von genomischer DNA

Material	Hersteller	Bestellnr.
DNeasy Blood & Tissue Kit	Quiagen	69504

Tabelle 17: Material für die Extraktion genomischer DNA

3.7. Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Mit der Immunfluoreszenzfärbung lassen sich Proteine interzellulär anfärben und ihre Lokalisation detektieren, dazu wird ein epitopspezifischer Primärantikörper von einem fluoreszierenden Sekundärantikörper speziesspezifisch nachgewiesen. Zudem ist es möglich Zellen mit Plasmiden zu transfizieren, die fluoreszenzgekoppelte Fusionsproteine enthalten, welche nach Lichteinwirkung bestimmter Wellenlänge selbst farbiges Licht ausstrahlen.

Zur Expressionskontrolle transient transfizierter HEK-Zellen oder stabiler HSMP-Zelllinien werden diese in 12-well Platten mit Deckgläschen kultiviert und vor der Färbung mit PBS+ (mit 1 mM $MgCl_2$ und 0,1 mM $CaCl_2$) gewaschen und 10 Min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Es folgen drei weitere Waschritte mit PBS+ und die Blockade unspezifischer Epitope mit 5 % Eselserum (NDS) in PBST (PBS+ mit 0,1 % Triton X-100) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Hiernach werden die Zellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit in PBST verdünntem Primärantikörper inkubiert, erneut dreimal gewaschen und in dem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper für 45 Min inkubiert. Es folgen erneut drei Waschschritte mit PBS+ und einmaliges Eintauchen der Deckgläschen in destilliertes Wasser und schließlich das Platzieren auf Objektträgern zusammen mit ProLong Gold + DAPI Medium. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) bindet genomische DNA und macht so die Zellkerne deutlich. Nach einer Trockenzeit von einigen Stunden bei Raumtemperatur können die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop angesehen werden.

3.7.1. Material für Immunfluoreszenzfärbungen

Material	**Hersteller**	**Bestellnr.**
12-well Platten	Corning	CLS3513-50EA
Deckgläschen 18 mm Stärke 1,5	ThermoScientific	10474379
PBS+:		
136 mM NaCl	Roth	9265.1
2,7 mM KCl	Roth	6781.1
6,25 mM Na2HPO4	Merck	1065860500
1,5 nM KH2PO4	Merck	1048730250
1 mM $MgCl_2$	Roth	KK36.1
0,1 mM $CaCl_2$	Roth	CN93.2
pH 7,4		
PFA	Sigma	P6148
NDS	Jackson ImmunoResearch	017-000-001
PBST:		
136 mM NaCl	Roth	9265.1

2,7 mM KCl 6,25 mM Na2HPO4 1,5 nM KH2PO4 0,1 % Triton X-100 pH 7,4	Roth Merck Merck Roth	6781.1 1065860500 1048730250 3051.3
ProLong Gold + DAPI	ThermoScientific	P36931
Axiovert mit Illuminator HXP 200C	Zeiss	200

Tabelle 18: Material für IF

Primärantikörper zur Proteindarstellung

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Anti Flag	Kaninchen polyklonal	Tag	1:500	Sigma	F7425-.2MG
Anti Flag	Maus monoklonal	Tag	1:500	Sigma	F3165-.2MG
Anti Wt1	Kaninchen polyklonal	Human	1:100	Santa Cruz	sc-393498

Tabelle 19: Primärantikörper

Sekundärantikörper zur Proteindarstellung

Antikörper	Herkunft	Spezifität	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
Cy3-AffiniPure Donkey α-Rabbit IgG (H+L)	Esel	Kaninchen	1:250	Jackson ImmunoResearch	711-165-152
Cy5-AffiniPure Donkey α-Rabbit IgG (H+L)	Esel	Kaninchen	1:250	Jackson ImmunoResearch	711-175-152
Cy5-AffiniPure Donkey α-Mouse IgG (H+L)	Esel	Maus	1:250	Jackson ImmunoResearch	715-175-150

Tabelle 20: Sekundärantikörper

3.8. Immunpräzipitation (IP)

Auch mit der IP bedient man sich der epitopspezifischen Antikörperbindung und ist damit in der Lage ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat zu isolieren. Außerdem ist es möglich Proteine, die an das betreffende Protein gebunden sind als Co-Immunpräzipitate zu analysieren.[45,46]

Die transfizierten und mit Wt1 überexprimierten HSMP-Zellen werden zur IP aus je drei 10 cm-Schalen geerntet und das Zellpellet schließlich in 1 ml RIPA-Puffer resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert, per Ultraschall homogenisiert und 15 Minuten bei 4 °C und 1500 rpm herabzentrifugiert. 30 µl des Überstands werden als Lysat abgenommen und 900 µl für die IP verwendet. Hierfür werden 30 µl M2-Beads hinzugegeben und über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. M2-Beads sind kleine, mit murinem IgG gegen FLAG-tag beschichtete, Agarosekugeln, die spezifisch an das FLAG-getaggte Protein binden. Nachdem die Proben viermal mit Lysepuffer gewaschen und herabzentrifugiert werden, kann das überschüssige Lysat mit allen ungebundenen Proteinen abgesaugt werden und in den Proben befinden sich nun Komplexe aus Antikörper, getaggtem Protein und den interagierenden Proteinen. Diese können mittels SDS-Page und Western Blot schließlich nachgewiesen werden.

3.8.1. Material für Immunpräzipitationen

Material	Hersteller	Bestellnr.
Modifizierter RIPA-Puffer:		
10 mM Tris pH 8	Roth	A411
1 mM EDTA	Sigma	1233508
0,5 mM EGTA	Sigma	67-42-5
1 % Triton X-100	Roth	3051.3
0,1 % Natrium-Deoxycholat	AppliChem	302-95-4
Protease-Inhibitor	Sigma	P8340
BioRuptor Pico Sonicator	Diagenode	B01060010
M2-Beads (murin)	Sigma	A2220

Tabelle 21: Material für IP

3.9. Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie (MS) ermöglicht es aus Proben Proteine qualitativ zu identifizieren und zu quantifizieren.

Wird dabei die Gesamtheit aller enthaltenen Proteine zu einem bestimmten Zeitpunkt ermittelt, spricht man von einem Proteom. Es kann das Proteom eines ganzen Lebewesens, eines Gewebes, einer Zelle oder eines Zellkompartiment analysiert werden.[47–49]

Ermittelt man die Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen, nennt sich das Interaktom.[50,51]

3.9.1. Funktionsweise der MS

Die Moleküle einer aufbereiteten Probe werden durch Desorption in eine Gasphase überführt und ionisiert, sodass die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und dem Analysator zugeführt werden können. Dieser trennt und sortiert sie nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). So kann die Zusammensetzung von Substanzen qualitativ und quantitativ bestimmt werden.[47,52,53]

Ein Massenspektrometer ist aufgebaut aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Die Ionenquelle ionisiert die Substanz, sodass der Analysator die Ionen nach m/z trennen kann, der Detektor registriert die Intensität der Ionen.[47]

Hier wurde ein 2 Q-Exactive Plus Orbitrap verwendet, dieses kombiniert ein Quadrupol-Spektrometer als Analysator mit dem Orbitrap-Detektor. Die erzeugten Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und erzeugen Schwingungen, die im Detektor als Signale wahrgenommen werden und in entsprechende m/z-Verhältnisse umgerechnet werden können. Die Ionen werden außerdem durch Stabelektroden geleitet, die eine Selektionierung nach m/z-Verhältnis ermöglichen.[54]

Um die Proben für MS aufzubereiten kann die Bottum-up- oder Top-down-Analyse genutzt werden. Bei ersterer wird die komplette Zell-Protein-Lösung enzymatisch verdaut, aufgetrennt und dann mit dem Massenspektrometer analysiert. Die Top-down-Analyse verwendet intakte Proteine.[52,55]

Um die detektierten Proteine identifizieren zu können, werden in Protein-Datenbankenhinterlegte m/z-Verhältnisse mit einer Software durchsucht und mit den gefundenen Sequenzen verglichen und den betreffenden bekannten Proteinen zugeordnet. Mit der Software Perseus können die Rohdaten ausgewertet werden.[56–58]

3.9.2. HSMP-Zelllinien für die MS

Für die MS-Experimente wurden die generierten murinen Podozytenzelllinien speziell aufbereitet. Es wurden jeweils drei 10 cm-Schalen konfluenter HSMP-Zellen geerntet und vorerst als Pellet bei -80 °C eingefroren. Bevor die Proben bei der Proteomics Core Facility Cologne zur Messung eingereicht wurden, wurden sie zur Aufbereitung je in 1 ml modifiziertem RIPA-Puffer gelöst, 15 Min auf Eis inkubiert, per Sonicator homogenisiert (10 Zyklen, 30 Sec on, 30 Sec off) und eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und 30 µl M2-Beads hinzugegeben und eine Stunde im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Es folgt erneut ein Zentrifugationsschritt und vorsichtiges Abpipettieren des Überstandes. Die Pellets werden dreimal mit modifiziertem RIPA-Puffer gewaschen und

erneut gründlich abgesaugt. Die Pellets werden dann jeweils in 80 µl 6 % SDS in PBS resuspendiert und 5 Min bei 95 °C erhitzt. Anschließend reduziert man mit 10 mM DTT, inkubiert für 30 Min bei RT, alkyliert mit 50 mM IAA, inkubiert erneut 30 Min bei RT in Dunkelheit und zentrifugiert ein letztes Mal für 2 Min bei maximalen rpm. Der Überstand als Probe mit Antikörper, getaggtem Protein (hier Wt1) und interagierenden Proteinen kann dann für die MS-Messung eingeschickt werden, um das Interaktom zu analysieren.

3.9.3. Material für die Massenspektrometrie

Material	**Hersteller**	**Bestellnr.**
Modifizierter RIPA-Puffer:		
10 mM Tris pH 8	Roth	A411
1 mM EDTA	Sigma	1233508
0,5 mM EGTA	Sigma	67-42-5
1 % Triton X-100	Roth	3051.3
0,1 % Natrium-Deoxycholat	AppliChem	302-95-4
Protease-Inhibitor	Sigma	P8340
BioRuptor Pico Sonicator	Diagenode	B01060010
M2-Beads (murin)	Sigma	A2220
4 % SDS in PBS	AppliChem	A2263
DTT	Roth	6908
IAA	Sigma	1003530010
2 Q-Exactive Plus Orbitrap	ThermoScientific	-
MaxQuant Datenbank	Max-Planck-Institut	-
UniProt Software	UniProt Consortium	-
Perseus Software	Max-Planck-Institut	-

Tabelle 22: Material für MS

3.10. Statistik

Für quantitative Auswertungen der Proteom-Daten wurden MaxQuant und Perseus mit Standardeinstellungen verwendet.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dargestellt. Abbildung 2 gibt einen ersten Überblick durch die schematische Darstellung der einzelnen Schritte von Vektorkonstruktion, Zelllinengenerierung, deren Validierung bis zur proteomischen Analyse.

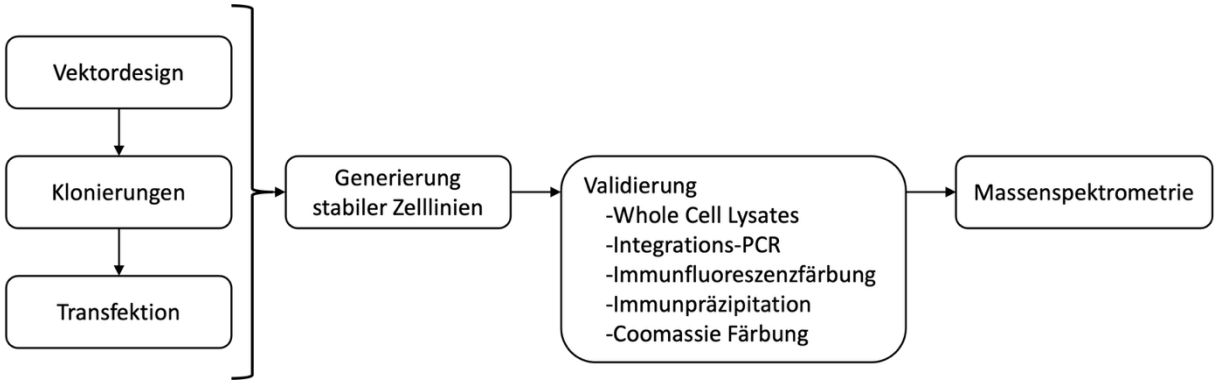


Abbildung 2: Schematische Darstellung des experimentellen Arbeitsablaufs
Grundlegender Aufbau der in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Strategie zur Charakterisierung der Wt1-Isoformen.

4.1. Generierung stabiler Zelllinien

Wt1 ist ein Protein mit vielfältigen Aufgaben und Interaktionspartnern. Um seine Interaktionen mit anderen Proteinen charakterisieren zu können, war das Ziel, stabile Zelllinien zu generieren, die eine Überexpression der vier häufigsten Isoformen von Wt1 ermöglichen. Bei den Isoformen handelt es sich um Wt1(-Ex5, -KTS), Wt1(+Ex5, -KTS), Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS).
Zur gezielten und stabilen Veränderung des Genoms, wurden in den vergangenen Jahren neue bedeutsame Methoden entwickelt. Zu nennen sind dabei das CRISPR-Cas-System und das hier verwendete TALEN-System.[59–61]

Um Wt1 erforschen zu können wurden in dieser Arbeit per TALEN-mediierter Genom-Integration der jeweiligen Wt1-Isoform stabile HSMP-Zelllinien generiert, die eine isoformspezifische Wt1 Überexpression ermöglichen. Bei der Endonukleasen-basierten TALEN-Methode wird an spezifischer Stelle die DNA geschnitten und dort gezielt Gene entfernt oder Fremd-DNA eingebracht.[37,42,60] Durch die integrierte Antibiotika-Resistenz konnten die Zellen daraufhin über zehn Tage auf stabile Integration selektioniert und nach Anzucht über verschiedene Experimente validiert werden.[40]

4.1.1. Klonierung

Zunächst wurde ein funktioneller Zielvektor zur Generierung der stabilen Zelllinien designt, der verschiedene Anforderungen erfüllen sollte (Abbildung 3).

Um das Plasmid in Bakterien transformieren und vermehren zu können war eine Origin of replication (ori), der Replikationsursprung in Bakterien, nötig. Hier wird nach der Transformation des Plasmids in kompetente E. coli Bakterien (DH-10) die Replikation der DNA begonnen.

Außerdem war eine Ampicillinresistenz nötig, die für die Selektion der transformierten Bakterien wichtig ist. Wird der Transformationsansatz auf Agar-Nährboden mit enthaltenem Ampicillin ausgestrichen, so bilden nur die Bakterien mit enthaltenem Plasmid Kolonien.

Weiterhin waren die Rosa26 5´ und 3´ Homologiearme von Bedeutung. Der Rosa26 Lokus befindet sich in Mauszellen und zeichnet sich durch eine starke Transkription inserierter Gene aus.[18] Die Rosa26 Arme des Plasmids dienen somit als homologe Sequenzen zum Einbau des gesamten Plasmids in die Zell-DNA.

Ein weiterer Teil des Plasmids sollte die Multiple Cloning Site (MCS) sein, dies ist ein ca. 50 bp langer DNA-Abschnitt, der mit multiplen Restriktionsschnittstellen für Restriktionsenzyme ausgestattet ist. Somit ist es möglich an dieser Stelle flexibel Fremd-DNA einzubringen und immer wieder aufs Neue zu Klonieren. In diesem Fall wurden als MCS Schnittstellen MluI und NotI verwendet, da dies dem Laborstandard entspricht und einen flexiblen Aus- und Einbau verschiedener Inserts möglich macht.

Als weiterer Vektorbestandteil sollte ein FLAG-tag enthalten sein. Mittels dieser kurzen Aminosäuresequenz lassen sich Proteine markieren durch die Bindung eines Antikörpers. So lässt sich das in die MCS klonierte Protein (beispielsweise Wt1) über Antikörper gegen FLAG per Western Blot oder IF nachweisen und durch Immunpräzipitation anreichern.

Weiterhin war ein GFP, also grün fluoreszierendes Protein, nötig. Unter Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht fluoresziert es grün und kann so sichtbar gemacht werden. Auf diese Weise lässt sich unkompliziert unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrollieren, ob die Zellen den Zielvektor aufgenommen haben und in diesem Fall grün leuchten.[62]

Um durch Überexpression das gewünschte Protein herzustellen sind zudem bestimmte Promotoren von Bedeutung. Diese markieren den Start für die Transkription. Für Bakterien wurde das lac-Operon genutzt, für Zellen ein CMV- und EF1a-Promotor. Am Ende der proteinkodierenden Sequenz wird eine PolyA-Sequenz (aus dem SV40-Virus oder Gen des Rinder-Somatotropins bGH) gesetzt wodurch der Abbau der mRNA verlangsamt wird.

Für die Selektion der transfizierten Zellen musste zudem eine Puromycinresistenz eingebaut werden, diese funktioniert wie die Ampicillinresistenz für Bakterien.

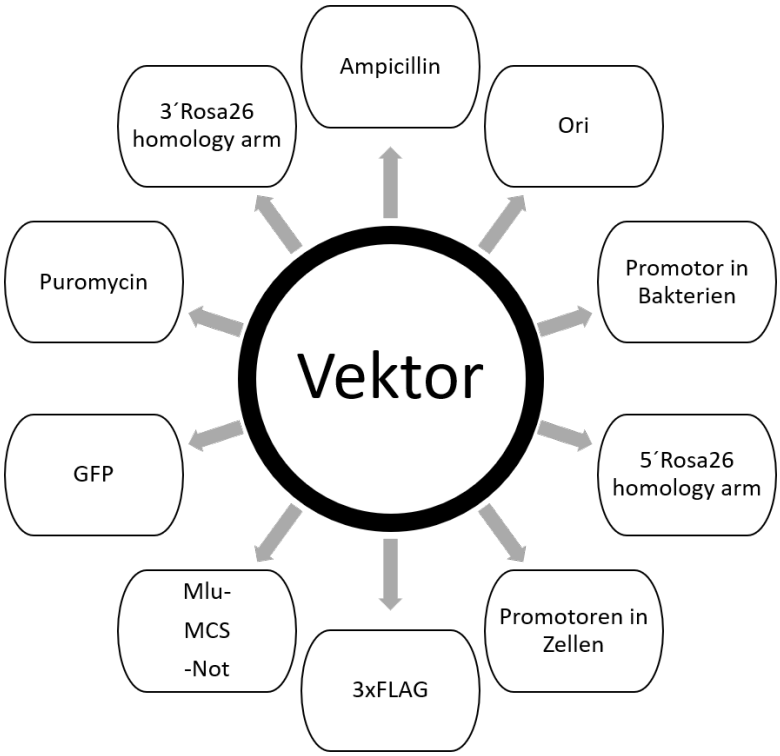


Abbildung 3: Zielvektordarstellung
Schematische Darstellung der Anforderungen an den zu klonierenden Zielvektor zur Generierung stabiler Zelllinien.

Zur Klonierung des geplanten Zielvektors waren schließlich mehrere Schritte nötig, die in Abbildung 4 zur Darstellung kommen und im Folgenden näher erläutert werden.

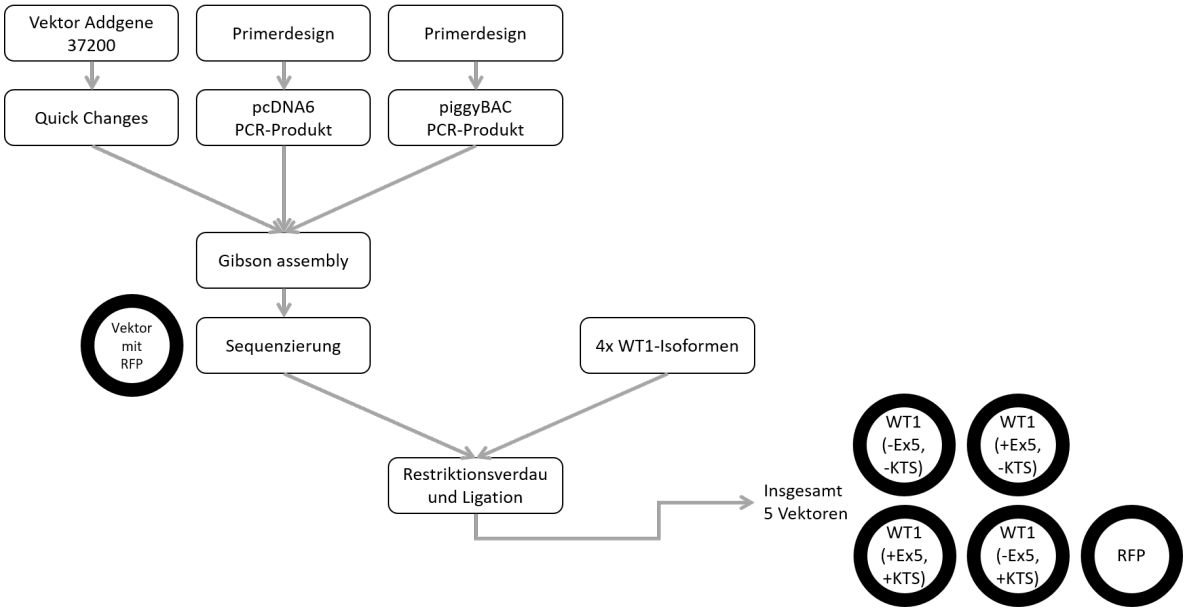


Abbildung 4: Klonierung der fünf Zielvektoren
Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zur Etablierung stabiler Podozytenzelllinien mit Überexpression der Wt1-Isoformen. Ausgangspunkt war der Vektor Addgene 3700, der

mittels Quick-Change-Mutagenese und anschließendem Primerdesign modifiziert wurde. Nach Amplifikation der Insert-Sequenzen (pcDNA6- und piggyBAC-PCR-Produkte) erfolgte die Klonierung über Gibson Assembly und Sequenzierungskontrolle. Durch Restriktionsverdau und Ligation wurden jeweils die vier Wt1-Isoformen sowie RFP für den Kontrollvektor in den Zielvektor integriert.

Als Grundgerüst wurde ein Donorplasmid (Addgene 37200) verwendet.[63] Dieses kodiert für das lac-Operon, den Replikationsursprung (ori) und die Ampicillinresistenz. Zudem beinhaltet es die 3´ und 5´ Homologiearme des Rosa26 Lokus.
Zunächst wurde das Donorplasmid durch vier Quick Changes (QC) an gezielten Stellen durch Punktmutationen modifiziert.[64] Durch den Austausch je einer Aminosäure wurden vier strategisch schlecht lokalisierte Restriktionsschnittstellen für HindIII, KpnI und zwei NotI ausgeschaltet. Bei einer QC PCR werden zwei komplementäre Oligonukleotide benutzt, die je eine aminosäureaustauschende Mutation zum Plasmid beinhalten.
Über dieses per QC mutierte Donorplasmid als Grundgerüst hinaus sollte der Zielvektor weitere Bestandteile beinhalten. Diese wurden mittels Ligationen und Gibson Assembly kloniert.
Für die Expressionskassette des Zielvektors wurden zuerst Primer für das vorbeschriebenen 3xFL.eRFP pcDNA6 Plasmid designt. Per PCR mit den designten Primern wurde dann der gewünschte Plasmidabschnitt um die Expressionskassette vervielfältigt. Darin enthalten waren der CMV-Promotor, eine von MluI- und NotI- Schnittstellen begrenzte MCS mit RFP als enthaltenem Protein und eine bGH polyA-Sequenz. Die gesamte Expressionskassette war von PacI- und NsiI- Schnittstellen begrenzt und kann so aus durch Verdau mit den beiden Enzymen jederzeit aus dem fertigen Vektor problemlos ausgeschnitten werden.
Für die Selektionskassette des Zielvektors wurden ebenfalls Primer designt und auf das vorbeschriebene 3xFlag.hPodocin PiggyBac–Dual Plasmid abgestimmt, um daraus die Selektionskassette per PCR zu vermehren. Flankiert von einer NsiI- und AflII- Schnittstelle zum problemlosen Ausschneiden waren darin enthalten ein EF1a-Promotor, ein GFP, die Puromycinresistenz und eine SV40 polyA-Sequenz.
Aus den drei erstellten DNA-Produkten (Donorplasmid mit QCs, Expressionskassette aus pcDNA6-Plasmid und Selektionskassette aus PiggyBac-Plasmid) wurde per Gibson Assembly der finale Zielvektor erstellt, in dem RFP in die multiple cloning site (MCS) integriert wurde. RFP dient hierbei als fluoreszenter Marker, um die erfolgreiche Integration und Expression des Vektors visuell nachweisen zu können. Gleichzeitig fungiert es als Kontrollprotein in den nachfolgenden Experimenten, da es im Gegensatz zu Wt1, keine bekannte Interaktion mit podozytären Proteinnetzwerken eingeht.

Nach Transformation und Amplifikation in DH-10 Bakterien wurde eine Sequenzierung zur Kontrolle angeschlossen. Dies stellte den Kontrollvektor für die weiterführenden Versuche dar (Abbildung 5).

Nun konnten aus vorbeschriebenen Plasmiden Wt1 in seinen vier Isoformen, sowie RFP aus dem klonierten Kontrollvektor per MluI/NotI-Verdau ausgeschnitten werden und dann per Ligation die jeweilige Wt1-Isoform in den Vektor eingefügt werden. So entstanden zusätzlich zum RFP-Kontrollvektor vier Zielvektoren, die für jeweils eine Wt1-Isoform kodieren.

Das Design des neu klonierten Zielvektors (Abbildung 5), der alle zuvor genannten Bausteine enthält, ermöglicht die zielgerichtete und effiziente Generierung stabiler Zelllinien und kann durch wenige Klonierungsschritte beliebig auf nahezu jedes Protein modifiziert werden. Er stellt somit ein vielseitiges Instrument dar, das bereits über den Rahmen dieser Arbeit hinaus Anwendung gefunden hat.

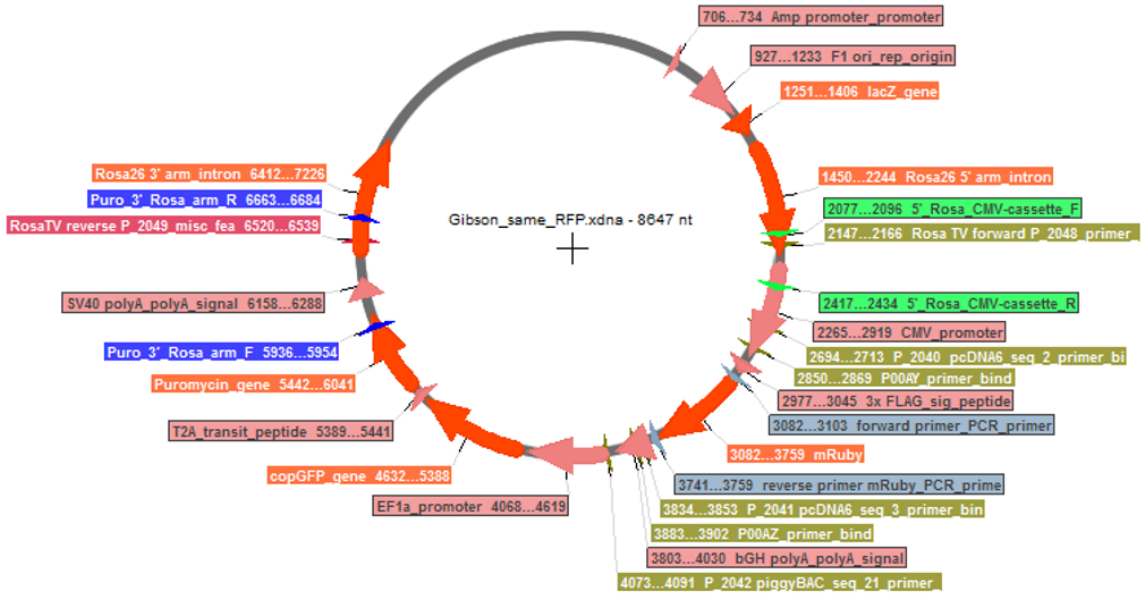


Abbildung 5: Konstruktion des Kontrollvektors „Rosa26_TV_CMV-3xFL-mRuby-STOP_EF1a-Puro-T2A-copGFP“

Schematische Plasmidkarte zur Repräsentation des kreisförmigen DNA-Moleküls. Pfeile zeigen codierende Regionen mit Genen, Promotoren oder regulatorischen Sequenzen und geben zugleich die Leserichtung der Transkription an.

4.1.2. Transfektion

Mit den fünf klonierten Vektoren wurden zum Expressionstest HEK293T-Zellen mit der Calciumphosphatmethode transient transfiziert. Bei Plasmidintegration in die Zellen konnten diese grün fluoreszierend unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden, der Kontrollvektor mit RFP an MCS-Stelle zusätzlich rot fluoreszent.

Im Western Blot (Abbildung 6) werden die Banden für Wt1 je nach Isoform bei 52-54 kDa und für RFP im Kontrollvektor bei 26 kDa erwartet. Im Anti-FLAG Staining ließen sich die Banden jeweils mit FLAG-tag und adäquaten Größenunterschieden nachweisen. Dass die FLAG-markierten Wt1-Banden mit ca. 70 kDa oberhalb der erwarteten Molekülmasse erscheinen, lässt sich durch die durch FLAG veränderte Laufgeschwindigkeit des Proteins im SDS-PAGE erklären. Sowohl die zusätzliche Masse als auch die positive Ladung des FLAG-tags können zu einer verminderten Migration im Gel führen und in einer höher liegenden Bande resultieren. Die Größenunterschiede sind jedoch adäquat und wie zu erwarten.
Es konnte also bestätigt werden, dass die transient transfizierten HEK293T-Zellen die Wt1-Isoformen exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Vektoren keine Fehler im Leseraster aufweisen und die vorgesehenen Proteine wie erwartet exprimiert werden. Als Schlussfolgerung ergibt es also Sinn, mit diesen Vektoren weiterzuarbeiten und eine stabile Transfektion anzustreben.

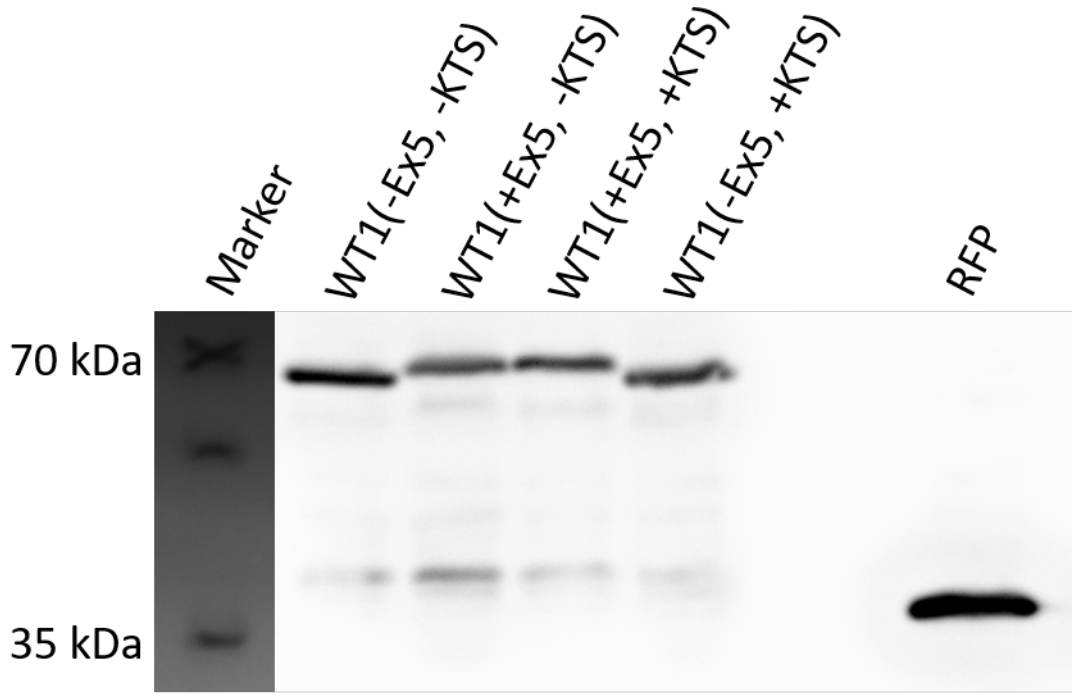


Abbildung 6: Western Blot mit Anti-FLAG-Staining der HEK293T-Zellen, transient transfiziert per Calciumphosphatmethode mit den fünf Vektoren zur Expressionskontrolle

Zur stabilen Transfektion wurden HSMP-Zellen mit TALEN-mediierter Genom-Integration per GeneJuice-Methode mit den fünf Vektoren transfiziert. Um die Zellen mit stabil in das Genom integriertem Plasmid zu selektionieren, wurde die Selektion für zehn Tage unter Puromycin angeschlossen. Auch hier lässt sich zur Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop die grüne Fluoreszenz der transfizierten Zellen erkennen. Sie sind also stabil transfiziert (Abbildung 7A-

E) im Gegensatz zu den HSMP Wildtyp Zellen, die unter Puromycin nicht überleben (Abbildung 7F).

Damit ist die erfolgreiche Transfektion nachgewiesen und im Folgenden kann die Korrektheit der generierten Zelllinien weiter geprüft werden.

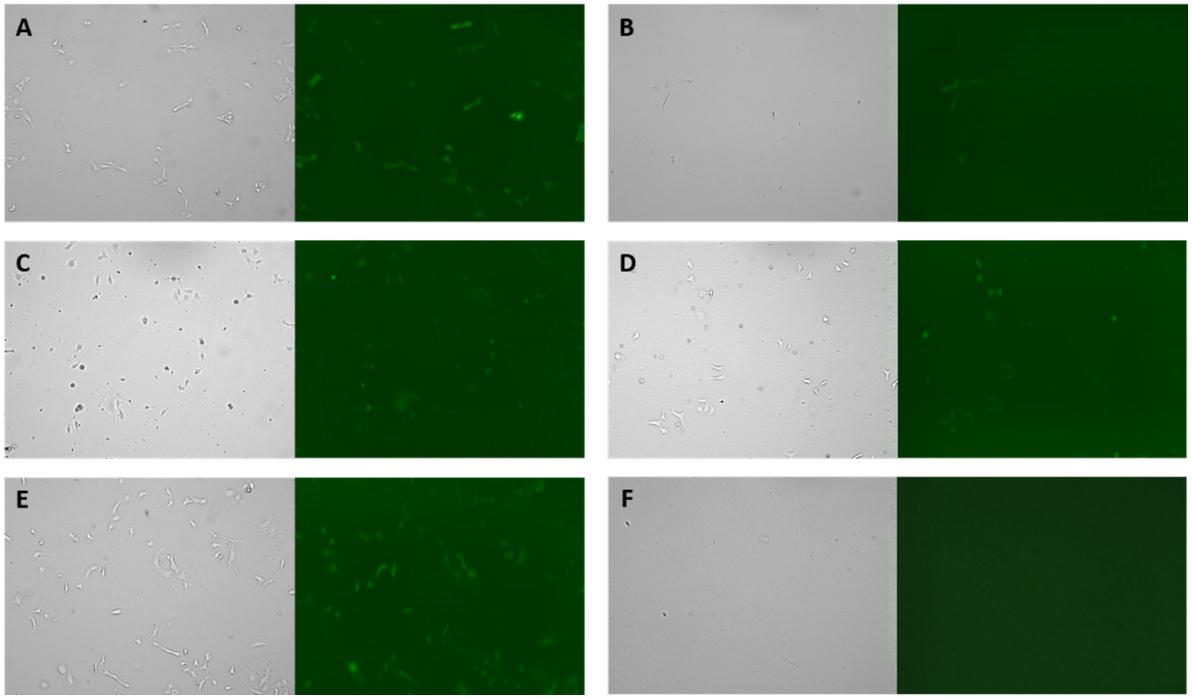


Abbildung 7: HSMP-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop
nach stabiler Transfektion per TALEN-mediierter Genom-Integration mit den fünf verschiedenen Vektoren nach Selektion unter Puromycin. Abgebildet ist jeweils die Lichtmikroskopie links und Fluoreszenzmikroskopie rechts von A) Wt1(-Ex5, -KTS), B) Wt1(+Ex5, -KTS), C) Wt1(+Ex5, +KTS), D) Wt1(-Ex5, +KTS), E) RFP und F) Wildtyp.

4.2. Validierung der generierten stabilen Zelllinien

Um die Korrektheit der generierten Zelllinien weiter zu bestätigen, wurden mehrere Verfahren genutzt.

4.2.1. Whole Cell Lysates

Die HSMP-Zellen wurden 12 Tage nach Transfektion mit den fünf Vektoren per TALEN-mediierter Genom-Integration und nach Selektion unter Puromycin geerntet und lysiert, um sie auf eine SDS-PAGE zu laden und im Western-Blot Proteine darzustellen. Mit einem anti-Wt1 Antikörper wurde dabei das Wt1-Protein detektiert (Abbildung 8A). Mit einem anti-FLAG Restaining konnte ebenfalls Wt1 und das RFP der Kontrolllinie nachgewiesen werden (Abbildung 8B). Das Tubulin-Restaining dient zur Quantifizierung der Proteinexpression (Abbildung 8C). Tubulin fungiert hierbei als interne Referenzkontrolle, da seine Expression in

den untersuchten Bedingungen als stabil angesehen wird. Durch die Normalisierung der Wt1- und RFP-Signale auf die jeweilige Tubulin-Expression wird sichergestellt, dass Unterschiede in der Bandenintensität nicht auf variierende Probenmengen beim Laden der Geltaschen zurückzuführen sind.

Die in Abbildung 8A und B schwächer ausgeprägten Banden für Wt1(-Ex5, -KTS) und Wt1(+Ex5, -KTS) im Vergleich zu den anderen Wt1-Isoformen lassen sich so durch die in Abbildung 8C sichtbare geringere Tubulinmenge erklären.

Die in RFP auffallende Bande auf Wt1-Höhe im Anti-Wt1 Staining könnte durch endogene Expression von Wt1 in HSMP-Zellen begründet werden.

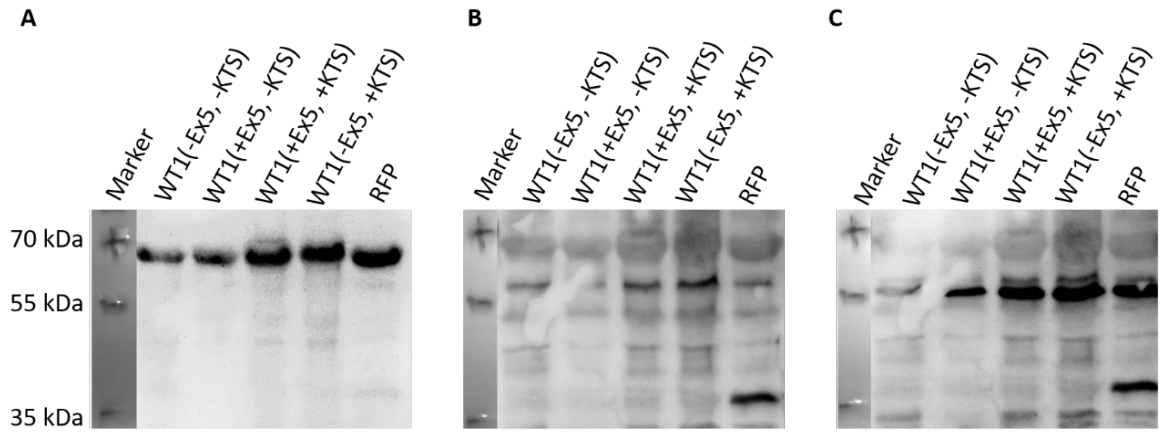


Abbildung 8: HSMP-Zellen im Western Blot
nach Transfektion per TALEN-mediierter Genom-Integration mit den fünf Vektoren und nach Selektion unter Puromycin
A) Anti-Wt1-Staining, Primärantikörper: anti-Wt1 ms monoclonal 1:1000, Sekundärantikörper: a-ms light chain specific (1:15.000)
B) Anti-FLAG-Restaining, Primärantikörper: anti-flag rb polyclonal 1:1000, Sekundärantikörper: a-rb light chain specific (1:15.000)
C) Anti-Tubulin-Restaining, Primärantikörper: anti-Tubulin ms monoclonal 1:500, Sekundärantikörper: a-ms light chain specific (1:15.000)

Die Western Blots bestätigen die Expression von Wt1 in den stabil transfizierten HSMP-Zellen und zeigen eine erfolgreiche Integration des Vektors auf Proteinebene. Im nächsten Schritt wird per Integrations-PCR überprüft, ob der Vektor auch korrekt in das Genom integriert wurde.

4.2.2. Integrations-PCR

Weiterhin wurde zur Validierung der generierten Zelllinien per Integrations-PCR die Integration der TALEN-Inserts in den Rosa26 Lokus dargestellt. Dazu wurden vier Primer designt. Diese

setzen wie in Abbildung 9 gezeigt an den Vektor an und generieren jeweils verschieden große Banden in der PCR bei erfolgreicher Integration ins Genom.

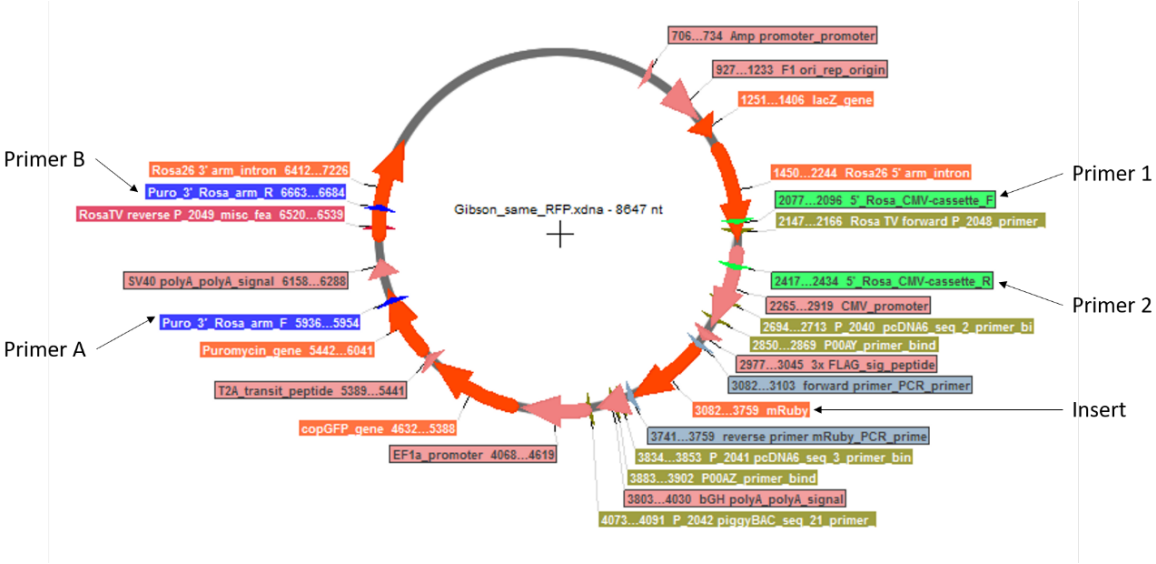


Abbildung 9: Primer-Ansatzpunkte am Vektor für die Integrations-PCR
Es wurden vier Primer designt, diese setzen an den markierten Stellen am Vektor an, sodass in der PCR jeweils verschieden große Banden generiert werden bei erfolgreicher Genom-Integration

Bei erfolgreicher Integration zeigt sich mit dem Primermix 1+2 eine Bande bei 358 bp (Abbildung 10A) und mit dem Primermix A+B bei 750 bp (Abbildung 10B). Die HSMP Wildtyp Zellen zeigen erwartungsgemäß keine PCR-Produkte da keine Integration des Vektors vorliegt.
Mit dem Primermix 1+B (Abbildung 10C) ist bei vollständiger Integration des Vektors kein PCR-Produkt zu erwarten, da der zu amplifizierende Abschnitt zu groß wäre. Jedoch ist ein PCR-Produkt sowohl für die HSMP-Wildtyp Zellen als auch für die Zelllinien mit Vektor-Integration nachweisbar, während es für die Probe mit Targeting Vektor ausbleibt. Dies erklärt sich durch das Vorhandensein mindestens eines Wildtyplokus in der endogenen DNA.
Die Ergebnisse der PCRs bestätigen die erfolgreiche Integration des Vektors.

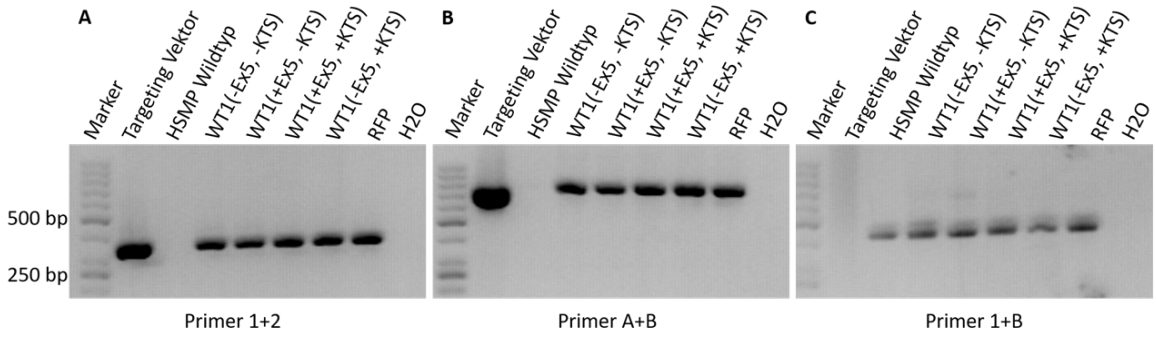


Abbildung 10: Integrations-PCR

des Zielvektors, der fünf TALEN-Zelllinien und Wildtyp-Zellen.

A) Eine erfolgreiche Integration erzeugt in der PCR mit Primer 1+2 eine Bande bei 358 bp, während die HSMP Wildtyp Zellen keine Bande erzeugen.

B) Eine erfolgreiche Integration erzeugt in der PCR mit Primer A+B eine Bande bei 750 bp, während die HSMP Wildtyp Zellen keine Bande erzeugen.

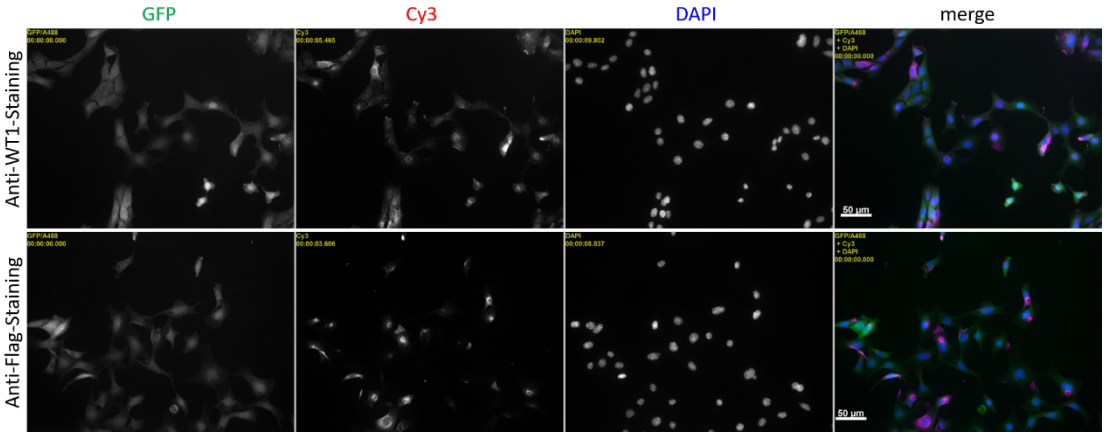
C) In der PCR mit Primer 1+B entstehen die Banden nicht durch die Vektor-Integration, sondern in allen Proben mit endogener DNA.

4.2.3. Immunfluoreszenzfärbung

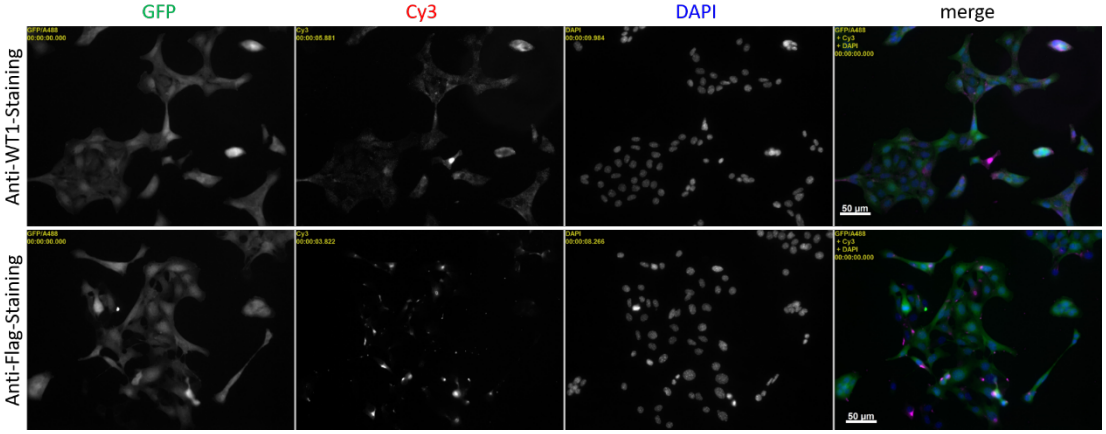
Nachdem die Integrations-PCR und die Western Blots der Whole Cell Lysates Genintegration und Proteinexpression belegt haben, soll nun die Immunfluoreszenzfärbung zusätzliche Informationen liefern zur Proteinlokalisation intrazellulär.

Die stabil transfizierten HSMP-Zellen wurden nach Selektion unter Puromycin für die IF mit einem Primärantikörper (Anti-Wt1- und Anti-FLAG-Antikörper) inkubiert und je mittels fluoreszierendem Sekundärantikörper sichtbar gemacht (Cy3). GFP leuchtet grün. DAPI färbt die Zellkerne blau. Abbildung 11 zeigt, dass GFP und Wt1 überwiegend im oder nahe den Zellkernen (DAPI) lokalisiert ist. Da das Protein Wt1 als Transkriptionsfaktor Aufgaben im Zellkern zur Regulation der Genexpression erfüllt, deckt sich dies mit den Erwartungen.

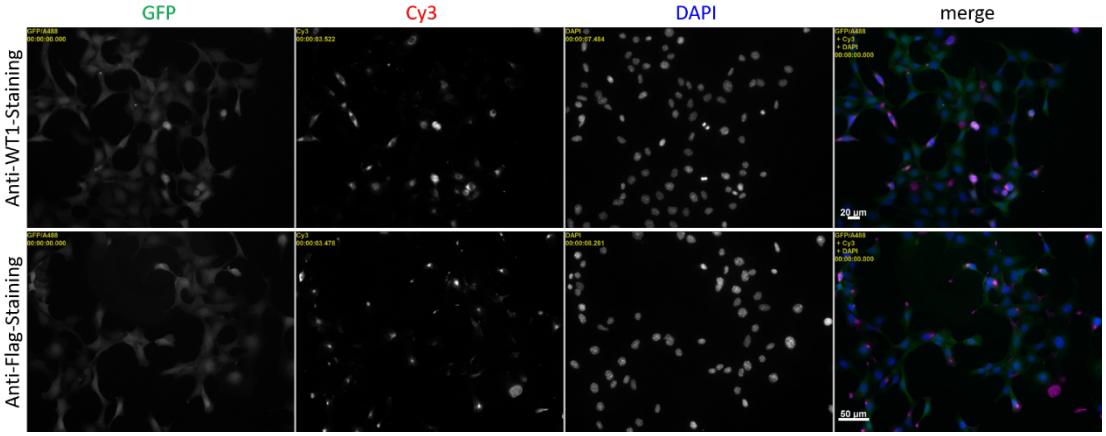
A WT1(-Ex5, -KTS)



B WT1(+Ex5, -KTS)



C WT1(+Ex5, +KTS)



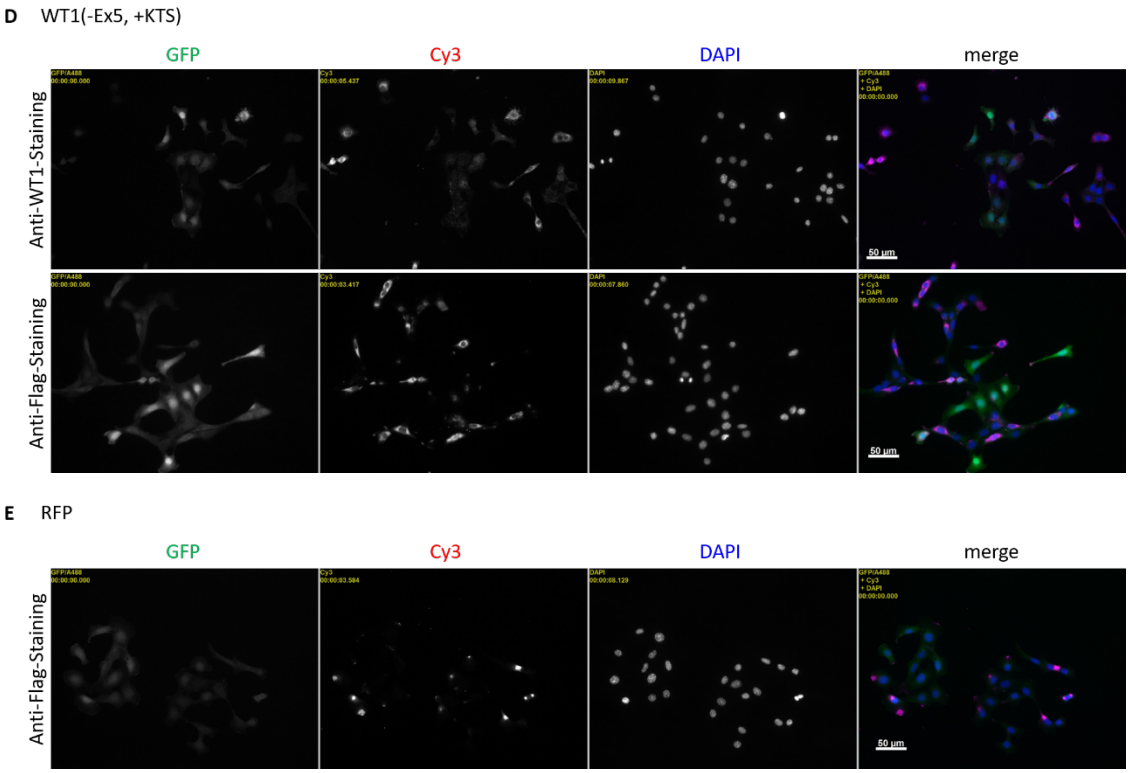


Abbildung 11: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen (20fache Vergrößerung) der Immunfluoreszenzfärbungen der stabil transfizierten HSMP-Zelllinien. Dargestellt sind GFP, Cy3, Zellkerne (DAPI) und das jeweilige Merge der drei Signale für jeweils Anti-Wt1- und Anti-FLAG-Staining für die HSMP-Zellen mit dem Insert der Isoformen A) Wt1(-Ex5, -KTS), B) Wt1(+Ex5, -KTS), C) Wt1(+Ex5, +KTS), D) Wt1(-Ex5, +KTS) und mit E) RFP.

4.2.4. Immunpräzipitation

Zur Analyse der Expression der FLAG-getaggten Wt1-Proteine bzw. des FLAG-getaggten RFP wurde eine Immunpräzipitation (IP) mit M2-Beads durchgeführt. M2-Beads binden spezifisch an das FLAG-tag und das in den Zellen überexprimierte Protein Wt1 bzw. RFP und können im Western Blot nachgewiesen werden.

Die in Abbildung 12A und B dargestellten Ergebnisse der Western Blots zeigen im Anti-Wt1-Staining für die Isoformen Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS) starke Banden im zu erwartenden Größenbereich. Die Spleißvarianten Wt1(-Ex5, -KTS) und Wt1(+Ex, -KTS) weisen dort keine eindeutigen Banden auf, waren also unter diesen Bedingungen nicht ausreichend stabil. Die RFP-Kontrolllinie zeigt wie erwartet eine Bande im Bereich von 26 kDa im Anti-FLAG-Staining für RFP.

Aufgrund der eindeutigen Ergebnisse für die Wt1 Isoformen mit +KTS, wurden ausschließlich diese (und RFP) im weiteren Verlauf berücksichtigt. Die erneut durchgeführte IP dieser Proben ist in Abbildung 12C und D dargestellt und bestätigt unsere Ergebnisse. Auffällig ist, dass die Bande von Wt1(+Ex5, +KTS) leicht oberhalb von Wt1(-Ex5, +KTS) liegt, was auf das

zusätzliche Exon 5 und damit die leicht erhöhte Molekülmasse dieser Isoform zurückzuführen ist.

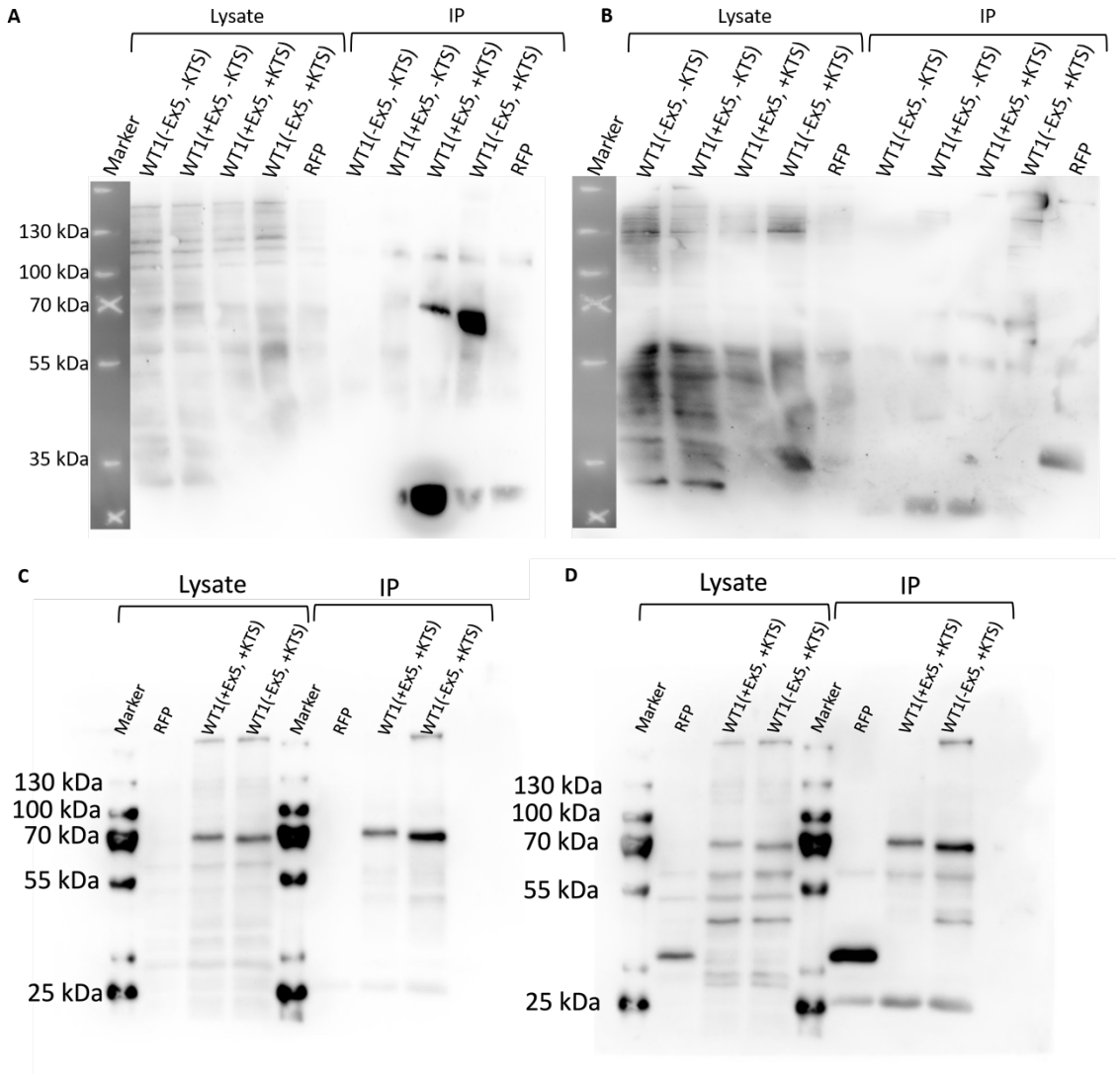


Abbildung 12: Lysate und IP der HSMP-Zellen im Western Blot
nach Transfektion per TALEN-mediierter Genom-Integration mit den fünf Vektoren und Selektion unter Puromycin.
A) Anti-Wt1-Staining, Primärantikörper: anti-Wt1 ms monoclonal 1:1000, Sekundärantikörper: a-ms light chain specific (1:15.000)
B) Anti-FLAG-Restaining, Primärantikörper: anti-flag rb polyclonal 1:1000, Sekundärantikörper: a-rb light chain specific (1:15.000)
C) Anti-Wt1-Staining, Primärantikörper: anti-Wt1 rb monoclonal 1:1000, Sekundärantikörper: a-rb light chain specific (1:30.000)
D) Anti-FLAG-Restaining, Primärantikörper: anti-flag rb polyclonal 1:5000, Sekundärantikörper: a-rb light chain specific (1:30.000)

4.2.5. Coomassie Färbung

Die transfizierten und selektionierten HSMP-Zellen der vielversprechenderen Isoformen Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS) und der RFP-Kontrollzelllinie wurden geerntet, während die Zellkulturen der Isoformen Wt1(+Ex5, -KTS) und Wt1(-Ex5, -KTS) sich nicht als stabil genug erwiesen und daher nicht weiter untersucht wurden.

Die drei geernteten Zelllinien wurden als Lysat- und IP-Proben auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Das Polyacrylamid-Gel wurde in Coomassie-Färbelösung gegeben und so Proteine im Gel unspezifisch angefärbt. Für die IP-Proben zeigen sich Banden für Wt1 und RFP (Abbildung 13).

Die Coomassie-Färbung erlaubt es, die Proteinbanden präziser zu lokalisieren und deren Reinheit und Mengen einzuschätzen. Dies sind wichtige Voraussetzungen für die anschließenden Massenspektrometrischen Analysen.

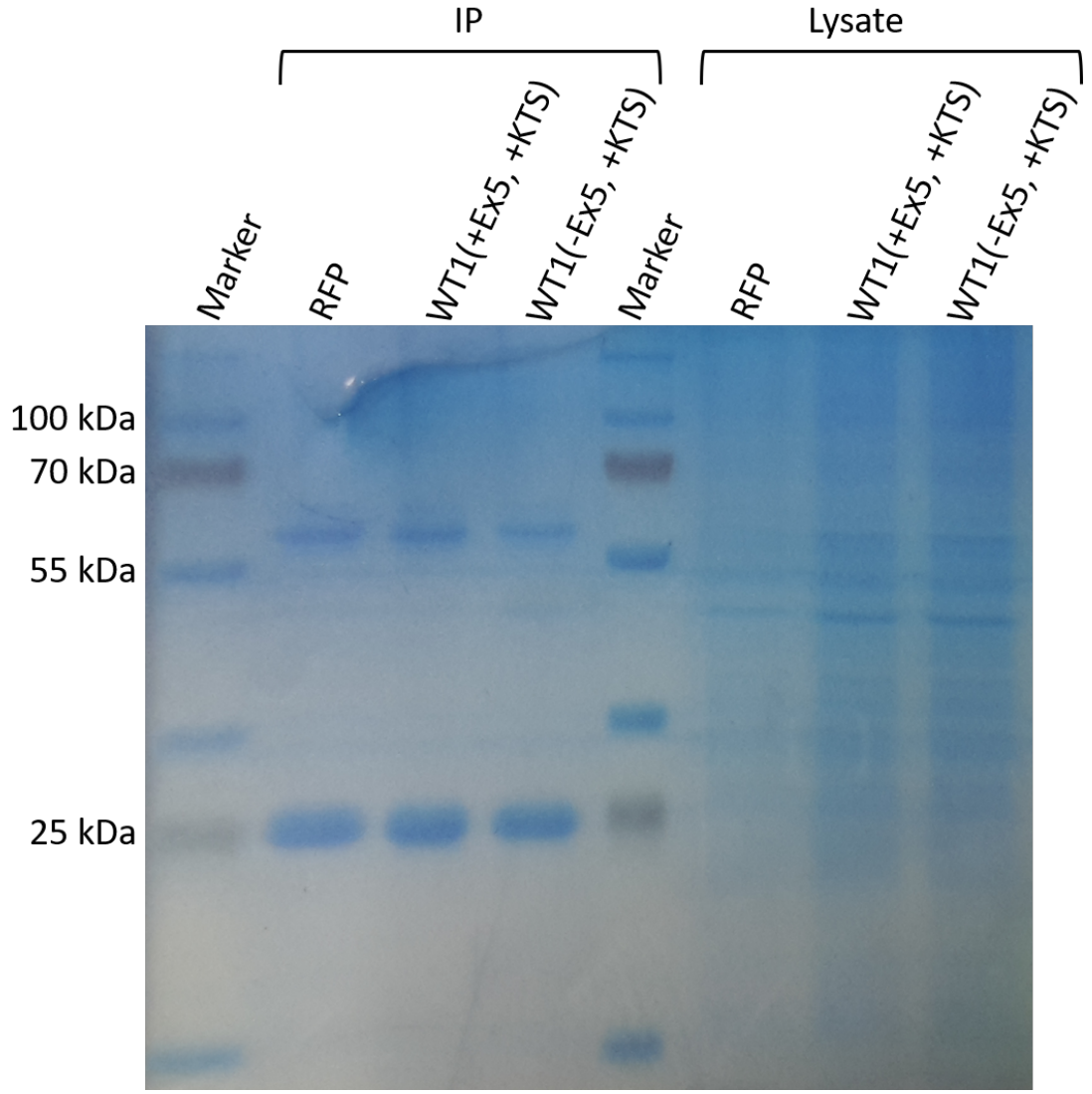


Abbildung 13: Coomassie Färbung der IP- und Lysat-Proben der HSMP-Zellen nach Transfektion per TALEN-mediierter Genom-Integration mit drei ausgewählten Vektoren und Selektion unter Puromycin.

4.3. Ergebnisse der Massenspektrometrie

Auf Grund der vielversprechenderen Validierungsschritte für die Isoformen von Wt1 mit KTS, also Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS) wurden diese zusammen mit der RFP-Kontrollzelllinie für die Massenspektrometrie (MS) aufbereitet und eingesandt. Im Folgenden werden die Daten der MS untersucht.

5.3.1 LFQ-Intensitäten

Zur Übersicht der Proteom-Daten wurden die Intensitäten der log2-transformierten Label-free Quantification (LFQ) graphisch aufbereitet (Abbildung 14) um die Proteinexpression in den drei Proben zu vergleichen. Label-free-Quantification (LFQ) ist eine Methode der Massenspektrometrie, mit der die Menge von Proteinen in verschiedenen Proben ohne Verwendung von Isotopenmarkierungen verglichen wird.

In der Heatmap in Abbildung 14A spiegeln die LFQ-Intensitäten auf der y-Achse die relativen Proteinmengen aus der jeweiligen Probe wider. Sie wurden log2-transformiert, um die Dynamik besser darzustellen, also beispielsweise extreme Werte zu reduzieren.

Auffällig ist, dass für Wt1(-Ex5, +KTS) eine größere Zahl an Proteinen ko-präzipitiert wurde, was auf ein breiteres Interaktionsspektrum dieser Isoform hinweist. Außerdem gibt es unspezifische Proteine in allen drei Zelllinien, die also auch mit dem Kontrollprotein RFP präzipitiert wurden.

Der Violinplot in Abbildung 14B zeigt jedoch, dass trotz dieser Unterschiede alle Proben ein ähnliches Verteilungsmuster der Proteinexpression aufweisen.

In Abbildung 14C werden ausgewählte, in den drei Replikaten der drei Zelllinien (Wt1(+Ex5, +KTS), Wt1(-Ex5, +KTS), RFP-Kontrollzelllinie), detektierte Proteine in den LFQ-Intensitäten dargestellt. Die Proteinauswahl erfolgte aufgrund potenziell neuer Interaktionen mit Wt1 oder aufgrund expressionsbezogener Unterschiede zwischen den Isoformen (mit und ohne Exon 5). Fehlende Werte für einzelne Proteine zeigen an, dass diese in der jeweiligen Probe nicht detektiert wurden.

So wurde Wt1 selbst nur in den beiden Isoform-Zelllinien, nicht aber in der RFP-Kontrolle nachgewiesen, dies bestätigt die Spezifität der Überexpression. Die vergleichbare LFQ-Intensität in beiden Isoformen zeigt zudem, dass Unterschiede in den identifizierten Interaktionspartnern nicht auf unterschiedliche Expressionsstärken von Wt1 mit und ohne Exon 5 zurückzuführen sind, sondern tatsächlich funktionelle Unterschiede der Isoformen widerspiegeln. Die Detektion der Proteine Naga3, Ifit3 und Scel ausschließlich in der Wt1(-Ex5, +KTS)-Isoform weist auf isoform-spezifische Interaktionen hin. Das Protein Kdelc 1 findet sich für beide Isoformen in gleicher LFQ-Intensität, nicht aber in der RFP-Kontrollgruppe, hier findet sich also keine isoform-spezifität. Die Proteine Spp1 und Letm1 finden sich in allen drei

Zelllinien in verschieden starker LFQ-Intensität, dies zeigt eine generelle, aber in ihrer Ausprägung variierende Interaktion.

Die Einordnung dieser Ergebnisse sowie ihre mögliche biologische Relevanz werden im Diskussionsteil vertieft dargestellt, da sie den zentralen Ansatzpunkt und das übergeordnete Ziel dieser Arbeit, die Charakterisierung des Interaktoms der Wt1-Isoformen, widerspiegeln.

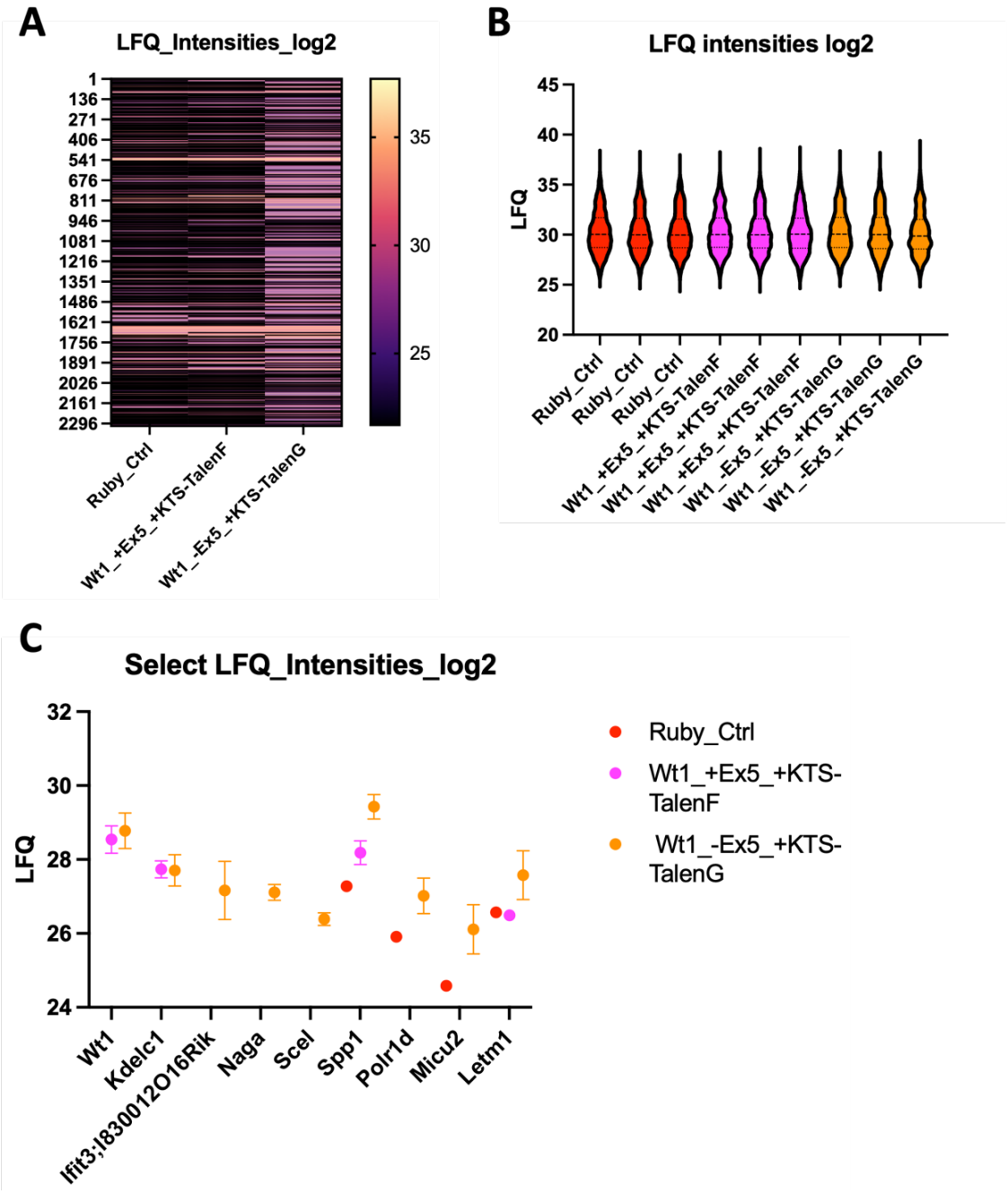


Abbildung 14: LFQ-Intensitäten der Massspec-Daten

für Wt1(+Ex5, +KTS), Wt1(-Ex5, +KTS) und die RFP-Kontrollzelllinie

A) Heatmap der LFQ-Intensitäten für die detektierten Proteine (y-Achse, n=2296) in den drei Zelllinien. Jede Zeile entspricht einem Protein, die Farbskala zeigt die jeweilige log2-transformierte Intensität

B) Violinplot der log2 transformierten LFQ-Intensitäten zur Darstellung der Proteinverteilung. Unterschiedliche Farben kennzeichnen die Zelllinien, jeweils in drei Replikaten.
C) log2 transformierte LFQ-Intensitäten für ausgewählte Proteine in den drei Zelllinien. Mittelwert und Standardfehler ergeben sich aus Mittelung der drei Replikate. Die Proteinauswahl erfolgte aufgrund potenziell neuer Interaktionen mit Wt1 oder aufgrund expressionsbezogener Unterschiede. Fehlende Datenpunkte kennzeichnen nicht detektierte Proteine.

5.3.2 PCA

Zur Bewertung der Varianz in den proteomischen Datensätzen wurden Hauptkomponentenanalysen (PCA) durchgeführt. Diese Methode reduziert die Dimensionalität der Daten, indem sie die Hauptquellen der Variation in neue Komponenten überführt.
Abbildung 15 zeigt die Proportion of variance. Es wird ersichtlich, dass die ersten vier Hauptkomponenten (PC1-4) gemeinsam bereits 82,46% der Variation zwischen den Gruppen ausmachen. Dies verdeutlicht, dass die Unterschiede zwischen den Zelllinien durch wenige dominante Faktoren bestimmt werden.
Deshalb ist eine zweidimensionale Darstellung von PC1-4 im Weiteren sinnvoll, um Muster in den experimentellen Gruppen zu visualisieren.

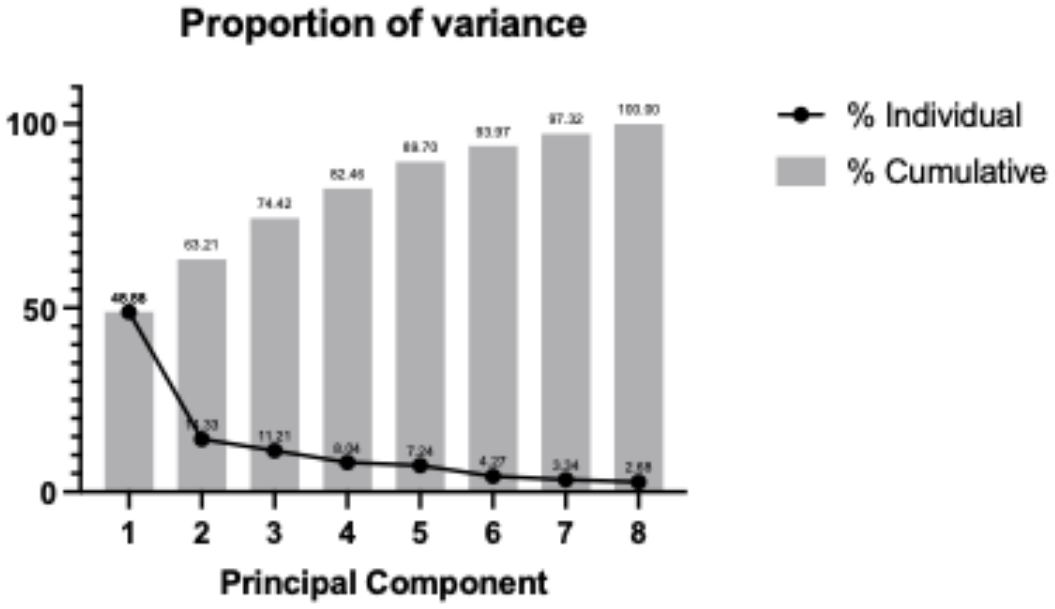


Abbildung 15: Proportion of variance der Hauptkomponentenanalyse (PCA)
Individuelle und kumulative Werte der ersten acht Hauptkomponenten

Die Abbildung 16A-D zeigt in PCA-Score-Plots wie sich die Proben basierend auf den jeweiligen Hauptkomponenten PC1-4 verteilen. Diese werden also jeweils miteinander

verglichen. Eine klare Trennung der Gruppen ist nicht erkennbar, vielmehr zeigen die Proben eine Streuung und teilweise Überlappungen. Dies weist darauf hin, dass die proteomischen Unterschiede zwischen den Isoformen und der Kontrollgruppe gering ausgeprägt sind oder von einer hohen Variabilität überlagert werden. Dennoch lassen sich Tendenzen erkennen, dass die jeweiligen Zelllinien nicht vollständig übereinstimmen, was auf schwache isoformspezische Effekte hindeutet.

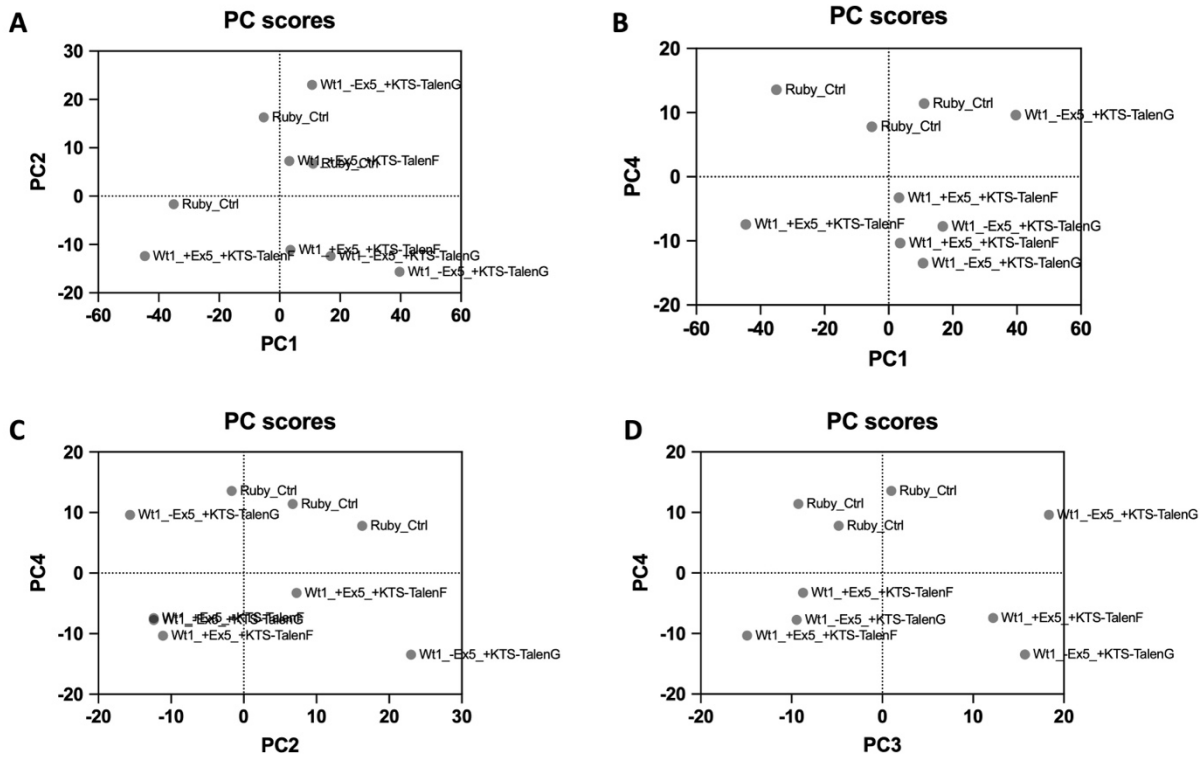


Abbildung 16: PC Scores für die zwei Hauptkomponenten
A) PC1 zu PC2, B) PC1 zu PC4, C) PC2 zu PC4 und D) PC3 zu PC4

5.3.3 Volcano-Plots

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Proteine zwischen den Zelllinien wurden Volcano-Plots erstellt, da sie eine gleichzeitige Einschätzung von Stärke (Fold-Change) und Signifikanz (p-Wert) der Expressionsunterschiede ermöglichen.

In Abbildung 17A und B wurde jeweils die Proteinexpression der RFP-Kontrollgruppe mit den beiden Wt1 Zelllinien gegenübergestellt. Der Vergleich zwischen Kontrolllinie und Wt1(-Ex5, +KTS) in Abbildung 17A zeigt moderate Unterschiede in der Expression. Die meisten Proteine liegen nahe am Fold-Change von Null und nur eine kleine Anzahl weist signifikante Expressionsunterschiede auf. In Abbildung 17B, dem Vergleich der Kontrollgruppe mit Wt1(+Ex5, -KTS) zeigt sich eine etwas breitere Streuung der Datenpunkte entlang der x-Achse, was auf stärkere Unterschiede im Interaktom dieser Wt1-Isoform im Vergleich mit der RFP-Kontrolle hinweist. Am deutlichsten traten Unterschiede im direkten Vergleich der beiden

Isoformen von Wt1 hervor, in Abbildung 17C dargestellt. Auch befinden sich hier mehr Proteine im Bereich für eine höhere statistische Signifikanz.
Zusammenfassend deuten die Daten daraufhin, dass beide Wt1-Isoformen differenzielle Interaktome aufweisen, wobei insbesondere das Vorhandensein von Exon 5 zu stärkeren Effekten auf die interagierenden Proteine führt.

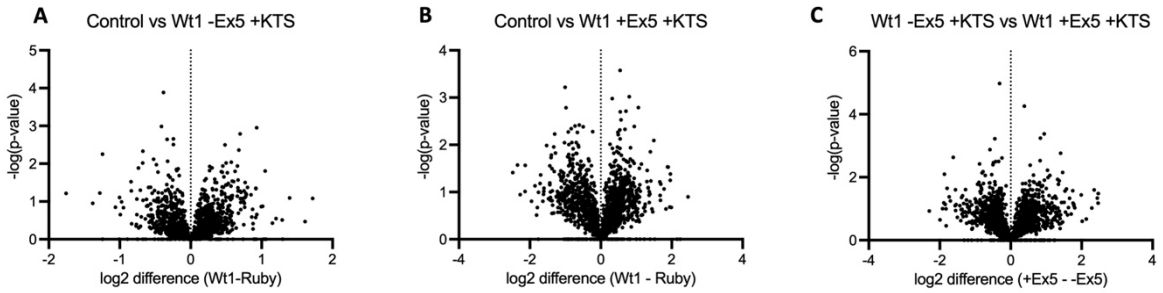


Abbildung 17: Volcano-Plots -log(p-Wert) zu log2 Foldchange
zur Visualisierung differentiell exprimierter Proteine. Auf der x-Achse ist der log2 Fold-Change zwischen zwei Zelllinien dargestellt, auf der y-Achse der -log10(p-Wert) als Maß für die statistische Signifikanz. Jeder Punkt repräsentiert ein detektiertes Protein, stark regulierte und signifikante Proteine liegen an den Rändern und im oberen Bereich der Plots. Diese Visualisierung ermöglicht eine gleichzeitige Einschätzung der Stärke und Signifikanz der differentiellen Expression zwischen zwei Gruppen. Dargestellt sind A) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(-Ex5+, KTS), B) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(+Ex5, -KTS) und C) Wt1(-Ex5, +KTS) gegen Wt1(+Ex5, +KTS).

In den Volcano-Plots in Abbildung 18A-C sind ausgewählte Proteine farblich markiert, die nach Filterung für einen p-Wert und Fold-Change als potenziell differentiell exprimiert hervorgehoben wurden *(p-Wert<0,05 und Fold-Change>1)*.
Im Vergleich von Wt1(-Ex5, +KTS) mit der RFP-Kontrollgruppe in Abbildung 18A konnten unter diesen Filterkriterien mehrere Proteine identifiziert werden, die mit der Isoform hochreguliert werden. Hierzu gehört Syndecan-4 (Sdc4), welches in Wt1-Ex5+KTS hochreguliert wird und relevant für die Zelladhäsion und Signaltransduktion ist.[65]
In Abbildung 18B wird Wt1(+Ex5, +KTS) gegen die Kontrollgruppe dargestellt. Zu den signifikanter hochregulierten Proteinen gehört beispielsweise das Tight Junction Protein 1 (Tjp1), welches an Zell-Zell-Kontakten beteiligt ist und auf mögliche Veränderungen in der Zelladhäsion hindeutet.[66]
In Abbildung 18C werden potenzielle Unterschiede zwischen den beiden Isoformen von Wt1 verglichen (Wt1(+Ex5, +KTS) gegen Wt1(-Ex5, +KTS)). Die Proteomdaten lassen erkennen, dass sich einzelne Proteine zwischen den Isoformen unterscheiden, was auf isoformspezifische Einflüsse von Exon 5 auf das Interaktom hindeutet.

Insgesamt bleibt die Zahl der signifikant differentiell exprimierten Proteine gering, dennoch deuten die hervorgehobenen Proteine auf funktionelle Unterschiede zwischen den Wt1-Isoformen hin, die für weiterführende Analysen von Interesse sind.

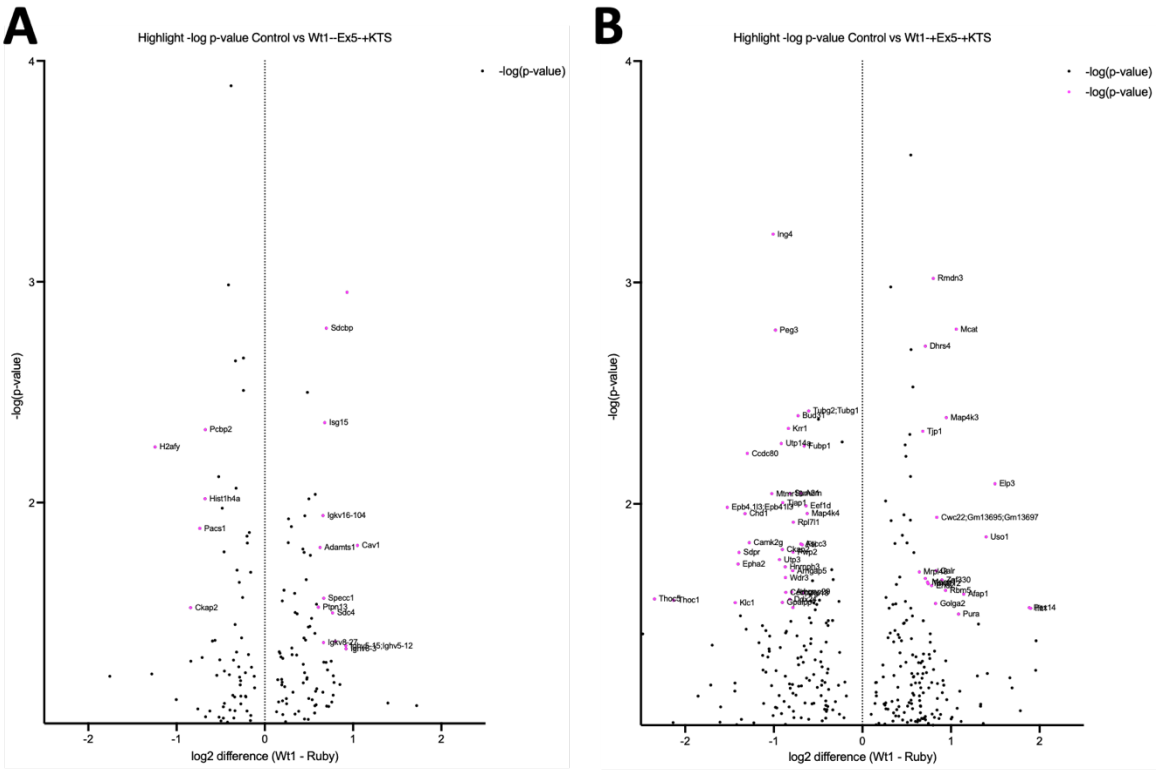


Abbildung 18: p-value Volcano with Highlights Volcano-Plots zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine nach Filterung. Aufgetragen sind der log2 Fold-Change (x-Achse) und der log10(p-Wert) (y-Achse), welcher die statistische Signifikanz anzeigt. Jeder Punkt repräsentiert ein Protein, farblich hervorgehobene Punkte erfüllen die definierten Filterkriterien (p-Wert<0,05 und Fold-Change>1). Proteine mit einer signifikanteren Regulation erscheinen weit oben in den Plots und stark hoch- bzw. herunterregulierte Proteine liegen an den Rändern der Plots. Dargestellt sind A) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(-Ex5+, KTS), B) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(+Ex5, -KTS) und C) Wt1(-Ex5, +KTS) gegen Wt1(+Ex5, +KTS).

Ergänzend zu den Volcano-Plots in Abbildung 17, die auf Basis der p-Werte einen explorativen Überblick über interessante Proteine verschaffen, wurden in Abbildung 19 Volcano-Plots mit q-Werten erstellt. Dazu wurden die p-Werte mit der False Discovery Rate (FDR) korrigiert. Die resultierenden q-Werte geben die erwartete Rate falsch-positiver Ergebnisse unter den als signifikant klassifizierten Proteinen an.

Diese strengere Analyse berücksichtigt Mehrfachtestungen, reduziert die Zahl falsch-positiver Treffer und erlaubt weniger Proteine als signifikant zu klassifizieren.

In Abbildung 19A wird die Wt1 Isoform Wt1(-Ex5, +KTS) mit der Kontrollgruppe verglichen. Es sind einige Proteine zu erkennen, die eine signifikante Expressionsveränderung aufweisen. Die symmetrische Verteilung um log2 (Fold Change) = 0 deuten darauf hin, dass sowohl eine Hoch- als auch Herunterregulation vorkommt.

Volcano-Plot Abbildung 19B vergleicht Wt1(+Ex5, +KTS) gegen die Kontrollgruppe. Hier sind hingegen kaum signifikant differentiell exprimierte Proteine darstellbar, was auf geringe Effekte oder eine hohe Variabilität hindeutet.

In Abbildung 19C wird der direkte Vergleich der Wt1 Isoformen dargestellt. Hier sind einige signifikantere Veränderung sichtbar, jedoch erscheint der Effekt moderat.

Die Gegenüberstellung von p- und q-Wert-Plots verdeutlicht, dass die beobachteten Effekte insgesamt schwach ausgeprägt und die Ergebnisse explorativ zu interpretieren sind. Während einzelne Proteine hervorstechen, zeigt die geringe Zahl signifikanter Treffer nach Korrektur, dass die Datenqualität limitiert ist.

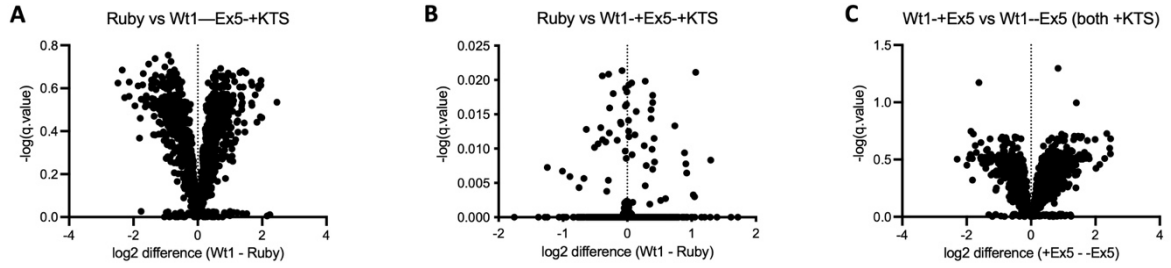


Abbildung 19: Volcano-Plots q-Value

Volcano-Plots basierend auf q-Werten (FDR-korrigierte p-Werte) zur Identifikation differentiell exprimierter Proteine. Auf der x-Achse ist der log2 Fold-Change dargestellt, auf der y-Achse der -log10(q-Wert) als Maß für die statistische Signifikanz nach Korrektur für Mehrfachtests. Der q-Wert ist eine angepasste p-Wert-Metrik, die zur Kontrolle der möglicherweise falsch-positiv als signifikant klassifizierten Ergebnisse, angewendet wird. Jeder Punkt repräsentiert ein detektiertes Protein, potenziell relevante Proteine erscheinen in den Randbereichen. Dargestellt sind A) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(-Ex5+, KTS), B) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(+Ex5, -KTS) und C) Wt1(-Ex5, +KTS) gegen Wt1(+Ex5, +KTS).

In Abbildung 20A und B sind Highlight-Volcano-Plots dargestellt, um potenziell relevante Gene mit Expressionsunterschieden in den untersuchten Gruppen hervorzuheben. Auch hier wird die log2-transformierte Expressionsdifferenz im Verhältnis zum -log(q)-Wert gezeigt und als Filterkriterium ein q-Wert<0,25 und Fold-Change>1,5 gewählt für farblich hervorgehobene Proteine.

Der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und Wt1(-Ex5, +KTS) in A) zeigt mehrere Proteine mit differentieller Expression, wobei Proteine mit einem q-Wert <0,25 und einem Fold Change>1,5 farblich hervorgehoben wurden. Hierzu gehören beispielsweise Tjp1 und Pno1.

Für Wt1(+Ex5, +KTS) erreichte kein Protein Signifikanz, unabhängig von der Wahl des q-Wert-Cutoffs.

In Abbildung 20B werden beide Wt1-Isoformen in direkten Vergleich gesetzt. Unter die Filterkriterien fällt auch hier beispielsweise Pno1 als relevantes Protein.

Die Highlight-Volcano-Plots verdeutlichen somit methodische Grenzen der vorliegenden Analyse, liefern aber zugleich einzelne Proteine, die als Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen dienen können.

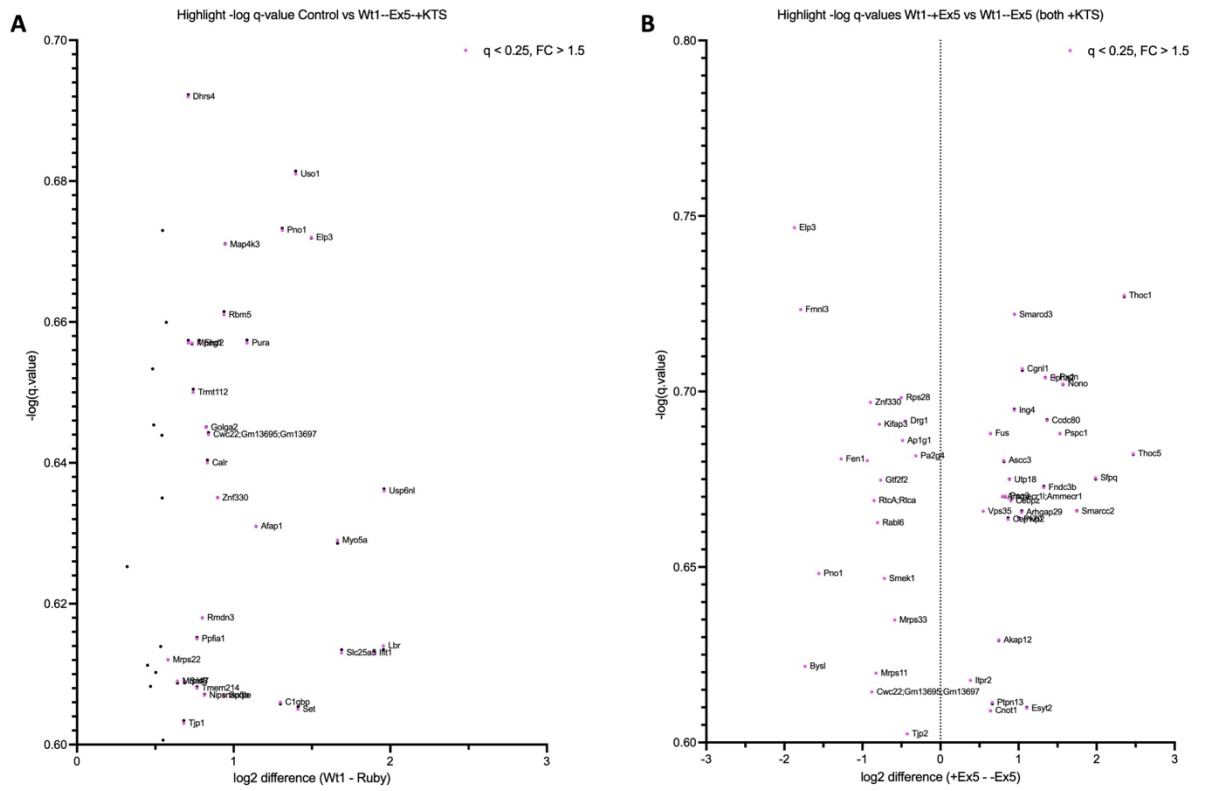


Abbildung 20: Highlight -log q-value

Volcano-Plots zur Darstellung differentiell exprimierter Proteine nach Filterung. Auf der x-Achse ist der log2 Fold-Change, auf der y-Achse der -log10(q-Wert) dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert ein Protein, farblich hervorgehobene erfüllen die definierten Filterkriterien (q-Wert<0,25 und Fold-Change>1,5). Dargestellt sind A) RFP-Kontrollgruppe gegen Wt1(-Ex5, KTS) und B) Wt1(-Ex5, +KTS) gegen Wt1(+Ex5, +KTS). Für RFP-Kontrollgruppe gegen

Wt1(+Ex5, +KTS) erreichte kein Protein Signifikanz, unabhängig von der Wahl des q-Wert-Cutoffs.

Insgesamt zeigt sich damit, dass mit der vorliegenden Zahl an Replikaten keine belastbare statistische Aussage zu Unterschieden zwischen den Isoform-Interaktomen getroffen werden kann. Für eine statistische Auswertung muss der q-Wert so hoch angesetzt werden, dass kein signifikant reguliertes Protein identifiziert werden konnte.
Dennoch liefert der rein LFQ-basierte Vergleich einige interessante Proteine, die potenziell weiterverfolgt werden können und Ansatzpunkte für künftige funktionelle Untersuchungen bieten. Dieses methodische Problem sowie die möglichen biologischen Bedeutungen werden im Diskussionsteil näher eingeordnet.

5. Diskussion

5.1. Stand der Forschung

Nierenerkrankungen spielen weltweit eine große Rolle im Gesundheitssystem und resultieren häufig in terminalem Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit.[4,67] Häufig stellen Schädigungen der Podozyten die Ursache einer Nierenerkrankung und äußern sich beispielsweise in einem nephrotischen Syndrom. Podozyten spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Filterfunktion der Nieren und haben somit eine strukturgebende Funktion inne, sondern steuern auch die Signaltransduktion und Stoffwechselprozesse.[7] Bei Schädigung der Podozyten verändert sich die Genexpression und verschiedene Signalwege werden aktiviert.[17]

Das Wilms-Tumor-Protein (Wt1) reguliert als Transkriptionsfaktor in Podozyten zahlreiche Genexpressionen, koordiniert die Entwicklung des Urogenitalsystems und wirkt als Tumorsuppressor.[2,9] Das Wt1-Gen führt durch alternatives Splicing zu vier Isoformen des Wt1-Proteins. Diese zeichnen sich durch das Fehlen oder die Integration von Exon 5 (17 Aminosäuren) und von den drei Aminosäuren Lysin, Threonin und Serin (abgekürzt KTS) aus.[20]

Die Expression von Exon 5 ist, anders als die KTS Isoformen, gewebespezifisch und variiert im Verlauf der Nierenentwicklung. Die Isoform (+Ex5, +KTS) ist die häufigste, (-Ex5, -KTS) die seltenste. KTS Isoformen (+KTS) binden überwiegend an RNA und übernehmen Funktionen im RNA-Splicing. Isoformen ohne KTS (-KTS) binden eher an DNA und wirken als Transkriptionsfaktor.[3,13]

Es ist etabliert, dass Wt1 als Transkriptionsfaktor eine große Rolle im Genregulationsnetzwerk der Podozyten spielt.[5,21] Trotzdem ist es bisher wenig erforscht. Es ist bislang unklar, wie Wt1 zellspezifisch wirkt, mit welchen Proteinen es interagiert, in welchen Fällen es in Podozyten als Transkriptionsfaktor agiert und wie das Genregulationsnetzwerk in Podozyten von Wt1 beeinflusst wird.[1]

Es gibt Hinweise darauf, dass Wt1 isoformspezifisch hoch- und runterregulierende Einflüsse auf die Expression verschiedenster Proteine in Podozyten hat. Dazu zählen Wachstumsfaktoren (PDGF-α, TGF-β1), andere Transkriptionsfaktoren (FoxC2, Pax-2, Snail1) und weitere verschiedene Proteine (Cdh1, NPHS1, NPHS2, SYNPO, Wnt4).[2,10,15,16]

Mutationen im Wt1-Gen verursachen diverse Nierenerkrankungen und Fehlbildungen des Urogenitaltraktes.[5,6]

Trotz dieser grundlegenden Rolle von Wt1 für die Nierenentwicklung und -gesundheit ist der Transkriptionsfaktor und seine Funktionen noch unzureichend charakterisiert und Gegenstand aktueller Forschung.

Ziel dieser Arbeit war deshalb Podozytenzelllinien zu generieren, in denen die verschiedenen Wt1-Isoformen überexprimiert werden, um im nächsten Schritt die Funktionen und Mechanismen von Wt1 detaillierter untersuchen zu können. Ein Ansatz war hierfür die Massenspektrometrie zur Charakterisierung des Interaktoms der Spleißvarianten.

5.2. Methodendiskussion

5.2.1. Zelllinien

Immortalisierte Podozyten, wie die hier verwendeten HSMP-Zellen, stellen ein etabliertes Standardmodell zur Erforschung physiologischer und pathologischer Podozytenfunktionen in vitro dar. Gegenstand der Forschung sind dabei sowohl physiologische als auch pathologische Zellprozesse wie Zellzyklus, Zelltod, Signalwege, Proteom. [68,69]

In dieser Arbeit wurden murine Podozyten verwendet, in diesen ähnelt das Expressionsmuster der Wt1-Isoformen stark dem des Menschen und macht sie damit zu einem geeigneten Model zur Erforschung von Wt1.[2]

5.2.2. TALEN-mediierte Genom-Integration

Zur stabilen Transfektion der Zelllinien wurde das TALEN-System verwendet. Dieses gehört zusammen mit dem CRISPR-Cas-System, viralen Vektoren oder Zinkfingernukleasen zu den Methoden der gezielten und stabilen Genommodifizierung.[59,61]

Es ermöglicht die Erforschung und genauere Charakterisierung einzelner Proteine und deren Interaktionen mit anderen Proteinen (Interaktom), da transgene Zelllinien effizient generiert werden können. Durch einfaches Cloning kann der für diese Arbeit designte Vektor modifiziert und auf nahezu jedes Protein angewendet werden.

Transcription activator-like effector nucleases (TALEN) sind spezifisch DNA-bindende Proteine, die in den gramnegativen Bakterien Xanthomonas entdeckt wurden.[37,40] Die zentrale Region des Proteins besteht aus 34 Aminosäuren, welche die sequenzspezifische DNA-Bindung vermitteln. Eine Endonuklease schneidet dann die DNA an dieser Stelle. Auf diese Weise können gezielt Gene aus dem Genom entfernt oder eingebracht werden.[37]

Für diese Arbeit wurden zu diesem Zweck Vektoren kloniert, die neben den gewünschten Sequenzen für die Wt1-Isoformen auch für homologe Sequenzen zum Rosa26 Lokus in Mauszellen kodieren. Schneiden bei der Transfektion die TALEN-Plasmide spezifisch an der gewünschten Stelle, so komplettiert der jeweilige Zielvektor am Rosa26 Lokus die DNA und der Vektor wird stabil in das Genom eingebaut. Auf diese Weise gelangt das Transgen in das Zellgenom und Wt1 wird überexprimiert.

Die Möglichkeit mit dem TALEN-System effizient, schnell und gezielt Gene auszuschalten, einzufügen oder zu verändern revolutionierte die biologische Forschung und hält ein großes

Potential bereit, für die Entwicklung therapeutischer Ansätze bei genetischen Erkrankungen.[60] Aus diesen Gründen wurde es für diese Arbeit zur Erstellung stabiler Zelllinien gewählt.

5.2.3. Massenspektrometrie

Die MS ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Analyse von Proteinen und deren Interaktionen.[47] Die massenspektrometriebasierte Proteomik spielt aktuell eine große Rolle in der Forschung. Sie liefert detaillierte Einblicke in die Funktion einzelner Proteine, deren Interaktionspartner und Protein-Netzwerke und trägt so zum Verständnis von zellulären Mechanismen in Gesundheit und Krankheit bei.[49]

In dieser Arbeit wurde nach Klonierung eines universell einsetzbaren TALEN-Vektors und nach Etablierung stabiler Zelllinien zur Überexpression von Wt1 ebenfalls die MS angewandt, um das Interaktom der verschiedenen Spleißvarianten von Wt1 zu charakterisieren.

5.3. Ergebnisdiskussion

5.3.1. Etablierung und Validierung der Wt1-Zelllinien

An erster Stelle dieser Arbeit stand das Design des Zielvektors zur stabilen Expression verschiedener Wt1-Spleißvarianten. Es wurde festgelegt, wie dieser aufgebaut werden und welche funktionellen Elemente er enthalten sollte. Nach dem Klonieren wurde der Vektor komplett sequenziert und geprüft, ob er den gewünschten Aufbau hat.

Im nächsten Schritt wurden die stabilen Zelllinien transfiziert und verschiedene experimentelle Ansätze gewählt, zur Validierung der Expression und Integration. Dabei zeigten sich teils etwas widersprüchliche Ergebnisse. Während die Expressionskontrolle in HEK293T-Zellen, Bilder der transfizierten und selektionierten HSMP-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop, die Integrations-PCR und Immunfluoreszenzfärbung vielversprechend aussahen, zeigten vor allem die Isoformen Wt1(-Ex5, -KTS) und Wt1(+Ex5, -KTS) ohne KTS in der IP keine überzeugenden Banden für Wt1. Daher wurden für die Massenspektrometrie ausschließlich die Isoformen Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS) ausgewählt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die niedrige, fehleranfälligere Expression der -KTS Isoformen ist, dass für diese Isoformen eine stärkere Bindung an DNA und die stärkere Funktion als Transkriptionsfaktor nachgewiesen wurde. So kommt es bei Überexpression von -KTS Isoformen zu verminderter Proliferation und verminderter Zellteilung, da diese für ausgereifte Podozyten untypisch ist. Dies könnte die schwierigere Etablierung der -KTS Zelllinien erklären.[70] Die +KTS Isoformen binden primär an RNA und übernehmen Funktionen beim RNA-Splicing. Insgesamt sind die Funktionen von Wt1 isoformspezifisch.[70]

In dieser Arbeit konzentrierten wir uns aus diesen Gründen im Weiteren auf die Isoformen Wt1(+Ex5, +KTS) und Wt1(-Ex5, +KTS), also mit KTS für die MS.

5.3.2. Proteinexpression und Datenqualität

Zur Einschätzung der massenspektrometrisch generierten Proteomdaten wurden log2-transformierte LFQ-Intensitäten visualisiert. Die Heatmap deutete auf Unterschiede in der Proteinexpression hin, während die Violinplots sehr ähnliche Gesamtverteilungen über die Zelllinien hinweg aufwiesen. In der konkreten Darstellung einzelner Proteine zeigten sich Unterschiede in der Expression spezifischer Protein-Kandidaten wie Osteopontin und Sciellin. Die Proben bilden separate Cluster, und es konnten keine isoformübergreifenden Effekte festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen Wt1-Isoformen und die Kontrollgruppe unterschiedliche Einflüsse auf das Proteom ausüben.

5.3.3. Differenzielle Proteinexpression

Die Volcano-Plot-Analysen veranschaulichen die Expressionsunterschiede (log2 Fold-Changes) und ihre statistische Signifikanz. Nur wenige Gene zeigen eine signifikante Differenz in ihrer Expression, was auf insgesamt moderate Unterschiede hinweist.

Die MS Ergebnisse zeigten für die Wt1-Interaktome Protein-Partnerbeziehungen. Interessanterweise ließen sich für die Proteine Osteopontin (Spp1) und Sciellin (Scel) Expressionsunterschiede zwischen den Wt1-Gruppen nachweisen, was auf eine mögliche funktionelle Relevanz dieser Kandidaten hindeutet.

Osteopontin (Spp1) weist in den beiden Wt1-Isoformen eine höhere LFQ-Intensität als in der Kontrollgruppe auf, was auf eine Hochregulation von Spp1 durch die Wt1-Isoformen schließen lässt. Bislang ist eine Interaktion dieses Proteins mit Wt1 nicht bekannt.[71]

Das Protein Sciellin (Scel) ist in der RFP-Kontrollgruppe ebenfalls nur in niedriger Intensität nachweisbar, während es in den beiden Wt1-Isoformen eine Hochregulation zeigt. Dieses Gen wird in Denys-Dash-Mäusen runterreguliert und ist für Podozyten relevant; eine Interaktion mit Wt1 wurde bislang nicht gezeigt.[72]

Ein weiteres hervorzuhebendes Protein mit etwas signifikanteren Unterschieden zwischen den Gruppen ist Syndecan-4 (Sdc4), welches in Wt1(-Ex5+KTS) hochreguliert ist und relevant für die Zelladhäsion und Signaltransduktion ist.[65]

Hervorzuheben sind außerdem das Tight Junction Protein 1 (Tjp1), ein bekanntes Markerprotein für Podozyten mit relevanter Funktion in Zell-Zell-Kontakten, was auf potenzielle Veränderungen in der Zelladhäsion hinweist[66]; sowie Pno1 (Partner of NOB1 Homolog), ein RNA-bindendes Protein, das in anderen Kontexten eine Rolle in der Regulation des Yap/Taz-Signalwegs spielt.[73] Diese Proteine könnten im Zusammenhang mit der RNA-bindenden Funktion von Wt1(+KTS), sowie dessen intrazellulärem Shuttling für zukünftige funktionelle Untersuchungen von Interesse sein.

Insgesamt scheint Wt1(-Ex5, +KTS) etwas stärkere Effekte auf die Proteinexpression zu haben als Wt1(+Ex5, +KTS), für das sich nur wenige signifikant differentiell exprimierte Proteine finden lassen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Exon 5 in Wt1 einen Einfluss auf das Transkriptom hat und sein Vorhandensein den transkriptionellen Einfluss von Wt1 eher abschwächt und zu einer stabilisierenden Wirkung führen könnte.

5.3.4. Bewertung der Signifikanz und methodische Grenzen

Insgesamt zeigen die Ergebnisse nur eine geringe Anzahl signifikant differentiell exprimierter Proteine. Es war zudem notwendig den q-Wert-Cutoff auf 0,25 herabzusetzen, um Ergebnisse zu erhalten. Insbesondere für Wt1(+Ex5, +KTS) konnten kaum signifikant veränderte Proteine identifiziert werden, unabhängig von der Wahl des q-Wert-Cutoffs.

Dies unterstreicht den explorativen Charakter dieser Arbeit und stellt den Grund dar, weshalb keine weiteren Co-IP-Experimente durchgeführt wurden. Die geringe Zahl statistisch belastbarer Ergebnisse legt nahe, dass zusätzliche Experimente unter den gegebenen Bedingungen nur begrenzten Erkenntnisgewinn erbracht hätten.

5.3.5. Bedeutung identifizierter Protein-Kandidaten

Trotz der eingeschränkten Signifikanz konnten einzelne Proteine als Kandidaten mit potenzieller funktioneller Relevanz identifiziert werden.

Osteopontin (Spp1) zeigte in beiden untersuchten Wt1-Isoformen erhöhte LFQ-Intensitäten im Vergleich zur Kontrollgruppe, was auf eine Hochregulation hindeutet. Eine direkte Interaktion mit Wt1 ist bisher nicht bekannt.[71]

Sciellin wurde ebenfalls in beiden Wt1-Spleißvarianten stärker exprimiert. In Denys-Drash-Mäusen ist dieses Gen herunterreguliert und weist podozytenspezifische Funktionen auf. Ein Zusammenhang mit Wt1 ist bisher ebenfalls nicht bekannt.[72]

Syndecan-4 (Sdc4) war in der Isoform Wt1(-Ex5, +KTS) hochreguliert und ist relevant für die Zelladhäsion und Signaltransduktion.[65]

Das Tight Junction Protein 1 (Tjp1 / Zo-1) ließ sich im Vergleich Kontrolllinie vs. Wt1(-Ex5+KTS) detektieren. Es ist ein bekanntes Markerprotein für Podozyten mit relevanter Funktion in Zell-Zell-Kontakten und deutet auf mögliche Veränderungen in der Zelladhäsion hin.[66,74]

Pno1 (Partner of NOB1 Homolog), ein RNA-bindendes Protein, das in anderen Kontexten eine Rolle in der Regulation des Yap/Taz-Signalwegs spielt, konnte ebenfalls detektiert werden.[73] Dieser Signalweg ist an zellulärer Proliferation, Differenzierung und Überleben beteiligt und spielt in Podozyten ebenfalls eine wichtige Rolle.[75] Die Expression dieses Proteins bei Wt1(+KTS) könnte somit sowohl die RNA-bindende Aktivität von Wt1, als auch dessen Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation wiederspiegeln.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass die Isoform ohne Exon 5 stärkere Effekte auf das Proteom zeigt. Exon 5 könnte somit eine spezifische modulierende Rolle in der Genexpression spielen.
Weitere hier dargestellte Proteine zeigen kaum Unterschiede in den verschiedenen Gruppen. Die hervorgehobenen Proteine könnten jedoch im Zusammenhang mit der RNA-bindenden Funktion von Wt1(+KTS), sowie dessen intrazellulärem Shuttling für zukünftige funktionelle Untersuchungen von Interesse sein.

5.4. Schlussfolgerungen und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Rolle verschiedener Wt1-Isoformen in Podozyten-Zelllinien untersucht. Besonderes Interesse lag dabei auf Unterschieden im Interaktom der verschiedenen Spleißvarianten, also auf potenziellen Unterschieden im Proteom der verschiedenen Zelllinien.
Der hierfür in dieser Arbeit designte und klonierte Vektor zur TALEN-mediierten Genom-Integration ermöglicht die schnelle Generierung stabiler Zelllinien und gestattet durch einfaches Klonieren eine Modifizierung auf nahezu jedes andere Protein. Er bietet ein wertvolles Tool zur Generierung verschiedenster Zelllinien für unterschiedlichste Forschungsansätze.
Immortalisierte murine Podozytenzelllinien stellen ein unverzichtbares Modellsystem zur Sammlung grundwissenschaftlicher Erkenntnisse dar, die auf die Klinik übertragen werden können und für die Erforschung podozytärer Erkrankungen relevant sind. Dies kann letztlich dazu beitragen nephrologischen Erkrankungen vorzubeugen, sie zu diagnostizieren und zu behandeln.
Der Filtermechanismus der Nieren in gesundem und krankem Zustand kann somit in Kombination mit Erkenntnissen aus Tiermodellen und humanen Studien weiter erforscht und verstanden werden.

Die massenspektrometrischen Analysen dieser Arbeit lieferten insgesamt wenige signifikant differentiell exprimierte Proteine. Limitierende Faktoren dieser Arbeit sind insbesondere die geringe Anzahl signifikanter Proteine und die erforderliche Anhebung des q-Wert-Cutoffs auf 0,25 als methodische Limitation. Dies deutet auf eine hohe Streuung und potenziell geringe Effektstärke in den untersuchten Spleißvarianten von Wt1 hin. Technische Varianz, geringe Stichprobengrößen und niedrige absolute Expressionsniveaus könnten die Detektion zudem erschwert haben.
Trotz dieser Einschränkungen liefert die Analyse wertvolle Hinweise auf bislang unerkannte Regulationsmechanismen und potenziell relevante Zielstrukturen der Wt1-Isoformen. Diese Ergebnisse eröffnen neue Ansatzpunkte für weiterführende funktionelle Studien zur Rolle von

Wt1 in der glomerulären Funktion und Pathophysiologie, beispielsweise glomeruläre Erkrankungen wie das nephrotische Syndrom.

6. Literaturverzeichnis

1 Kann M, Ettou S, Jung YL, et al. Genome-Wide Analysis of Wilms' Tumor 1-Controlled Gene Expression in Podocytes Reveals Key Regulatory Mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2015; **26:** 2097–104. https://doi.org/10.1681/ASN.2014090940

2 Ozdemir DD, Hohenstein P. Wt1 in the kidney--a tale in mouse models. *Pediatr Nephrol* 2014; **29:** 687–93. https://doi.org/10.1007/s00467-013-2673-7

3 Haber DA, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, Call KM, Housman DE. Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88:** 9618–22. https://doi.org/10.1073/pnas.88.21.9618

4 Eckardt K-U, Coresh J, Devuyst O, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet* 2013; **382:** 158–69. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60439-0

5 Chau Y-Y, Brownstein D, Mjoseng H, et al. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet* 2011; **7:** e1002404. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002404

6 Morrison AA, Viney RL, Saleem MA, Ladomery MR. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295:** F12-7. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00597.2007

7 Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15:** 1382–91. https://doi.org/10.1097/01.asn.0000130167.30769.55

8 Jefferson JA, Alpers CE, Shankland SJ. Podocyte biology for the bedside. *Am J Kidney Dis* 2011; **58:** 835–45. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2011.03.033

9 Hamilton TB, Barilla KC, Romaniuk PJ. High affinity binding sites for the Wilms' tumour suppressor protein WT1. *Nucleic Acids Res* 1995; **23:** 277–84. https://doi.org/10.1093/nar/23.2.277

10 Dong L, Pietsch S, Englert C. Towards an understanding of kidney diseases associated with WT1 mutations. *Kidney Int* 2015; **88:** 684–90. https://doi.org/10.1038/ki.2015.198

11 Gessler M, König A, Bruns GA. The genomic organization and expression of the WT1 gene. *Genomics* 1992; **12:** 807–13. https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90313-h

12 Jen J, Wang Y-C. Zinc finger proteins in cancer progression. *J Biomed Sci* 2016; **23:** 53. https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9

13 Kent J, Coriat AM, Sharpe PT, Hastie ND, van Heyningen V. The evolution of WT1 sequence and expression pattern in the vertebrates. *Oncogene* 1995; **11:** 1781–92.

14 Schnerwitzki D, Perner B, Hoppe B, et al. Alternative splicing of Wilms tumor suppressor 1 (Wt1) exon 4 results in protein isoforms with different functions. *Dev Biol* 2014; **393:** 24–32. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.06.026

15 Jomgeow T, Oji Y, Tsuji N, et al. Wilms' tumor gene WT1 17AA(-)/KTS(-) isoform induces morphological changes and promotes cell migration and invasion in vitro. *Cancer Sci* 2006; **97:** 259–70. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00169.x

16 Lefebvre J, Clarkson M, Massa F, et al. Alternatively spliced isoforms of WT1 control podocyte-specific gene expression. *Kidney Int* 2015; **88:** 321–31. https://doi.org/10.1038/ki.2015.140

17 Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008; **88:** 451–87. https://doi.org/10.1152/physrev.00055.2006

18 Schumacher V, Schärer K, Wühl E, et al. Spectrum of early onset nephrotic syndrome associated with WT1 missense mutations. *Kidney Int* 1998; **53:** 1594–600. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00948.x

19 Suri M, Kelehan P, O'neill D, et al. WT1 mutations in Meacham syndrome suggest a coelomic mesothelial origin of the cardiac and diaphragmatic malformations. *Am J Med Genet A* 2007; **143A:** 2312–20. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31924

20 Baudry D, Hamelin M, Cabanis MO, et al. WT1 splicing alterations in Wilms' tumors. *Clin Cancer Res* 2000; **6:** 3957–65.

21 Hastie ND. Wilms' tumour 1 (WT1) in development, homeostasis and disease. *Development* 2017; **144:** 2862–72. https://doi.org/10.1242/dev.153163

22 Little MH, Prosser J, Condie A, Smith PJ, van Heyningen V, Hastie ND. Zinc finger point mutations within the WT1 gene in Wilms tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89:** 4791–95. https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4791

23 Kohsaka T, Tagawa M, Takekoshi Y, Yanagisawa H, Tadokoro K, Yamada M. Exon 9 mutations in the WT1 gene, without influencing KTS splice isoforms, are also responsible for Frasier syndrome. *Hum Mutat* 1999; **14:** 466–70. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(199912)14:6<466::AID-HUMU4>3.0.CO;2-6

24 Moorthy AV, Chesney RW, Lubinsky M. Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier" syndrome--a commentary on reported cases. *Am J Med Genet Suppl* 1987; **3:** 297–302. https://doi.org/10.1002/ajmg.1320280535

25 Baird PN, Santos A, Groves N, Jadresic L, Cowell JK. Constitutional mutations in the WT1 gene in patients with Denys-Drash syndrome. *Hum Mol Genet* 1992; **1:** 301–05. https://doi.org/10.1093/hmg/1.5.301

26 Pelletier J, Bruening W, Kashtan CE, et al. Germline mutations in the Wilms' tumor suppressor gene are associated with abnormal urogenital development in Denys-Drash syndrome. *Cell* 1991; **67:** 437–47. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90194-4

27 Mullis KB. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990; **48:** 579–82.

28 Gibson DG, Young L, Chuang R-Y, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 2009; **6:** 343–45. https://doi.org/10.1038/nmeth.1318

29 Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med* 1944; **79:** 137–58. https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137

30 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74:** 5463–67. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

31 DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 1987; **7:** 379–87. https://doi.org/10.1128/mcb.7.1.379-387.1987

32 Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, et al. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; **88:** 5096–100. https://doi.org/10.1073/pnas.88.12.5096

33 Chittiprol S, Chen P, Petrovic-Djergovic D, Eichler T, Ransom RF. Marker expression, behaviors, and responses vary in different lines of conditionally immortalized cultured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011; **301:** F660-71. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00234.2011

34 Ohse T, Pippin JW, Vaughan MR, Brinkkoetter PT, Krofft RD, Shankland SJ. Establishment of conditionally immortalized mouse glomerular parietal epithelial cells in culture. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19:** 1879–90. https://doi.org/10.1681/ASN.2007101087

35 Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; **7:** 2745–52. https://doi.org/10.1128/mcb.7.8.2745-2752.1987

36 Loyter A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res* 1982; **139:** 223–34. https://doi.org/10.1016/0014-4827(82)90336-6

37 Sanjana NE, Le Cong, Zhou Y, Cunniff MM, Feng G, Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* 2012; **7:** 171–92. https://doi.org/10.1038/nprot.2011.431

38 Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 2009; **326:** 1509–12. https://doi.org/10.1126/science.1178811

39 Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991; **5:** 1513–23. https://doi.org/10.1101/gad.5.9.1513

40 Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 2011; **29:** 143–48. https://doi.org/10.1038/nbt.1755

41 Morbitzer R, Römer P, Boch J, Lahaye T. Regulation of selected genome loci using de novo-engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107:** 21617–22. https://doi.org/10.1073/pnas.1013133107

42 Moscou MJ, Bogdanove AJ. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 2009; **326:** 1501. https://doi.org/10.1126/science.1178817

43 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227:** 680–85. https://doi.org/10.1038/227680a0

44 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 1992; **24:** 145–49.

45 Lin J-S, Lai E-M. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2017; **1615:** 211–19. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7033-9_17

46 Kaboord B, Perr M. Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2008; **424:** 349–64. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_27

47 Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989; **246:** 64–71. https://doi.org/10.1126/science.2675315

48 Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988; **60:** 2299–301. https://doi.org/10.1021/ac00171a028

49 Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat Genet* 2003; **33 Suppl:** 311–23. https://doi.org/10.1038/ng1106

50 Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; **422:** 198–207. https://doi.org/10.1038/nature01511

51 Koh GCKW, Porras P, Aranda B, Hermjakob H, Orchard SE. Analyzing protein-protein interaction networks. *J Proteome Res* 2012; **11:** 2014–31. https://doi.org/10.1021/pr201211w

52 Faini M, Stengel F, Aebersold R. The Evolving Contribution of Mass Spectrometry to Integrative Structural Biology. *J Am Soc Mass Spectrom* 2016; **27:** 966–74. https://doi.org/10.1007/s13361-016-1382-4

53 Siuzdak G. The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91:** 11290–97. https://doi.org/10.1073/pnas.91.24.11290

54 Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 2000; **72:** 1156–62. https://doi.org/10.1021/ac991131p

55 Wu CC, MacCoss MJ. Shotgun proteomics: tools for the analysis of complex biological systems. *Curr Opin Mol Ther* 2002; **4:** 242–50.

56 Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, et al. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2004; **32:** D115-9. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

57 Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; **26:** 1367–72. https://doi.org/10.1038/nbt.1511

58 Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016; **13:** 731–40. https://doi.org/10.1038/nmeth.3901

59 Le Cong, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; **339:** 819–23. https://doi.org/10.1126/science.1231143

60 Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14:** 49–55. https://doi.org/10.1038/nrm3486

61 Nemudryi AA, Valetdinova KR, Medvedev SP, Zakian SM. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae* 2014; **6:** 19–40.

62 Verkhusha VV, Lukyanov KA. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* 2004; **22:** 289–96. https://doi.org/10.1038/nbt943

63 Perez-Pinera P, Ousterout DG, Brown MT, Gersbach CA. Gene targeting to the ROSA26 locus directed by engineered zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res* 2012; **40:** 3741–52. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1214

64 Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989; **77:** 51–59. https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2

65 Chen S, Wassenhove-McCarthy D, Yamaguchi Y, et al. Podocytes require the engagement of cell surface heparan sulfate proteoglycans for adhesion to extracellular matrices. *Kidney Int* 2010; **78:** 1088–99. https://doi.org/10.1038/ki.2010.136

66 Itoh M, Nakadate K, Horibata Y, et al. The structural and functional organization of the podocyte filtration slits is regulated by Tjp1/ZO-1. *PLoS One* 2014; **9:** e106621. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106621

67 Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; **351:** 1296–305. https://doi.org/10.1056/NEJMoa041031

68 Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, et al. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13:** 630–38. https://doi.org/10.1681/ASN.V133630

69 Shankland SJ. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2006; **69:** 2131–47. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5000410

70 Hewitt SM, Fraizer GC, Wu YJ, Rauscher FJ, Saunders GF. Differential function of Wilms' tumor gene WT1 splice isoforms in transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1996; **271:** 8588–92. https://doi.org/10.1074/jbc.271.15.8588

71 Lorenzen J, Shah R, Biser A, et al. The role of osteopontin in the development of albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19:** 884–90. https://doi.org/10.1681/ASN.2007040486

72 Ratelade J, Arrondel C, Hamard G, et al. A murine model of Denys-Drash syndrome reveals novel transcriptional targets of WT1 in podocytes. *Hum Mol Genet* 2010; **19:** 1–15. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp462

73 Fang L, Wang B, Yang Z, Zhao T, Hao W. PNO1 promotes the progression of osteosarcoma via TGF-β and YAP/TAZ pathway. *Sci Rep* 2023; **13:** 21827. https://doi.org/10.1038/s41598-023-49295-8

74 Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 2006; **354:** 1387–401. https://doi.org/10.1056/NEJMra052131

75 Wong JS, Meliambro K, Ray J, Campbell KN. Hippo signaling in the kidney: the good and the bad. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; **311:** F241-8. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00500.2015

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wilms-Tumor-Gen und Wilms-Tumor-Protein 14
Abbildung 2: Schematische Darstellung des experimentellen Arbeitsablaufs 38
Abbildung 3: Zielvektordarstellung 40
Abbildung 4: Klonierung der fünf Zielvektoren 40
Abbildung 5: Konstruktion des Kontrollvektors 42
Abbildung 6: Western Blot mit Anti-FLAG-Staining der HEK293T-Zellen, ... 43
Abbildung 7: HSMP-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop 44
Abbildung 8: HSMP-Zellen im Western Blot 45
Abbildung 9: Primer-Ansatzpunkte am Vektor für die Integrations-PCR 46
Abbildung 10: Integrations-PCR 47
Abbildung 11: Exemplarische Fluoreszenzaufnahmen 49
Abbildung 12: Lysate und IP der HSMP-Zellen im Western Blot 50
Abbildung 13: Coomassie Färbung der IP- und Lysat-Proben 51
Abbildung 14: LFQ-Intensitäten der Massspec-Daten 53
Abbildung 15: Proportion of variance der Hauptkomponentenanalyse (PCA) 54
Abbildung 16: PC Scores für die zwei Hauptkomponenten 55
Abbildung 17: Volcano-Plots -log(p-Wert) zu log2 Foldchange 56
Abbildung 18: p-value Volcano with Highlights 57
Abbildung 19: Volcano-Plots q-Value 58
Abbildung 20: Highlight -log q-value 59

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz PCR 17
Tabelle 2: Reaktionszyklus PCR 18
Tabelle 3: Reaktionsansatz Restriktionsverdau 18
Tabelle 4: Reaktionsansatz Ligation 19
Tabelle 5: Reaktionsansatz Gibson Assembly 20
Tabelle 6: Reaktionsansatz Sequenzierung 21
Tabelle 7: Reaktionszyklus Sequenzierung 21
Tabelle 8: Material für Klonierungen 22
Tabelle 9: Verwendete DNA-Konstrukte 23
Tabelle 10: Verwendete Primer 24
Tabelle 11: Material für die Zellkultur 26
Tabelle 12: Material für Transfektionen 27
Tabelle 13: Material zum Ernten und Lysieren von Zellen 28

Tabelle 14: Material zur Proteindarstellung 31
Tabelle 15: Primärantikörper 32
Tabelle 16: Sekundärantikörper 32
Tabelle 17: Material für die Extraktion genomischer DNA 32
Tabelle 18: Material für IF 34
Tabelle 19: Primärantikörper 34
Tabelle 20: Sekundärantikörper 34
Tabelle 21: Material für IP 35
Tabelle 22: Material für MS 37