

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Funktionelle Genanalyse ausgewählter  
Albuminurie-Kandidatengene im Zebrafischmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Theodor Lorenzen

aus Berlin

Datum der Promotion: 03.12.2021

# Vorwort

Teile dieser Arbeit dienten als Vorbereitung und methodische Grundlage für weiterführende Untersuchungen, deren Ergebnisse bereits als Teil der folgenden Publikation veröffentlicht wurden:

Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage. eLife. 2019;8:e42068.

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Abbildungsverzeichnis</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1 Einleitung</b> .....   | <b>8</b>  |
| 1.1 Chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD).....  | 8         |
| 1.2 Albuminurie .....   | 10        |
| 1.2.1 Albuminurie als Diagnosemarker für die CKD und Prädiktor von Mortalität<br>und Morbidität in der allgemeinen Bevölkerung..... | 10        |
| 1.2.2 Genetische Determinanten der Albuminurie .....  | 13        |
| 1.3 Die Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Ratte als Tiermodell für die CKD .....  | 14        |
| 1.4 Identifizierung von Albuminurie-Kandidatengen .....   | 15        |
| 1.5 Der Zebrafisch (Danio rerio) .....  | 18        |
| 1.5.1 Danio rerio - ein etabliertes Modell in der medizinischen<br>Grundlagenforschung.....   | 18        |
| 1.5.2 Der Pronephros des Danio rerio als Modell in der nephrologischen<br>Forschung .....   | 19        |
| 1.6 Mutagenese.....   | 21        |
| 1.6.1 Ortsspezifische Nukleasen - ein Meilenstein der molekularen Forschung .   | 21        |
| 1.6.2 Das Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats<br>(CRISPR) / CRISPR-associated Protein (Cas)-System.....       | 22        |
| 1.7 Ziel der Arbeit .....   | 25        |
| <b>2 Material und Methoden</b> .....  | <b>27</b> |
| 2.1 Material.....   | 27        |
| 2.1.1 Chemikalien .....   | 27        |
| 2.1.2 Puffer und Lösungen.....  | 28        |
| 2.1.3 Enzyme .....  | 28        |
| 2.1.4 Kits und kompetente Zellen .....  | 28        |
| 2.1.5 Oligonukleotide .....   | 29        |
| 2.1.6 Transgene Zebrafische .....   | 29        |
| 2.1.7 Futtermittel und Materialien für die Tierhaltung.....   | 30        |
| 2.1.8 Sonstige Materialien .....  | 30        |
| 2.1.9 Geräte.....   | 31        |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.1.10   | Software.....   | 32        |
| 2.2      | Methoden .....  | 33        |
| 2.2.1    | Herkunft, Haltung und Zucht der Zebrafische .....                             | 33        |
| 2.2.2    | CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese.....                                       | 34        |
| 2.2.3    | Phänotypische Untersuchung .....  | 41        |
| 2.2.4    | Bioinformatische Analyse.....   | 44        |
| 2.2.5    | Statistische Analyse .....  | 44        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse .....</b>   | <b>45</b> |
| 3.1      | Bioinformatische Analyse .....  | 45        |
| 3.2      | Design der sgRNA.....   | 46        |
| 3.3      | Genotypisierung der Crispants .....   | 48        |
| 3.4      | Funktionelle Genanalyse bei Embryonen der Linie <i>Tg(wt1b:EGFP)</i> .....    | 51        |
| 3.4.1    | Hellfeldmikroskopische Untersuchung der Morphologie .....                     | 52        |
| 3.4.2    | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Pronephros .....                   | 54        |
| 3.5      | Funktionelle Genanalyse bei Larven der Linie <i>Tg(fabp10a:gc-EGFP)</i> ..... | 58        |
| <b>4</b> | <b>Diskussion.....</b>  | <b>65</b> |
| <b>5</b> | <b>Literaturverzeichnis .....</b>   | <b>80</b> |
|          | <b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>                                     | <b>91</b> |
|          | <b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen .....</b>              | <b>92</b> |
|          | <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>93</b> |
|          | <b>Publikationsliste .....</b>  | <b>94</b> |
|          | <b>Danksagung .....</b>   | <b>95</b> |

# Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Strukturiertes Assay für Gen-Knockdown-induzierte Schäden der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) beim Zebrafisch. (S. 43)
- Abb. 2** Lokalisation der Albuminurie-Kandidatengene im Genom von Homo sapiens (HSA), Rattus norvegicus (RNO) und Danio rerio (DRE). (S. 46)
- Abb. 3** Zielsequenzen für CRISPR/Cas9-vermittelten Gen-Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen beim Zebrafisch. (S. 48)
- Abb. 4** Genotypisierung von zwei Embryonen nach Knockdown von Transmembrane Protein 63c (*tmem63c*). (S. 50)
- Abb. 5** Genotypisierung von vier Embryonen nach Knockdown von Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) Exon 2. (S. 50)
- Abb. 6** Genotypisierung von zwei Embryonen nach Knockdown von Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) Exon 16. (S. 51)
- Abb. 7** Genotypisierung von drei Embryonen nach Knockdown von NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1 (*noxred1*). (S. 51)
- Abb. 8** Morphologie von Zebrafischembryonen nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen. (S. 53)
- Abb. 9** Der Pronephros des Zebrafischs. (S. 55)
- Abb. 10** Strukturelle Untersuchung des Pronephros von Zebrafischembryonen nach CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen. (S. 55)
- Abb. 11** Tubulärer Winkel und tubuläre Distanz im Pronephros des Zebrafischs. (S. 57)
- Abb. 12** Quotient der tubulären Winkel im Pronephros nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen beim Zebrafisch. (S. 57)
- Abb. 13** Tubuläre Distanz im Pronephros nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen beim Zebrafisch. (S. 58)
- Abb. 14** Fluoreszenz von Zebrafischlarven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*. (S. 60)
- Abb. 15** Prozentuale Anteile der phänotypischen Gruppen an der Gesamtgruppengröße bei Larven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*. (S. 62)
- Abb. 16** Effekt des Knockdowns von Albuminurie-Kandidatengenen auf die intravasale Fluoreszenz bei Zebrafischlarven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*. (S. 63)

## Abstract

Der erhöhte renale Albuminverlust ( $U_{Alb}$ ) ist ein mögliches Symptom einer gestörten glomerulären Filtration. Die Messung der  $U_{Alb}$  ist im klinischen Gebrauch etabliert. Relevant ist sie insbesondere für die Diagnostik, Stadieneinteilung und Prognostik epidemiologisch bedeutsamer chronischer Nierenerkrankungen. Bereits eine geringfügig erhöhte  $U_{Alb}$  im Sinne einer Mikroalbuminurie wurde mit einer erhöhten renalen und kardiovaskulären Mortalität und Morbidität assoziiert. Vor diesem Hintergrund ist die detaillierte Analyse der Ursachen und Pathomechanismen der Albuminurie sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit sollten drei in einem Rattenmodell identifizierte Kandidatengene für Albuminurie, *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1*, mit Hilfe funktioneller Genanalysen beim Zebrafisch untersucht werden. Der Pronephros des Zebrafischs verfügt ebenso wie die menschliche Niere über Nephrone als zentrale Funktionseinheiten. Ausgeprägte anatomische und funktionelle Parallelen zur glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) des Menschen machen ihn zu einem sehr gut geeigneten Modellorganismus in der nephrologischen Forschung.

Die Grundlage der funktionellen Genanalysen bildeten CRISPR/Cas9-basierte Funktionsverluststudien. Der Knockdown der Kandidatengene erfolgte bei Zebrafischembryonen im Einzellstadium. Es kamen zwei transgene Zebrafischlinien zum Einsatz, die strukturelle und funktionelle Analysen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten ermöglichten. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Pronephros bei der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* erfolgte 48 Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization, hpf), um dessen strukturelle Integrität zu beurteilen. Eine funktionelle Untersuchung der GFB wurde 120 hpf bei der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* durchgeführt. Hierzu wurde die intravasale Konzentration des fluoreszierenden Tracerproteins gc-EGFP fluoreszenzmikroskopisch beurteilt, um Rückschlüsse auf einen renalen Proteinverlust zu ziehen. Das Protein ist bezüglich seiner molekularen Eigenschaften mit Humanalbumin vergleichbar und als dessen Surrogat etabliert.

Im Rahmen der Analyse 48 hpf wurde in allen Crispant-Gruppen die grundsätzliche strukturelle Integrität des Pronephros nachgewiesen. Tiefgreifende Entwicklungsstörungen in Folge der durchgeführten Versuche wurden ausgeschlossen.

In der funktionellen Untersuchung der GFB konnten alle Kandidatengene mit einer verminderten intravasalen gc-EGFP-Konzentration assoziiert werden. Dies manifestierte sich unter anderem in einer signifikanten Reduktion des Anteils stark fluoreszierender Larven nach Knockdown von *tmem63c* ( $p < 0,0002$ ), *pomt2* (Exon 2) ( $p < 0,02$ ) und *noxred1* ( $p < 0,02$ ) im Vergleich zur Kontrolle.

Die Reduktion der intravasalen gc-EGFP-Konzentration bei Larven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* spricht für eine funktionelle Beeinträchtigung der pronephrischen GFB und stellt ein Surrogat für einen renalen Albuminverlust dar. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine Bedeutung von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* für die normale GFB-Funktion beim Zebrafisch und bestätigen ihre zuvor erfolgte Identifikation als Kandidatengene für Albuminurie. Sie leisten einen Beitrag zum besseren pathogenetischen Verständnis der Albuminurie. Weiterführende Untersuchungen beim Zebrafisch und beim Humanpatienten sollen die Erkenntnisse ergänzen, um neue therapeutische Targets zu identifizieren.

## **Abstract**

Increased urinary albumin excretion (UAE) represents a possible sign of impaired glomerular filtration barrier (GFB) function. It serves as a well-established parameter for diagnosis and clinical staging of chronic kidney disease (CKD). Even slight elevations of UAE as defined by the term microalbuminuria have been associated with increased risk of renal and cardiovascular morbidity and mortality. In addition to the considerable epidemiological relevance of CKD, this raises the need for a detailed pathogenetic understanding of albuminuria. Here, three previously identified candidate genes for albuminuria, namely *tmem63c*, *pomt2* and *noxred1*, were investigated in the zebrafish model to analyze their potential role for albuminuria development and integrity of the GFB. Like the human kidney, the zebrafish pronephros consists of central elements called nephrons. Extensive anatomical and physiological similarities with the human GFB make it a very suitable model organism for nephrological studies.

CRISPR/Cas9-mediated loss-of-function studies were performed on one-cell-stage zebrafish embryos. Two transgenic lines were used to facilitate structural and functional

analyses at different developmental stages. At 48 hours post fertilization (hpf), structural integrity of glomeruli and tubuli of *Tg(wt1b:EGFP)*-embryos was assessed using fluorescence microscopy. At 120 hpf, intravascular fluorescence was determined optically in *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*-larvae to evaluate glomerular leakage of the fluorescent tracer protein gc-EGFP. This protein shares molecular characteristics with human albumin and serves as its well-established surrogate.

The analysis at 48 hpf showed generally preserved integrity of pronephric structures in all groups. Severe developmental impairment as a result of the executed procedures could be ruled out. At 120 hpf, the functional *in vivo*-analysis of the GFB in *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*-larvae revealed an association of all candidate genes with significant reduction of intravascular gc-EGFP. The manifestation of this phenotype included a reduction of strongly fluorescent larvae after knockdown of *tmem63c* ( $p < 0.0002$ ), *pomt2* (Exon 2) ( $p < 0.02$ ) and *noxred1* ( $p < 0.02$ ) as compared to control larvae.

The reduced intravascular concentration of gc-EGFP indicates a functional impairment of the pronephric GFB after knockdown of candidate genes. This serves as a disease model for albuminuria. These findings support the significance of *tmem63c*, *pomt2* and *noxred1* for normal GFB function in zebrafish and confirm their previously established role as candidate genes for albuminuria. Results of this thesis might facilitate a more detailed understanding of albuminuria and serve as a basis for further investigation in zebrafish and human patients.



# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD)

Der Begriff CKD beschreibt ein weltweit häufiges, komplexes Krankheitsbild heterogener Pathogenese, bei dem eine über mindestens drei Monate bestehende Anomalie der Nierenstruktur oder -funktion zu einer Einschränkung der Gesundheit und einem erhöhten Mortalitätsrisiko führt [1]. Die paarig angelegten Nieren erfüllen als Ausscheidungsorgane regulierende Funktionen von essenzieller Bedeutung für den Wasser-, Mineral-, und Säure-Basen-Haushalt. Sie scheiden Fremdstoffe und Stickstoffendprodukte aus und sind darüber hinaus an der Biosynthese verschiedener Hormone wie Renin, Erythropoietin und Calcitriol beteiligt [2]. Durch die zahlreichen exkretorischen und endokrinen Aufgaben der Nieren ergeben sich bei eingeschränkter Nierenfunktion vielfältige Symptome, die verschiedene Regulationssysteme des Körpers betreffen können und insbesondere mit einem erhöhten Risiko für renale und kardiovaskuläre Komplikationen assoziiert sind. Eine frühe Diagnose der CKD wird durch die anfänglich häufig unspezifischen und gering ausgeprägten Symptome wie verringerter kognitiver Leistungsfähigkeit, Appetitlosigkeit, Anämie oder Folgesymptome der Hypertonie erschwert, die bei Progredienz der CKD in die typischen Urämiesymptome übergehen können [1]. Im Mittelpunkt des therapeutischen Managements der CKD stehen die Progressionsverzögerung sowie die Prävention und Behandlung von Komplikationen. Unter anderem spielen allgemeine Maßnahmen zur Reduktion des kardiovaskulären Risikos, die Einstellung des Blutdrucks, die Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Kontrolle weiterer metabolischer Parameter eine Rolle [1]. Als klinische Parameter für die Diagnostik, Stadieneinteilung und Verlaufskontrolle der CKD dienen die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Albuminausscheidung im Urin ( $U_{Aib}$ ).

In der klinischen Praxis liegt laut KDIGO (Kidney Disease - Improving Global Outcomes) definitionsgemäß eine CKD vor, wenn über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten entweder die GFR weniger als  $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$  beträgt oder eine

pathologische  $U_{\text{Alb}}$  von  $> 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$  besteht [1]. Pathoanatomisch können glomeruläre, tubulointerstitielle, vaskuläre und zystische Störungen als Ursache der CKD unterschieden werden. Zudem werden primär renale Krankheitsprozesse und solche, die auf systemische Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, arterielle Hypertonie, systemische Infektionen oder Vaskulitiden zurückzuführen sind, differenziert. Viele der möglichen Grunderkrankungen entwickeln sich über Jahre hinweg und erlauben zum Zeitpunkt der Diagnose der CKD lediglich eine Verlangsamung ihrer Progression und die Verringerung von Komplikationsrisiken [1]. Die zu einer chronisch eingeschränkten Nierenfunktion im Sinne der CKD führenden Grunderkrankungen sind vielfältig und ihre epidemiologischen Gewichtungen global verschieden. Während in Ländern mit niedrigen hygienischen Standards Infektionskrankheiten und Glomerulonephritiden zu den häufigsten Gründen für eine CKD gehören, stellen in den Industrieländern insbesondere Diabetes mellitus Typ 2 und arterielle Hypertonie häufige Grunderkrankungen dar [3]. Bei Progredienz kann die CKD unabhängig von der initialen Pathologie zu einer terminalen Niereninsuffizienz mit einer GFR von weniger als  $15 \text{ ml}/\text{min}/1,73 \text{ m}^2$  führen [1, 4].

Die CKD ist aufgrund ihrer steigenden globalen Prävalenz und des hohen Risikos für kardiovaskuläre und renale Komplikationen von großer epidemiologischer Bedeutung [1, 5, 6]. Für die Prävalenz der CKD bestehen global und innerhalb Europas große regionale Unterschiede. Eine vergleichende Studie der European Renal Association identifizierte im innereuropäischen Vergleich Nordostdeutschland als die Region mit der höchsten Prävalenz für CKD Stadium 3-5 bei Patienten im Alter von 45-74 Jahren [7]. Diese lag laut SHIP-Studie (Study of Health in Pomerania) 2003 bei 11,5 % [8]. Neben den regional variierenden Prävalenzen der in den Industrieländern wichtigsten Risikofaktoren hohes Lebensalter, Diabetes mellitus Typ 2, arterielle Hypertonie und Adipositas [3] wurden insbesondere der soziökonomische Status, differierende Lebensweisen und Unterschiede in der Qualität der medizinischen Versorgung als mögliche Ursachen für die ungleiche regionale Verteilung der CKD-Patienten diskutiert [7]. Steigende Patientenzahlen für Diabetes mellitus Typ 2, arterielle Hypertonie und Adipositas in Deutschland erlauben in Verbindung mit dem steigenden durchschnittlichen Alter der Bevölkerung die Prognostizierung einer auch zukünftig steigenden Prävalenz der CKD und ihrer fortschreitenden Manifestierung als wachsendes Problem für das Gesundheitswesen [3]. Zusätzlich zu den Kosten, die den

nationalen Gesundheitssystemen durch die primäre Diagnostik und Therapie der CKD entstehen, fallen weitere hohe finanzielle Belastungen durch die zahlreichen Komplikationen an, die zu gehäuften und verlängerten Krankenhausaufenthalten führen können. Insbesondere die Therapie des terminalen Nierenversagens, für welches das Risiko bei Patienten mit CKD und bestehender Proteinurie im Vergleich zu Patienten ohne CKD und pathologischem renalen Proteinverlust um das 33-fache erhöht ist, gestaltet sich kostenintensiv [9]. Ebenso muss bei Patienten mit CKD berücksichtigt werden, dass einige Medikamente relevant durch die Nieren eliminiert werden und Dosisanpassungen oder Kontraindikationen beachtet werden müssen. Die Anpassung von Therapieschemata und diagnostischen Maßnahmen kann ebenfalls zusätzliche Aufwendungen verursachen [1].

## 1.2 Albuminurie

### 1.2.1 Albuminurie als Diagnosemarker für die CKD und Prädiktor von Mortalität und Morbidität in der allgemeinen Bevölkerung

Aus der im Anfangsstadium häufig unspezifischen und schwach ausgeprägten Symptomatik der CKD resultiert eine erschwerte Diagnosestellung [10]. Zur Diagnostik kommen daher gezielte Screening-Maßnahmen zur Anwendung. Die Messung der  $U_{Aib}$  wird als standardisierte und zuverlässige Methode zur Diagnostik, Verlaufskontrolle und Prognostik der CKD empfohlen und außerdem zur Stadieneinteilung verwendet [1, 11, 12]. Als Albuminurie wird ein abnormal hoher Verlust des Plasmaproteins Albumin mit dem Urin bezeichnet, wobei eine  $U_{Aib}$  von 30 mg oder mehr in 24 h als pathologisch angesehen wird. Mit seiner hohen Plasmakonzentration von 35-55 g/l ist Albumin von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks und damit für den regulierten Flüssigkeitstransport über Kapillarwände und die Verhinderung von Ödemen [13]. Außerdem fungiert es als Transportprotein verschiedener kleinmolekularer Verbindungen, wie freien Fettsäuren, Bilirubin und Calcium-Ionen sowie von Arzneistoffen. Eine Erläuterung der mikroanatomischen Strukturen und physiologischen Prozesse, die der Filtrationsfunktion der Nieren zu Grunde liegen, soll

ein besseres Verständnis der Albuminretention und der Pathogenese der CKD ermöglichen.

Unter physiologischen Bedingungen wird alle 5 Minuten das gesamte Blutvolumen durch die Kapillarnetze der Nephrone befördert und in den Glomeruli, den Filtereinheiten der Niere mit einem Durchmesser von ca. 200  $\mu\text{m}$ , filtriert. So werden täglich etwa 180 l Primärharn als Ultrafiltrat des Plasmas gebildet [14]. Insgesamt besitzt der Mensch im Mittel etwa zwei Millionen Nephrone, die sich als Funktionseinheiten der Niere jeweils aus einem Glomerulum und den dazu gehörigen Nierentubuli zusammensetzen. Ein Glomerulum besteht aus verzweigten, schlingenartig angeordneten Kapillaren, die von der doppelwandigen Bowman-Kapsel umschlossen werden. Deren viszerales und parietales Blatt bilden den schmallumigen Kapselraum, welcher wiederum am Harnpol in das proximale Tubuluslumen übergeht [15]. Die glomeruläre Filtrationsbarriere (GFB) erlaubt als dynamische Schranke zwischen Blut und Harn die Filtration von Wasser und kleinen gelösten Teilchen wie Salzionen und Harnstoff, während Proteine und Blutzellen zurückgehalten werden [15]. Ihre drei funktionellen Komponenten sind das fenestrierte Kapillarendothel, die glomeruläre Basalmembran (GBM) und die hoch spezialisierten Podozyten [16]. Die Komponenten ermöglichen eine selektive Permeation von Makromolekülen in Abhängigkeit von deren Größe, Form und Anzahl an Festladungen [15]. Das fenestrierte Endothel der Kapillaren weist Poren mit einem Durchmesser von etwa 60-70 nm auf und ist luminal von einer anionischen Glykokalyx überzogen [17]. Die GBM ist zwischen dem Kapillarendothel und den Podozyten lokalisiert [16]. Sie dient einerseits zur Verankerung der beidseitig anliegenden Zellen über Zelladhäsionsproteine und andererseits als weiterer ladungssensitiver Filter, dessen negative Ladung auf die enthaltenen Heparansulfat-Proteoglykane zurückzuführen ist. Die Podozyten sind mit ihren zahlreichen Fortsätzen fest in der GBM verankert und verknüpfen sich untereinander mit Hilfe von Transmembranproteinen [15]. So grenzen sie die Kapillarschlingen netzartig vom Harnraum ab. Die etwa 25-60 nm breiten Schlitze zwischen den Podozytenfüßchen werden von einem Schlitzdiaphragma bedeckt, welches durch Filtrationsporen permeabel bleibt [14]. Auf der Harnseite sind die Podozytenfüßchen von einer negativ geladenen Glykokalyx bedeckt [15]. Für die größenabhängige Selektivität der GFB werden insbesondere die GBM und die Podozytenporen verantwortlich gemacht [16]. Die Ladungsselektivität der GFB beruht auf den negativ geladenen Komponenten der

Glykokalyces und der GBM [2, 18]. Der Siebungskoeffizient eines Moleküls ist ein Maß für seine Transportrate in Relation zu der von Wasser. Aufgrund der negativen Nettoladung, des Molekülradius von 3,6 nm und des Molekulargewichts von etwa 69 Kilodalton (kDa) passiert Albumin unter physiologischen Bedingungen mit einem geschätzten Siebungskoeffizienten von 0,0001-0,0006 nur in geringen Mengen die GFB [2]. Die Reabsorption des filtrierte Albumins durch rezeptorgesteuerte Endozytose im proximalen Tubulussystem führt zu einer weiteren Reduktion des Albumingehalts in der tubulären Flüssigkeit, sodass Albumin im Endharn nur noch in Spuren vorhanden ist [2]. Eine erhöhte Albuminkonzentration im Urin kann demnach auf eine Funktionseinschränkung der tubulären Reabsorption oder auf eine Überschreitung der Reabsorptionskapazität aufgrund einer gestörten glomerulären Filtration zurückzuführen sein [2, 13, 14]. In zahlreichen Studien konnten die Bedeutung der Albuminurie als relevanter Marker für renales Risiko in nierenerkrankten Patienten belegt und die prädiktive Aussagekraft einer erhöhten  $U_{Aib}$  für eine langfristig sinkende GFR und die Progression der CKD bis hin zu einem terminalen Nierenversagen gezeigt werden [12, 19]. Hallan et al. zeigten, dass das Risiko der Progression zu einem terminalen Nierenversagen unabhängig von Alter, Geschlecht und geschätzter GFR um das 13-fache ansteigt, wenn eine Mikroalbuminurie vorliegt [19]. Doch ist die  $U_{Aib}$  nicht nur eine Konsequenz einer dysfunktionalen renalen Filtration, sondern übt ihrerseits eine schädigende Wirkung auf die beteiligten mikroanatomischen Strukturen aus und beeinflusst somit den Krankheitsverlauf. Eine intrinsisch nephrotoxische Wirkung von Albumin zeigten *in vitro*-Versuche mit kultivierten proximalen Tubuluszellen, in denen durch Applikation von bovinem Serumalbumin eine dosisabhängige Induktion apoptotischer Signalwege erzielt wurde [20].

Darüber hinaus konnte eine erhöhte  $U_{Aib}$  mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko und einer erhöhten Inzidenz zusätzlicher kardiovaskulärer Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie, Arteriosklerose und Diabetes mellitus assoziiert werden [21, 22, 23]. Yudkin et al. assoziierten die Albuminurie bereits 1988 unabhängig von anderen Risikofaktoren mit Pathologien in koronaren und peripheren Gefäßen [24]. Seitdem konnte in zahlreichen Studien belegt werden, dass bei Patienten mit CKD, aber auch in der normotensiven, nicht diabetischen Allgemeinbevölkerung die Albuminurie ein signifikanter Prädiktor für kardiovaskuläre und nicht kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität ist [24, 25, 26]. Der kardioprotektive Effekt einer medikamentösen Senkung

der Albuminurie konnte unter Ausschluss anderer kardiovaskulärer Risikofaktoren gezeigt werden [27, 28].

### 1.2.2 Genetische Determinanten der Albuminurie

Die Identifizierung krankheitsregulierender Gene und die genaue Kenntnis ihrer pathogenetischen Funktion sind wesentliche Voraussetzungen für die Ausarbeitung spezifischer und effektiver Therapiekonzepte, die insbesondere auf eine frühe Bekämpfung von Krankheitsursachen abzielen. Im Kontext chronisch progredienter Erkrankungen wie der CKD sind sie somit von großer Bedeutung. Neue Erkenntnisse über am Krankheitsgeschehen beteiligte Gene können beispielsweise als Grundlage für die Weiterentwicklung der personalisierten Medizin dienen und so eine präzise und wirksame Medikation ermöglichen. Auch die Gentherapie, deren Ansätze auf einer präzisen, ortsspezifischen Modifikation der DNA-Sequenz beruhen, ist als mögliche Therapie für erworbene und vererbte Erkrankungen mit lokalisierter genetischer Komponente Bestandteil intensiver Forschung [29]. Die Identifizierung der pathophysiologisch relevanten Gene gestaltet sich besonders für polygenetisch determinierte Erkrankungen als komplexe Aufgabe, da die phänotypische Manifestation auf den Auswirkungen der vielschichtigen epistatischen und ökogenetischen Interaktionen mehrerer Gene beruht. Im Kontext der CKD könnten nach bisherigen Erkenntnissen zahlreiche Gene an verschiedenen Pathomechanismen beteiligt sein. Zu diesen Pathomechanismen gehören eine generalisierte endotheliale Dysfunktion, strukturelle Schädigungen an der GFB oder im Tubulussystem, funktionelle Schäden ohne ursächliche strukturelle Korrelate, immunologische und inflammatorische Prozesse, sowie defekte, molekulare Reparaturmechanismen oder solche auf Zellebene, die das Nierengewebe betreffen [30]. Die umfassende Charakterisierung möglicher genetischer Determinanten wird durch eine differenzierte Betrachtung isolierter, phänotypischer Schlüsselaspekte wie der  $U_{Alb}$  ermöglicht. Im Rahmen einer Kandidatengenanalyse können ausgewählte Gene hinsichtlich ihres Einflusses auf den Phänotyp mit verschiedenen etablierten Methoden wie Mutations- und Funktionsanalysen untersucht werden. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgt basierend auf Hypothesen. Als Grundlage können Daten zu bereits im Kontext verwandter Erkrankungen charakterisierten Genen dienen. Außerdem können

Assoziations- und Kopplungsanalysen durchgeführt werden, um neue Kandidatengene zu identifizieren. Diese Methoden eignen sich insbesondere zur Erforschung polygenetisch determinierter Erkrankungen. Mit ihrer Hilfe werden chromosomale Abschnitte lokalisiert, die im nachweislichen Zusammenhang mit einem vererbten Phänotyp stehen. Auf diesen Abschnitten gelegene, bisher unbekannte Gene können in folgenden Untersuchungen berücksichtigt werden. Kodiert ein Genlocus für ein quantitatives Merkmal wie die  $U_{\text{Alb}}$ , wird er als Quantitative Trait Locus (QTL) bezeichnet. Durch genomweite Assoziationsstudien konnte die Erblichkeit der Albuminurie für diabetische Patienten, solche mit arterieller Hypertonie und die allgemeine Bevölkerung ohne entsprechende Risikofaktoren konkretisiert werden. Es wurden mehrere korrespondierende QTL lokalisiert [30-33].

### **1.3 Die Munich-Wistar-Frömter (MWF)-Ratte als Tiermodell für die CKD**

Eine hohe genetische Heterogenität, begrenzte Präzision humaner Kopplungsanalysen, schwer kontrollierbare Umwelteinflüsse und unterschiedliche Lebensstile schränken die statistische Aussagekraft von Humanstudien ein und erschweren somit die Identifizierung von Kandidatengenen [34]. Die Verwendung von Tiermodellen stellt eine Möglichkeit dar, diese Problematiken zu umgehen und wird bei Befolgung rechtlicher und ethischer Richtlinien als probates Mittel zur Erforschung pathogenetischer Kausalitäten und genetischer Determinanten angesehen. Insbesondere die Wanderratte (*Rattus norvegicus*) eignet sich aufgrund ihrer anatomischen und physiologischen Eigenschaften, der detaillierten Kenntnisse über diese und einfacher, standardisierter Zucht- und Haltungsbedingungen als Modellorganismus zur molekularen Charakterisierung humaner Krankheitsbilder. Sie ist seit Jahrzehnten fester Bestandteil der nephrologischen und genetischen Forschung [34]. Durch mehrfache, selektive Bruder-Schwester-Verpaarungen können den zu untersuchenden Phänotyp ausbildende Inzuchtstämme mit hoher genetischer Homogenität von über 99 % generiert werden. Diese können nachfolgend für Kosegregations- und Kopplungsanalysen genutzt werden [35]. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der Züchtung konsomer und kongener Stämme. Hierbei erfolgt die Introgression eines

bestimmten Chromosoms oder Chromosomabschnitts vor den genetischen Hintergrund eines bezüglich des zu untersuchenden Merkmals kontrastierenden Stammes. Auf diese Weise können QTL eingegrenzt und ihre phänotypische Relevanz verifiziert werden. Schulz et al. nutzten das MWF-Rattenmodell, um die genetischen Determinanten einer erhöhten  $U_{Aib}$  zu identifizieren [36]. Dabei handelt es sich um einen Inzuchtstamm, der in den 1980er Jahren auf Basis des Munich Wistar-Stammes durch die Selektion der Tiere mit besonders hoher Anzahl subkapsulärer Glomeruli generiert wurde, um Mikropunktionsstudien im Cortex corticis zu ermöglichen [37]. Die phänotypische Charakterisierung des Inzuchtstammes ergab, dass sich männliche MWF-Ratten durch die frühe, spontane Ausbildung einer progredienten Albuminurie und eine moderate, salzsensitive Hypertonie auszeichnen [37, 38]. Diesen Eigenschaften liegt ein charakteristischer struktureller Phänotyp zugrunde, der eine Reduktion der Nephronzahl um 30-50 %, vergrößerte glomeruläre Volumina, renale interstitielle Fibrose und ausgeprägte, altersabhängige Glomerulosklerose beinhaltet [36, 37, 39]. Weibliche Tiere sind von den Phänomenen der progredienten Proteinurie und der Glomerulosklerose deutlich weniger betroffen, sodass bezüglich dieser Eigenschaften im Einklang mit bisherigen Erkenntnissen aus Humanstudien ein sexueller Dimorphismus konstatiert werden konnte [40, 41].

## 1.4 Identifizierung von Albuminurie-Kandidatengen

Um genetische Determinanten der  $U_{Aib}$  zu bestimmen und einen möglichen Zusammenhang zur Pathogenese von reduzierter Nephronzahl, Glomerulosklerose und interstitieller Fibrose zu analysieren, wurde von Schulz et al. eine genomweite QTL-Analyse durchgeführt. Als Modell diente unter anderem die Rückkreuzungspopulation aus MWF und der spontan hypertensiven Ratte (SHR) [36]. Die SHR, ein insbesondere wegen seiner fundamentalen Bedeutung in der Hypertonieforschung gut charakterisiertes Krankheitsmodell, zeichnet sich bei einer ausgeprägten arteriellen Hypertonie im Gegensatz zum MWF-Inzuchtstamm durch eine sehr niedrige  $U_{Aib}$  und allenfalls geringe strukturelle Veränderungen in der Nierenhistologie aus, welche lediglich in der fortgeschrittenen zweiten Lebenshälfte nachweisbar sind [36, 42]. Die Bestimmung der  $U_{Aib}$  bei Ratten im Alter von acht Wochen zeigte 55-fach erhöhte Werte



für MWF im Vergleich zu SHR [42]. Als Ergebnis der Kosegregations- und Kopplungsanalyse wurden acht QTL mit signifikanter Kopplung zu der bestimmten  $U_{Aib}$  identifiziert. Der bedeutendste Locus, welcher bereits bei jungen Tieren im Alter von acht Wochen eine signifikante Kopplung aufwies, lag auf Rattenchromosom (RNO) 6 [36, 42]. Zusätzlich konnte für diesen QTL eine signifikante Kopplung zur Ausprägung der interstitiellen Fibrose beim adulten Tier nachgewiesen werden [36]. Der Stellenwert des QTL auf RNO6 wurde durch die Generierung und phänotypische Charakterisierung des konsomen Stammes MWF-6<sup>SHR</sup> bestätigt. Hierzu wurde auf Grundlage der albuminurischen MWF-Ratte das Chromosom 6 durch eine markerbasierte Rückkreuzungsstrategie mit dem entsprechenden Chromosom der nierengesunden SHR-Ratte ersetzt. Die frühzeitige Ausbildung einer Albuminurie und deren intensive Progredienz konnten so verhindert werden [42]. Erst im Alter von 18 Wochen überstieg die  $U_{Aib}$  der konsomen Tiere die der gleichaltrigen SHR-Ratten signifikant. Darüber hinaus wurden durch den Austausch des Chromosoms ebenfalls Nierenretentionsparameter und strukturelle Nierenschäden wie interstitielle Fibrose und Glomerulosklerose signifikant vermindert [42].

Die Generierung und Charakterisierung von neun kongenen Rattenstämmen ermöglichte nachfolgend eine weitere Eingrenzung des QTL. Diese Stämme enthielten auf der Basis des MWF-Genoms unterschiedliche chromosomale Fragmente aus dem RNO6 des kontrastierenden Parentalstammes SHR [43]. Somit konnte ein auf RNO6 lokalisiertes, für die  $U_{Aib}$  relevantes Intervall identifiziert werden, das für 95 % der Albuminurie-Differenz zwischen den Linien MWF und MWF-6<sup>SHR</sup> verantwortlich war. Das Intervall mit einer Gesamtgröße von 4,9 Mb wurde als Uae22 bezeichnet. Innerhalb dieses Locus sind 75 proteinkodierende Gene lokalisiert [44].

Durch differentielle messenger RNA (mRNA)-Genexpressionsanalysen in isolierten Glomeruli der Rattenstämmen MWF, SHR und MWF-6<sup>SHR</sup> sollten phänotypisch relevante Gene identifiziert werden. Diese erfolgten mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR). Dazu wurden Gewebeproben aus den Glomeruli vier und acht Wochen alter Versuchstiere präpariert [43]. In diesem Alter setzt die albuminurische Symptomatik der MWF-Ratten ein [36]. Für die Qualifikation als Albuminurie-Kandidatengen musste ein Gen eine differentielle Expression und zu mindestens einem Zeitpunkt eine allelische Regulation aufweisen. Für eine differentielle Genexpression

musste mittels qPCR eine signifikante Änderung der mRNA-Expression zwischen MWF und SHR nachgewiesen werden. Die allelische Regulation war gegeben, wenn die mRNA-Expression bei MWF signifikant von SHR und MWF-6<sup>SHR</sup> abwich, während sie bei MWF-6<sup>SHR</sup> dem SHR-Niveau entsprach. Mit diesem Selektionsverfahren konnten zehn Kandidatengene bestimmt werden. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit innerhalb der Prioritätengene eine Auswahl getroffen, um die vielversprechendsten Kandidaten für die Entwicklung einer Proteinurie beim Zebrafisch mittels funktioneller Genanalysen zu validieren. Für sieben der zehn identifizierten Kandidatengene sind Orthologe beim Zebrafisch bekannt [45]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* für eine weiterführende Analyse beim Zebrafisch ausgewählt. Für diese drei Kandidatengene wiesen MWF-Ratten nach vier und acht Wochen eine signifikant höhere mRNA-Expression auf als gleichaltrige SHR-Ratten.

Die Analyse von *Tmem63c* ergab nach vier und acht Wochen bei MWF eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu SHR und MWF-6<sup>SHR</sup>. Somit wurde die differentielle Genexpression zu zwei Zeitpunkten nachgewiesen. Diese Erkenntnisse wurden im Rahmen einer umfangreichen funktionellen Genanalyse von *Tmem63c* in Bezug auf Nierenschäden bereits von der Arbeitsgruppe publiziert [43]. Darüber hinaus zeigten sich statistisch signifikante Hochregulationen von *Pomt2* und *Noxred1* für MWF im Vergleich zu SHR zu beiden Zeitpunkten. Dahingegen entsprach die mRNA-Expression von *Pomt2* und *Noxred1* bei den konsomen Tieren der Linie MWF-6<sup>SHR</sup> dem Niveau von SHR. Demnach wurden eine differentielle Expression und eine allelische Regulation belegt. Bei diesen Erkenntnissen zu *Pomt2* und *Noxred1* handelt es sich um bisher nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe, die nicht im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden, sondern als ihre Grundlage dienten. Ergänzende Analysen sowie die Publikation der Ergebnisse sind geplant.

## 1.5 Der Zebrafisch (*Danio rerio*)

### 1.5.1 *Danio rerio* - ein etabliertes Modell in der medizinischen Grundlagenforschung

Der Zebrafisch ist ein erfolgreich etabliertes Tiermodell von wachsender Bedeutung für entwicklungsbiologische und genetische Analysen und die Erforschung menschlicher Pathologien. Nach der Entdeckung des tropischen Süßwasserfisches als Modellorganismus der vertebralen Organogenese in den 1980er Jahren [46] trugen Kopplungsanalysen [47] und Mutagenesestudien [48, 49, 50] zur umfangreichen Charakterisierung des Tiermodells bei. Der rapide ansteigende Stellenwert des Zebrafisches für die naturwissenschaftliche Forschung liegt in seinen anatomischen und physiologischen Charakteristika begründet [48]. Die Generationszeit von Zebrafischen beträgt nur 2-4 Monate. Geschlechtsreife Weibchen können wöchentlich etwa 200 Nachkommen zeugen, die sich innerhalb von 48 h von der Zygote zu freischwimmenden Larven entwickeln [51]. Die extrauterine Entwicklung der Larven, ihre Größe und ihre optische Transparenz vereinfachen die Analyse zahlreicher phänotypischer Merkmale und schaffen ideale Voraussetzungen für die Mikroinjektion in Embryonen [48, 49, 52]. Dies macht den Zebrafisch zu einem wertvollen Modellorganismus für Funktionsverlust- und Überexpressionsstudien. Darüber hinaus fallen durch die Möglichkeit der Schwarmhaltung und verhältnismäßig geringen tierpflegerischen Arbeitsumfang überschaubare laufende Kosten an [48]. Zu Beginn des 21. Jahrhunderts initiierte das Wellcome Trust Sanger-Institut in Hinxton, Großbritannien, die komplette Genomsequenzierung des *Danio rerio* und ebnete damit den Weg für Methoden der reversen Genetik [53]. Unter mehr als 26.000 kodierenden Genen konnte etwa 70 % der humanen Gene und 82 % aller beim Menschen identifizierten krankheitsassoziierten Gene mindestens ein Ortholog im Zebrafisch zugewiesen werden [53]. Auf Basis des vollständig sequenzierten Genoms wurde außerdem die Generierung transgener Linien forciert, die detaillierte *in vivo*-Analysen zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Prozesse ermöglichen. Transgene Tiere, deren Genom durch die Integration eines fremden Gens modifiziert wurde, kommen seit den frühen 1980er Jahren in der translationalen Forschung zum Einsatz [54]. Seit der Generierung der ersten transgenen Zebrafischlinie durch Stuart et

al. im Jahr 1988 [55] wurden zahlreiche weitere Linien etabliert. Mit ihrer Hilfe wurden funktionelle Genanalysen durchgeführt [56], regulatorische Elemente charakterisiert [54] oder Strukturen durch fluoreszente Proteine dargestellt und somit molekulare Fragestellungen aus verschiedenen medizinischen Bereichen erörtert [58, 59]. Die Popularität des Zebrafischs als Modellorganismus der präklinischen und translationalen Forschung wurde weiter gefördert durch die Etablierung und Verbesserung neuer Mutagenese-Techniken, wie Zinc Finger Nucleases (ZFNs) [60], Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) [61] und Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR-associated Protein (Cas) [62]. Diese molekulargenetischen Methoden zur ortsspezifischen DNA-Manipulation fanden beim Zebrafisch Anwendung und ermöglichten präzise Funktionsverlust- und Überexpressionsanalysen. Diese trugen in den letzten zehn Jahren zur detaillierten Charakterisierung krankheitsrelevanter Gene bei [56, 63].

### 1.5.2 Der Pronephros des *Danio rerio* als Modell in der nephrologischen Forschung

Die Komplexität der physiologischen renalen Prozesse spiegelt sich in der renalen Anatomie wider und bedarf der präzise koordinierten Interaktion zahlreicher, hochspezialisierter Zellen. Das Nephron stellt die renale Funktionseinheit vertebraler Organismen dar und ist spezieübergreifend in den verschiedenen Entwicklungsstufen der Nephrogenese vorhanden [64, 65]. Die Organogenese der menschlichen Niere nimmt ihren Ursprung im intermediären Mesenchym und schließt die sukzessive Aus- und Rückbildung zweier Vorgängerstrukturen des adulten Metanephros ein, die als Pronephros und Mesonephros bezeichnet werden und sich durch eine weniger profunde Gewebearchitektur auszeichnen [64, 66]. Als erstes differenziertes Derivat des Urogenitaltraktes bildet sich bereits in der dritten Embryonalwoche über mesenchymal-epitheliale Transition der Pronephros, ein rudimentäres Konstrukt aus epithelialen Tubuli, die in den primären Nierengang münden und in Richtung der dorsalen Aorta sprießen [66]. Ab der vierten Embryonalwoche schließt sich die Entwicklung des Mesonephros durch kaudales Längenwachstum des primären Nierenganges, dessen Fusion mit der Kloake und die Ausbildung vaskularisierter Nephrone an. Während der Mesonephros in geringer entwickelten Vertebraten wie dem Zebrafisch die finale

Entwicklungsstufe der Niere darstellt, resultiert die embryonale Entwicklung der menschlichen Niere, beginnend mit dem Vordringen der Ureterknospe in das metanephrogene Parenchym, in der Ausbildung des Metanephros. Diese ist in der 36. Embryonalwoche abgeschlossen [52, 65, 67]. Im Gegensatz zum Pronephros des Menschen, einer transienten Struktur ohne exkretorische Funktion, dient selbiger in Fischen und Amphibien bereits der Filtration und Osmoregulation [65]. Der Pronephros des Zebrafischs ist ein geschlossenes System und besteht aus zwei Nephronen, deren gemeinsames Glomerulum durch Fusion zweier Glomeruli an der embryonalen Mittellinie entsteht und bilateral über die primären Harnleiter mit der Kloake verbunden ist [52, 68]. Die Filtrations- und Reabsorptionsprozesse des funktionalen pronephrischen Glomerulums basieren dem humanen Metanephros gleichend auf dem Zusammenwirken von fenestriertem Endothel, Podozyten und polarisierten Epithelzellen. Darüber hinaus verlaufen die Prozesse der glomerulären und tubulären Zelldifferenzierung im Zebrafisch ausgehend vom intermediären Mesenchym analog zur humanen Nephrogenese ab. Renale Progenitorzellen des Zebrafischs exprimieren zu Säugetieren orthologe Gene [52, 65, 68]. Der vollständigen Ausbildung der primären Harnleiter etwa 24 Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization, hpf) schließt sich die Entwicklung der Glomeruli zwischen 30 hpf und 40 hpf an [68]. Es folgen die Ausbildung von Podozytenfortsätzen und die Vaskularisierung der Glomeruli durch Kapillaren der dorsalen Aorta. Drummond et al. zeigten durch Mikroinjektion von 10 kDa-Rhodamindextran in das Gefäßsystem und anschließende Fluoreszenzmikroskopie, dass die glomeruläre Filtration zwischen 36 hpf und 48 hpf einsetzt [68]. Ebenso deutete in den apikalen Tubuluszellen detektierbares Rhodamindextran auf eine endozytosevermittelte Reabsorption hin. Dem Einsatz des Flüssigkeitsstroms durch den Pronephros folgen anatomische Strukturveränderungen von Glomeruli und Tubuli [65]. 50 hpf fusionieren die Glomeruli an ihren medialen Oberflächen [68]. Während der folgenden Lebensstage nehmen Länge und Durchmesser des tubulären Systems weiter zu. Die Entwicklung des Mesonephros beginnt etwa nach der zweiten Lebenswoche mit der Ergänzung des Pronephros um weitere Glomeruli, die sich dem bestehenden tubulären System anschließen [65]. Die zahlreichen zellulären und molekularen Gemeinsamkeiten zwischen dem Pronephros des Zebrafischs und dem menschlichen Metanephros machen ersteren vor dem Hintergrund der vielseitigen Untersuchungsmöglichkeiten und unkomplizierten

Handhabung zu einem gut geeigneten Modellorganismus der molekularen nephrologischen Forschung.

## 1.6 Mutagenese

### 1.6.1 Ortsspezifische Nukleasen - ein Meilenstein der molekularen Forschung

Die Entwicklung von ortsspezifischen Nukleasen, die über eine präzise Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSB) die Ausnutzung intrazellulärer DNA-Reparaturmechanismen zulassen, um Veränderungen der Sequenz herbeizuführen, markiert einen Meilenstein der molekularen Forschung [69]. Chromosomale DSB sind für Zellen potenziell letal und werden daher in allen Organismen mit wirksamen Mechanismen repariert, um die genomische Integrität zu schützen. Das Non-Homologous End-Joining (NHEJ) ist ein Charakteristikum von Säugetierzellen und ermöglicht eine DSB-Reparatur durch die simple Ligation der beiden Strangenden [70]. Diese Ligation erfolgt oft unpräzise durch die Einführung von kleinen Insertionen, Deletionen oder Substitutionen an der Schnittstelle, die in proteinkodierenden Sequenzen Frameshift-Mutationen und damit einen Funktionsverlust des kodierten Proteins verursachen können [70, 71]. Die Nukleasen-vermittelte Induktion von DSB zeichnet sich durch eine hohe Effektivität aus, die auf der Wiederholung der enzymatischen Schnittsetzung beruht, falls das Resultat der DNA-Reparatur mit der Zielsequenz der Nukleasen identisch ist [69]. War die DSB-Induktion erfolgreich, lässt sich durch Ausnutzung der homologen Rekombination eine gewünschte Sequenz mittels eines zuvor synthetisierten, homologen DNA-Templates in die Nukleinsäure integrieren, oder aber mittels fehlerhaften NHEJ ein Funktionsverlust herbeiführen. Zu den so genannten Designer-Nukleasen, die in den vergangenen Jahren in umfangreichen Studien und einer Vielzahl von Zellarten und Organismen eingesetzt wurden, gehören die Meganukleasen [72], ZFN [73], TALEN [74] und CRISPR/Cas [75]. Basierend auf ihrem Sequenzerkennungsmechanismus lassen sich die vier Designernukleasen in zwei Gruppen unterteilen. Während der Erkennungsprozess bei Meganukleasen, ZFN und TALEN auf einer spezifischen Interaktion zwischen Protein

und DNA beruht, bindet die CRISPR-assoziierte Nuklease zunächst mit Hilfe eines kurzen, spezifisch designten RNA-Strangs an die Zielregion [71]. Die Entwicklung der jüngsten der genannten Techniken, CRISPR/Cas, sorgte in den letzten Jahren für Aufsehen, da sie sich gegenüber ihren Vorgängern insbesondere durch eine vielseitige Einsetzbarkeit und große Benutzerfreundlichkeit auszeichnet. Jinek et al. illustrierten im Jahr 2012 erstmals die Anwendungsmöglichkeiten des CRISPR/Cas-Systems [75].

### 1.6.2 Das Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR-associated Protein (Cas)-System

Das Funktionsprinzip des CRISPR/Cas-Systems basiert auf einem adaptiven Immunmechanismus von Bakterien und Archaeen, der diesen die Abwehr von Viren und Plasmiden durch eine RNA-gesteuerte Bekämpfung fremder Nukleinsäuren ermöglicht [75]. CRISPR sind sich wiederholende, palindromische Sequenzabschnitte von etwa 30-40 nt Länge und wurden erstmals 1987 während einer Sequenzanalyse des Gens für das alkaline phosphatase isozyme converting enzyme (*iap*-Gen) in *Escherichia coli* entdeckt [76]. Ishino et al. beschrieben die spezifische Konstruktion aus kurzen, streng homologen, palindromischen Repeats, die von nicht repetitiven, hypervariablen Sequenzabschnitten ähnlicher Länge, sogenannten Spacern, unterbrochen werden [76]. Eine umfassendere Untersuchung war jedoch erst einige Jahre später, nach der Etablierung computerbasierter Sequenzanalysen möglich. Im Jahr 2002 wurden erstmals CRISPR-assoziierte Sequenzen identifiziert, die in der Regel mit einem Abstand von einigen hundert Basenpaaren (bp) die CRISPR-Loci flankierten und für Nukleinsäure-bindende Proteine zu kodieren schienen [77]. Die Entdeckung, dass die Spacer in ihrer Sequenz teilweise Homologien zu Bakteriophagen und Plasmiden aufweisen, führte im Jahr 2005 zu der Postulation einer möglichen immunologischen Bedeutung von CRISPR und Cas [78]. Zwei Jahre später konnte schließlich die Funktion von CRISPR/Cas als Bestandteil des adaptiven Immunsystems von Prokaryoten und tragendes Element der Phagenabwehr belegt werden [79]. Etwa 87 % der Archaeen und 50 % der Bakterien verfügen über CRISPR-Loci in ihrem Genom [78]. Die zwei Komponenten des Systems, CRISPR-Loci und Cas, befähigen den Wirt zu einer RNA-gesteuerten Erkennung und Bekämpfung eindringenden genetischen Materials. Es sind bisher fünf Typen des CRISPR/Cas-Systems bekannt,

die als CRISPR/Cas I-V bezeichnet werden [80]. Während die Funktionsweise typenübergreifend ähnlichen Prinzipien folgt, lassen sich die CRISPR/Cas-Systeme anhand einiger spezifischer Charakteristika voneinander unterscheiden. Aufgrund seiner im Vergleich zu anderen Subtypen simplen Struktur hat sich CRISPR/Cas II, dessen zentraler Funktionsträger und Signaturprotein die Cas9-Endonuklease ist, als für labortechnische Anwendungen im Sinne des Genome Editing instrumentalisierbar erwiesen [75, 80, 81, 82]. Im Folgenden soll die Funktionsweise dieses Subtyps erläutert werden.

Der CRISPR/Cas9-vermittelte Abwehrmechanismus läuft in drei wesentlichen Schritten ab: Spacer-Akquisition, Transkription und Bekämpfung von Fremd-DNA. In einem ersten Schritt werden fremde Nukleinsäuren von einem Komplex aus der sogenannten transactivating CRISPR-RNA (tracrRNA), Cas9 und weiteren Cas-Proteinen identifiziert, zerschnitten und als Spacer in einen CRISPR-Locus zwischen zwei Repeats integriert. Die fremden Nukleotidsequenzen, die später als Spacer fungieren, werden Protospacer genannt. Die Auswahl der Protospacer ist von großer Bedeutung für die Effizienz der nachfolgenden Funktionsschritte [81]. Eine spätere Bindung der CRISPR-RNA (crRNA) an fälschlich identifizierte Zielsequenzen kann ungewollte Off-Target-Effekte zur Folge haben, die sich auch gegen das Wirtsgenom richten können. In CRISPR/Cas II ist das Vorhandensein einer so genannten Protospacer-Adjacent-Motif (PAM)-Sequenz auf der Zielnukleinsäure Voraussetzung für die Identifizierung als Protospacer [75]. Dabei handelt es sich um ein charakteristisches Triplett auf dem nichtkomplementären Strang, bestehend aus einer beliebigen Nukleinbase gefolgt von zwei Guanin-Basen (NGG). Der Abstand zur Zielsequenz beträgt 3 bp in Richtung des 3'-Endes, wobei die Spezifikationen der PAM-Sequenz je nach Cas9-Subtyp variieren können [75, 81]. Eine Interaktion von Cas1 und Cas2 mit dem CRISPR-Locus bewirkt die Schnittsetzung am 3'-Ende eines Repeats, an das daraufhin die Ligation des Spacers erfolgt [83]. Die Spacersequenz wird, flankiert von den komplementären Einzelsträngen des Repeats, in den Locus integriert. Damit ist die Spacer-Akquisition abgeschlossen. Der zweite Schritt führt zur Synthese der crRNA. Hierzu wird zunächst der CRISPR-Locus in eine lange Vorläufer-RNA transkribiert und diese anschließend in kleinere crRNAs prozessiert, die jeweils Informationen der Repeat-Sequenzen und eines Spacers enthalten [84]. Für den finalen Schritt, die Zielbekämpfung, wird ein Ribonukleoproteinkomplex aus Cas9, tracrRNA und einer einzelnen crRNA geformt, wobei die tracrRNA als Bindeglied



zwischen Cas9 und crRNA fungiert [84]. Sie enthält zu den Repeats komplementäre Sequenzabschnitte, die mit der entsprechenden Sequenz der crRNA einen RNA-Duplex formen. Die Cas9-Endonuklease weist eine zweiflügelige Struktur auf, durch deren zentralen Kanal die zu untersuchende DNA geführt wird [81]. Voraussetzungen für eine Cas9-vermittelte DSB-Induktion sind das Vorhandensein einer PAM-Sequenz und eine zur crRNA komplementäre Zielsequenz [75]. Hat die Cas9 eine PAM-Sequenz lokalisiert, wird durch deren Bindung an Cas9 eine Konformationsänderung des Enzyms bewirkt [86]. In der Folge wird der DNA-Doppelstrang destabilisiert, sodass die einzelsträngige Zielsequenz an die komplementäre crRNA binden kann. Beide DNA-Einzelstränge werden an je eine Cas9-Domäne mit Nukleaseaktivität geführt und dort geschnitten [81]. Die Schnittsetzung erfolgt in der Regel etwa 3 bp oberhalb der PAM-Sequenz [75, 85].

Mit zunehmendem Verständnis von Architektur und Funktion des CRISPR/Cas-Systems entstand die Idee, auf Basis des Abwehrmechanismus ein programmierbares genomchirurgisches Werkzeug zur zielgenauen Zerschneidung von DNA zu konstruieren. In diesem Zusammenhang rückte CRISPR/Cas II in den Fokus der Wissenschaft, welches sich durch eine besonders einfache Struktur mit der Cas9-Endonuklease als Signaturprotein auszeichnet [75]. Der überwiegende Anteil der heute kommerziell erhältlichen und biotechnologisch genutzten Cas9 entstammt *Streptococcus pyogenes* und wird als SpCas9 bezeichnet [82]. Jinek et al. zeigten im Jahr 2012, dass sich das CRISPR-Cas-System durch den Einsatz synthetischer RNA programmieren ließ [75]. Dabei legten sie mit der Synthese einer etwa 100 nt langen single guide RNA (sgRNA) den Grundstein für den heutigen Erfolg der Methode. Die sgRNA vereint die Funktionen des Duplex aus tracrRNA und crRNA, welcher in einem Komplex mit Cas9 den finalen Schritt der Phagenabwehr vollzieht, in einem synthetischen RNA-Molekül. Auf eine 20 nt lange Zielerkennungssequenz am 5'-Ende der sgRNA folgt eine doppelsträngige Haarnadelstruktur, die wie im ursprünglichen RNA-Duplex als Bindungsdomäne der Cas9 dient [75]. Die sgRNA erfüllt die Funktionen beider RNAs und verfügt über alle Eigenschaften, um eine zielgenaue, Cas9-vermittelte Zerschneidung von DNA zu dirigieren. Mit Blick auf mögliche technische Anwendungen dieser Erkenntnisse zeigten Jinek et al. die unkomplizierte Neuprogrammierung auf, für die eine Anpassung der Zielerkennungssequenz genügt. Die universelle Effektivität des Systems konnten sie *in vitro* belegen [75]. Damit verfügte die Cas9 als

programmierbare Nuklease über entscheidende Vorteile gegenüber den Entwicklungen der vorangegangenen Jahre, ZFN und TALEN [81]. Kurze Zeit nachdem Jinek et al. erstmals das Potenzial der Cas9 als programmierbare Nuklease erkannt hatten, gelang die effektive Cas9-vermittelte Mutagenese in menschlichen Zellen [86], Mäusen [87] und Zebrafischembryonen [62]. Heute gehört der genomchirurgische Einsatz von CRISPR/Cas9 weltweit zu den Standardmethoden der biomedizinischen Forschung [82].

## 1.7 Ziel der Arbeit

Die Albuminurie ist ein sensibler Nierenschädigungsparameter und im klinischen Gebrauch bedeutsam als diagnostischer und prognostischer Marker der CKD, einem komplexen Krankheitsbild von globaler epidemiologischer und gesundheitsökonomischer Relevanz. Darüber hinaus wurde eine pathologische  $U_{Alb}$  mit einer erhöhten renalen und kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert. Ebenso konnte der nephro- und kardioprotektive Effekt einer medikamentösen Senkung der  $U_{Alb}$  belegt werden. Untersuchungen der vergangenen Jahre weisen auf eine polygenetische Determination der  $U_{Alb}$  hin, deren detaillierte Analyse das pathophysiologische Verständnis verbessern und die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen könnte. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der funktionellen Genanalyse der drei Albuminurie-Kandidatengene *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1*. Diese sind in einem zuvor von Schulz et al. bei der Ratte identifizierten QTL für Albuminurie lokalisiert [36, 42]. Dieser QTL auf RNO6 wies bereits bei jungen Tieren im Alter von 8 Wochen eine signifikante Kopplung der  $U_{Alb}$  auf [36]. Um die pathogenetische Bedeutung der Kandidatengene für die Albuminurie zu prüfen, sollten im Rahmen dieser Arbeit Funktionsverluststudien im Zebrafischmodell durchgeführt werden. Zur Durchführung des Gen-Knockdowns bei Zebrafischembryonen im Einzellstadium sollte das CRISPR/Cas9-System angewandt werden. Durch den Einsatz zweier transgener Zebrafischlinien sollte die Auswirkung der Mutagenese auf die strukturelle Integrität der pronephrischen Strukturen und auf die Funktion der GFB im Sinne der Proteinretention untersucht werden. Phänotypische Charakterisierungen sollten bei transgenen Zebrafischlinien zu unterschiedlichen

Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung erfolgen. Neben einer Beurteilung der Morphologie sollte bei Embryonen der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* die strukturelle Integrität des Pronephros fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden. Die transgene Linie zeichnet sich durch Expression des Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-Reportergens in der relevanten anatomischen Region aus [56]. Zur funktionellen Untersuchung des Pronephros sollte die transgene Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* verwendet werden, die ein fluoreszierendes Fusionsprotein aus EGFP und Vitamin D-binding Protein (VDBP) in den Blutkreislauf sezerniert [88]. Dieses Tracerprotein ähnelt bezüglich seiner molekularen Eigenschaften dem Humanalbumin. Die Fähigkeit der pronephrischen GFB, dieses Fusionsprotein zu retinieren, sollte mittels fluoreszenzmikroskopischer Beurteilung der EGFP-Konzentration im larvalen Gefäßsystem überprüft werden. Die funktionelle Genanalyse beinhaltete somit eine Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Auswirkungen eines Funktionsverlustes auf den Pronephros des Zebrafischs. Die erarbeiteten Ergebnisse sollten das pathogenetische Verständnis der Albuminurie verbessern und eine Grundlage für weiterführende, translationale Studien bieten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

| <b>Substanz</b>                                       | <b>Hersteller</b>       |
|---|-------------------------|
| Agar-Agar, bakteriologisch                            | Roth                    |
| Agarose zur DNA-Elektrophorese                        | Roth                    |
| Ampicillin  | Roth                    |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                               | Thermo Scientific       |
| Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), 2,5 mM       | Thermo Scientific       |
| Ethanol (96 %)  | Roth                    |
| Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)             | Roth                    |
| Kaliumchlorid, 1 M                                    | Roth                    |
| Lysogeny Broth (LB) Medium                            | Roth                    |
| Magnesiumchlorid, 25 mM, 50mM                         | ThermoFisher Scientific |
| Methylcellulose                                       | Sigma-Aldrich           |
| Methylenblau  | Roth                    |
| Natriumhydroxid (NaOH), 50 mM                         | Roth                    |
| RedSafe   | iNtRON Biotechnology    |
| Super Optimal Broth (SOB)-Medium                      | Roth                    |
| Tricain-Methansulfonat (Tricain)                      | Sigma-Aldrich           |
| Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)                   | Calbiochem              |
| Wasser, nukleasenfrei                                 | Sigma-Aldrich           |
| 2-Propanol  | Roth                    |
| 5-Brom-4-chlor-3-indoxy- $\beta$ -D-galactosid (xGal) | Roth                    |

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

| Puffer  | Bestandteile/Eigenschaften   |
|---|--|
| E3-Medium   | 5 mM NaCl; 0,17 mM KCl; 0,33 mM CaCl; 0,33 mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 7,5 |
| TRIS-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE)-Puffer | 2 M TRIS; 0,05 M EDTA-Na <sub>2</sub> -Salz; 1 M Essigsäure; pH 8,3      |

### 2.1.3 Enzyme

| Enzymklasse   | Enzym                     | Hersteller  |
|---------------|---------------------------|---|
| Polymerasen   | Taq-Polymerase (DreamTaq) | Thermo Scientific   |
|               | Phusion Polymerase        | Thermo Scientific   |
| Proteasen     | Pronase                   | Sigma-Aldrich   |
| Endonukleasen | Cas9-Endonuklease         | Helmholtz Protein Sample Production Facility (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) |

### 2.1.4 Kits und kompetente Zellen

| Kit                          | Hersteller               |
|------------------------------|--------------------------|
| mMESSAGE mMACHINE T7 Kit     | Thermo Fisher Scientific |
| MEGAScript T7                | Thermo Fisher Scientific |
| RNeasy Mini Kit              | Qiagen                   |
| GeneJet Plasmid Miniprep Kit | Thermo Scientific        |
| GeneJet Gel Extraction Kit   | Thermo Scientific        |
| pGEM-T Easy Vector System    | Promega                  |
| DH5a-Escherichia Coli        | Thermo Fisher Scientific |

## 2.1.5 Oligonukleotide

## Genomische Primer

| Gen/Exon              | Oligo   | Sequenz                       |
|-----------------------|---------|-------------------------------|
| <i>tmem63c</i> Exon 2 | forward | 5'-CAAATGGTGAACACTTGTGAATC-3' |
|                       | reverse | 5'-CTGCGGTTTACTGCGGAGATG-3'   |
| <i>pomt2</i> Exon 2   | forward | 5'-GGGCGGATGGACATCAAAGAAG-3'  |
|                       | reverse | 5'-CACAATGGCAGAGTTCAGTAACG-3' |
| <i>pomt2</i> Exon 16  | forward | 5'-GAGGACCACATCAACCCTAAAC-3'  |
|                       | reverse | 5'-TGGCGCTTTGCTCATTCTTG-3'    |
| <i>noxred1</i> Exon 1 | forward | 5'-CCAAACACTGTGTGCGTG-3'      |
|                       | reverse | 5'-CGGACACCACTGGATGATAC-3'    |

## Primer für Synthese der sgRNA

| Gen/Exon              | Oligo   | Sequenz   |
|-----------------------|---------|---|
| <i>tmem63c</i> Exon 2 | forward | 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA-GGACGTCA<br>GGAGTTTCCTGA-GTTTTAGAGCTAGAAATAG<br>C-3'                |
| <i>pomt2</i> Exon 2   | forward | 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA-GTCCCATT<br>GTGAGGCTGGGA-GTTTTAGAGCTAGAAATAG<br>C-3'                |
| <i>pomt2</i> Exon 16  | forward | 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA-CCACTTTC<br>CTGGAGATCCTC-GTTTTAGAGCTAGAAATAG<br>C-3'                |
| <i>noxred1</i> Exon 1 | forward | 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA-TACTGTCA<br>AATCCAACATTT-GTTTTAGAGCTAGAAATAG<br>C-3'                |
| Universell            | reverse | 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAA<br>GTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGC<br>TATTTCTAGCTCTAAAAC-3' |

## 2.1.6 Transgene Zebrafische

| Name                 | Funktion                      | Herkunft   |
|----------------------|-------------------------------|--|
| <i>Tg(wt1b:EGFP)</i> | Darstellung<br>pronephrischer | Forschungsgruppe Prof. Christoph<br>Englert, Leibnitz-Institut für |

|                            |                                   |  |
|----------------------------|-----------------------------------|--|
|                            | Strukturen                        | Altersforschung – Fritz-Lippmann-Institut e.V., Jena   |
| <i>Tg(fabp10a:gc-EGFP)</i> | Funktionelle Untersuchung der GFB | Forschungsgruppe Dr. Weibin Zhou, Department of Pediatrics and Communicable Diseases, University of Michigan Medical School, Michigan, USA |

### 2.1.7 Futtermittel und Materialien für die Tierhaltung

| Material                                   | Hersteller        |
|--|-------------------|
| Artemien-Futter                            | Wünnenberg        |
| Trockenfutter SDS 100                      | Claus GmbH        |
| Tanksystem für die Aufzucht von Jungtieren | Aqua Schwarz      |
| Tanksystem für die Haltung adulter Fische  | Tecniplast S.p.A. |
| Tanks für Verpaarung                       | Aqua Schwarz      |

### 2.1.8 Sonstige Materialien

| Material                                | Hersteller                  |
|---|-----------------------------|
| 96-Well-Mikrotiterplatten               | Nunc                        |
| Glaskapillaren TW100F-3                 | World Precision Instruments |
| Halocarbon-Öl 700                       | Sigma-Aldrich               |
| Mehrkanalpipette Xplorer                | Eppendorf                   |
| Objektmikrometer; 1/100 mm              | Bresser                     |
| Pasteurpipetten                         | Roth                        |
| Petrischalenspatel                      | Roth                        |
| Pinzetten                               | Dumont                      |
| Pipetten, Research plus                 | Eppendorf                   |
| Pipettenspitzen; 10 µl, 200 µl, 1000 µl | Eppendorf                   |
| Pipettenspitzen, Microloader™; 20 µl    | Eppendorf                   |

|  |                       |
|--|-----------------------|
| Pipettenspitzen mit Filter; 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl | Biozym Scientific     |
| Safe-Lock Reaktionsgefäße; 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml          | Eppendorf             |
| Tubes für Polymerase-Kettenreaktion; 0,2 ml                | STARLAB international |
| Zahnstocher  | Papstar               |
| Zellkulturschalen Cellstar                                 | Greiner Bio-One       |
| Zentrifugenröhrchen; 15 ml, 50 ml                          | Falcon                |

### 2.1.9 Geräte

| Gerät   | Hersteller                       |
|---|----------------------------------|
| Agarose-Gelkammer MiniSub Cell GT                             | Bio-Rad Laboratories             |
| Autoklave VX-95   | Systemec                         |
| Beleuchtungseinrichtung für Fluoreszenzmikroskop<br>HXP 120 C | Pulch + Lorenz                   |
| Fluoreszenzmikroskop M165 FC                                  | Leica                            |
| Gefrierschrank GS 1382 Index 21A; -20 °C                      | Liebherr                         |
| Gefrierschrank MDF-U74V; -80 °C                               | Sanyo                            |
| Hellfeldmikroskop SLX7  | Olympus                          |
| Kühlschrank CUP 302; 4 °C                                     | Liebherr                         |
| Kühlzentrifuge Centrifuge 5417 R                              | Eppendorf                        |
| Magnetständer für Mikromanipulator GJ-1                       | Narishige                        |
| Micropipette Puller Model P-97                                | Sutter Instrument                |
| Mikroinjektor FemtoJet 4i                                     | Eppendorf                        |
| Mikromanipulator MM3  | Narishige                        |
| PCR-Cycler Mastercycler Pro                                   | Eppendorf                        |
| Peltier-Brutschrank IPP 400                                   | Memmert                          |
| pH/ORP-Meter HI 2211  | HANNA instruments                |
| Schüttelinkubator Serie 3033                                  | Gesellschaft für<br>Labortechnik |
| Sockel für Mikromanipulator IP                                | Narishige                        |
| Spektrophotometer ND-1000                                     | Nanodrop                         |



|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| Tischzentrifuge Centrifuge 5424 | Eppendorf |
| Transformator PowerPac 1000     | Bio-Rad   |
| Trockenschrank ULE 600          | Memmert   |

### 2.1.10 Software

| Software / App                 | Funktion  | Hersteller  |
|--------------------------------|---|---|
| Adobe Illustrator              | Erstellen von Grafiken                                    | Adobe Systems   |
| Adobe Photoshop                | Bildbearbeitung   | Adobe Systems   |
| A Plasmid Editor (APE) v2.0.51 | Design von Oligonukleotiden und Analyse von DNA-Sequenzen | <a href="http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/</a> |
| ChopChop 2.0                   | Auswahl genomischer Zielsequenzen                         | <a href="http://chopchop.cbu.uib.no">http://chopchop.cbu.uib.no</a>   |
| CrispantCal                    | Berechnung der Mischverhältnisse der Injektionslösung     | <a href="http://imlspenticton.uzh.ch:3838/CrispantCal/">http://imlspenticton.uzh.ch:3838/CrispantCal/</a>         |
| FGControl 2.6.0.2              | Agarosegeldokumentation                                   | NET   |
| FIJI                           | Bildanalyse   | National Institutes of Health   |
| LAS 4.7                        | Fluoreszenzmikroskopie                                    | Leica   |
| Microsoft Office 2016          | Textbearbeitung, Erstellen von Tabellen                   | Microsoft   |
| Origin 2015                    | Erstellen von Diagrammen                                  | OriginLab   |
| SPSS 13.0                      | Statistische Analysen                                     | IBM   |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herkunft, Haltung und Zucht der Zebrafische

#### *Herkunft der Zebrafischlinien*

Die transgene Linie *Tg(wt1b:EGFP)* konnte freundlicherweise von der Forschungsgruppe Prof. Christoph Englert, Leibnitz-Institut für Altersforschung - Fritz-Lippmann-Institut e.V., Jena bezogen werden. Die Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* wurde dankenswerterweise von Dr. Weibin Zhou, Department of Pediatrics and Communicable Diseases, University of Michigan Medical School, Michigan, USA zur Verfügung gestellt.

#### *Haltung der Zebrafische*

Die Haltung und Zucht der verwendeten Zebrafischlinien erfolgte am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin gemäß den Standardleitlinien und im Einklang mit den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes [89]. Die juvenilen und adulten Fische wurden nach Geschlecht getrennt in Tanks zu 3,5 oder 8,0 l bei einer Wassertemperatur von 28 °C gehalten. Die maximale Belegdichte betrug 10/l. Die Tanks waren an ein zirkulierendes Wassersystem mit einem täglichen Wasseraustausch von 10 % angeschlossen und befanden sich in abgedunkelten, klimatisierten Räumen mit einer Raumtemperatur von 21 °C und einer zehnfachen Luftwechselrate pro Stunde. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus geregelt. Die Fütterung mit Artemien erfolgte zweimal täglich.

#### *Zucht der Zebrafische*

Zwecks Linienhaltung wurden alle drei Monate Verpaarungen der Zebrafische durchgeführt. Hierzu wurden jeweils am Vortag der Verpaarung je 8-10 Fische in Tanks mit 2 l Fassungsvermögen und in einem Verhältnis von 1-2 Weibchen je Männchen angesetzt. Männliche und weibliche Tiere wurden durch ein Ablaichsieb im Tank horizontal voneinander getrennt. Die Verpaarung erfolgte am nächsten Morgen nach Beginn der Hellphase. Hierzu wurden die männlichen Fische zu den Weibchen in den Siebeinsatz gegeben. Nach der Verpaarung wurden die Fische mit dem Siebeinsatz in einen Tank mit frischem Wasser gegeben. Die Eier wurden mit einem Sieb aufgefangen

und nach einer Spülung in Petrischalen mit E3-Medium bei 28 °C inkubiert. 24 hpf erfolgte eine Reinigung der Eier mit 0,25 % Natriumhypochlorid in E3-Medium. Anschließend wurden die Eier mit 30 µl Pronase-Lösung versetzt und für 2 h bei 28°C inkubiert, um die Choria der Embryonen zu verdauen [90]. Durch wiederholtes, kräftiges Spülen mit E3-Medium brachen die Choria auf und ihre Reste konnten entfernt werden. Die Haltung der Embryonen erfolgte fortan bei 28 °C in Petrischalen. Das E3-Medium wurde täglich gewechselt, bis die Larven 120 hpf zur Aufzucht in ein gesondertes Tanksystem eingegliedert wurden. Während der Aufzucht wurden die Embryonen mit Trockenfutter gefüttert. Nach drei Monaten wurden die Fische nach Geschlecht getrennt in das Tanksystem zur Haltung überführt.

## 2.2.2 CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese

Für die Cas9-vermittelte Mutagenese wurde ein Ribonukleoproteinkomplex aus sgRNA und Cas9-Protein in das Zytoplasma von Zebrafischembryonen im Einzellstadium injiziert. Die Synthese von Cas9-Protein fand mit Hilfe des Plasmids pET-28b-Cas9-his in der Helmholtz Protein Sample Production Facility des Max-Delbrück-Centrums Berlin statt. Die sgRNAs wurden jeweils individuell für den Knockdown von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* designt und synthetisiert. Die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese erfolgte in Anlehnung an Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, wie zuvor beschrieben [91].

### 2.2.2.1 Design und Synthese der single guide RNA (sgRNA)

#### *Auswahl der Zielsequenz*

Erster Schritt für das Design der sgRNA war die Auswahl einer Zielsequenz innerhalb des entsprechenden Kandidatengens. Es wurden Zielsequenzen mit der Architektur 5'-N<sub>20</sub>-NGG-3' gewählt [75]. Die Zielsequenz für den Knockdown von *tmem63c* Exon 2 (5'-GGACGTCAGGAGTTTCCTGATGG-3') wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Daniela Panáková, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin, manuell ausgewählt. Dabei wurde das Vorhandensein der PAM-Sequenz 5'-NGG-3' beachtet, die spezifisch für die verwendete Cas9-Endonuklease ist [75]. Ebenso verfügt die Zielsequenz über einen Guanin- und Cytosin- (GC)-Gehalt von mehr als 50 %, der von Gagnon et al. mit

einer höheren Effizienz assoziiert wurde [92]. Die Zielsequenzen für den Knockdown von *pomt2* Exon 2 (5'-GTCCCATTGTGAGGCTGGGAAGG-3'), *pomt2* Exon 16 (5'-CCACTTTCCTGGAGATCCTCTGG-3') und *noxred1* Exon 1 (5'-TACTGTCAAATCCAACATTTTGG-3') wurden mit Hilfe des Online-Tools ChopChop ausgewählt [93]. Die Software berechnet für einen gegebenen Sequenzabschnitt potenzielle Zielsequenzen für CRISPR/Cas9. Dabei werden unter anderem die PAM-Sequenz, der GC-Gehalt und mögliche Off-Targets berücksichtigt.

#### *Polymerasekettenreaktion (PCR) mit Phusion DNA-Polymerase*

Die Synthese der sgRNA erfolgte durch PCR-Amplifikation und anschließende *in vitro*-Transkription, wie von Basset et al. beschrieben [94] und in vorherigen Projekten der Arbeitsgruppe angewandt [91]. Ein individuelles Oligonukleotid 5'-GAAATTAATACGACTCACTATA-N<sub>20</sub>-GTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3' enthielt die spezifische sgRNA-Zielsequenz (N<sub>20</sub>), eine Bindungsdomäne für die T7-Polymerase (TAATACGACTCACTATA) und einen Teil der Haarnadelstruktur, die zur Bindung der Cas9 dient. Der universelle Reverse-Primer (5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTT TTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3') enthielt die restliche Sequenz dieser Struktur. Die Oligonukleotide wurden von der BioTeZ Berlin Buch GmbH synthetisiert. Das überlappende Design der Oligonukleotide ermöglichte eine PCR-Amplifikation ohne Template. Die PCR erfolgte in 100 µl Reaktionsvolumen. Zunächst wurde die Mischung aus 72 µl nukleasefreiem Wasser, 18 µl 5x Phu-Puffer, 2 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), 2 µl dNTP-Mischung, 1,2 µl MgCl<sub>2</sub>, 1,4 µl Forward-Primer, 1,4 µl Reverse-Primer und 2 µl Phusion-Polymerase hergestellt. Die Reaktion begann mit einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 30 s, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 10 s bei 98 °C, 30 s bei 60 °C und 15 s bei 72 °C. Die finale Elongation erfolgte für 10 min bei 72 °C.

#### *Gelelektrophorese*

Mit Hilfe einer Gelelektrophorese wurden Konzentration, Größe und Einheitlichkeit des Produkts überprüft. Vorbereitend wurden 1,5 % Agarose in Tris-aminomethan-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE)-Puffer mehrfach bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Dem Gel wurden 5 µl/100 ml RedSafe Nukleinsäure-Färbelösung zugefügt. Um eine Polymerisation zu verhindern, wurde das Gel bei 68 °C gelagert. Für die Gelelektrophorese wurde Agarosegel blasenfrei in einen Kunststoff-Gelschlitten

gegossen, in dem ein Kamm fixiert war. Nach einer 30-minütigen Aushärtungsphase wurde der Kamm entfernt und der Schlitten in der mit TAE-Puffer gefüllten Gelkammer platziert. Die Gelelektrophorese wurde über 30 min mit einer Spannung von 100 V durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des Geldokumentationssystems und der Software FGControl computergestützt ausgewertet.

#### *Aufreinigung der DNA*

Zur Aufreinigung des PCR-Produkts wurde das GeneJet Gel Extraction Kit genutzt. Hierzu wurde das Produkt mit 100 µl nukleasefreiem Wasser, 100 µl Bindungspuffer und 300 µl Ethanol gemischt und auf eine DNA-Aufreinigungssäule gegeben. Es folgte die Zentrifugation für 60 s bei 14.000 x g. Zur Optimierung der DNA-Konzentration wurde der Durchfluss erneut in die Aufreinigungssäule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurden 700 µl Waschpuffer auf die Säule pipettiert und diese erneut für 60 s bei 14.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Aufreinigungssäule pipettiert und abermals zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss entfernt. Um Reste des Waschpuffers aus dem Filter zu entfernen, wurde die leere Säule für 60 s bei 14.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde sie in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert. 10 µl Wasser wurden in die Mitte des Filters pipettiert und es erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 60 s bei 14.000 x g. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde mit dem Spektrophotometer bestimmt.

#### *In vitro-Transkription*

Für die *in vitro*-Transkription mit dem aufgereinigten PCR-Produkt als Template wurde das MEGAscript T7-Kit genutzt. Hierzu wurde zunächst 1 µg Template-DNA mit je 2 µl der Ribonukleotidlösungen Adenosintriphosphat (ATP), Cytosintriphosphat (CTP), Guanosintriphosphat (GTP) und Uridintriphosphat (UTP), 2 µl 10x Reaktionspuffer und 2 µl RNA-Polymerase gemischt. Die Reaktion wurde mit nukleasefreiem Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Reaktionsgefäß wurde kurz mikrofugiert, um die Reaktion am Boden des Gefäßes zu sammeln und anschließend für 15 h bei 37 °C inkubiert. Zur Beendigung der Transkription und Präzipitation der RNA wurden der Reaktion 30 µl nukleasefreies Wasser und 30 µl Lithiumchloridlösung hinzugefügt. Nach einer Mischung der Lösung durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde das Reaktionsgefäß für 1 h bei -20 °C gekühlt. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit der Kühlzentrifuge für 15 min bei

25.000 x g und 4 °C, um die Bildung eines RNA-Pellets zu bewirken. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und es wurde 1 ml Ethanol zur Waschung des Pellets hinzugefügt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 25.000 x g und 4 °C wurde das Ethanol ebenfalls vorsichtig abpipettiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet in 20 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration der Lösung wurde spektrophotometrisch bestimmt. Abschließend wurde die Lösung mit nukleasefreiem Wasser auf eine RNA-Konzentration von 600 ng/µl verdünnt und in Aliquots zu 3 µl in PCR-Tubes abgefüllt. Diese wurden zum Schutz vor Kontamination in Falcon-Tubes verschlossen und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2.2 Erstellung der Injektionslösung und Mikroinjektion

Die tierexperimentellen Versuchsreihen zum CRISPR/Cas9-vermittelten Knockdown von *tmem63c* wurden im Rahmen der Einarbeitung gemeinschaftlich mit Frau Dr. Angela Schulz etabliert.

##### *Vorbereitung von Injektionsmoulds und Injektionsnadeln*

Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden zunächst Injektionsmoulds gegossen. Hierzu wurde eine 1,5 %-ige Lösung von Agar-Agar in E3-Medium durch mehrfaches Erhitzen hergestellt, mit 0,025 % Methylenblau versetzt und in Petrischalen gegossen. Vor der vollständigen Härtung der Masse wurden mit einem Stempel Aussparungen zur späteren Fixierung der Fischeier in die Moulds gepresst. Injektionsmoulds wurden bei 4 °C gelagert und wöchentlich ausgetauscht. Injektionsnadeln wurden mit dem Micropipette Puller aus Glaskapillaren hergestellt.

##### *Mischung der Injektionslösung und Befüllung der Injektionsnadeln*

Die Injektionslösung setzte sich aus sgRNA, Cas9-Protein, nukleasefreiem Wasser und Kaliumchlorid zusammen, wie von Gagnon et al. zuvor beschrieben [92]. Zur Bestimmung des idealen Mischverhältnisses der Bestandteile wurde die webbasierte Software CrispantCal verwendet, die von Mosimann et al. entwickelt wurde [95]. Dabei wurden sgRNA und Cas9 in einem Verhältnis von 1:1 verwendet. 5 µl Injektionsmischung beinhalteten 1,2 µl sgRNA-Lösung, 1,4 µl Cas9-Lösung, 1,2 µl 1 M Kaliumchlorid und 1,2 µl nukleasefreies Wasser. Mit Hilfe einer Microloader-Pipettenspitze wurde die Injektionsnadel mit dem Injektionsmix befüllt. Anschließend wurde sie im

Mikromanipulator fixiert und mit dem Mikroinjektor verbunden. Die Spitze der Glaskapillare wurde unter Sicht mit einer feinen Pinzette abgebrochen. Mit Hilfe eines Objektträgers mit Mikrometerskala, auf den einige  $\mu\text{l}$  Halocarbon-Öl 700 gegeben wurden, wurde ein standardisiertes Injektionsvolumen kalibriert. Injektionsdruck und -dauer wurden so eingestellt, dass der Durchmesser des injizierten Tropfens 0,1 mm betrug. Dies entspricht einem Injektionsvolumen von etwa 0,5 nl. Der Injektionsdruck betrug 100-180 Hektopascal (hPa) bei einer Injektionsdauer von 0,1-0,2 ms. Der Haltedruck vor der Injektion betrug 18 hPa.

### *Mikroinjektion*

Die Verpaarung der Fische und das Ernten der Fischeier erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben. Die Fischeier wurden innerhalb von 10 Minuten nach Beginn der Verpaarung geerntet, um eine Mikroinjektion vor dem Erreichen des Zwei-Zell-Stadiums zu ermöglichen. In einer Petrischale wurden die Eier mehrfach mit E3-Medium gespült, mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf den Injektionsmould aufgetragen und dort in den vorgeformten Vertiefungen reihenförmig verteilt. Überflüssiges E3-Medium wurde vom Injektionsmould entfernt. Die Injektion erfolgte in das Zytoplasma der Zygote (Abb. 1). Nach Abschluss der Injektion wurden die Embryonen bei 28 °C in Petrischalen mit E3-Medium inkubiert. Das Medium wurde täglich ausgewechselt. Das Reinigen und Aufbrechen der Choria und die weitere Lagerung der Embryonen erfolgte, wie unter 2.2.1 beschrieben.

### 2.2.2.3 Genotypisierung

#### *Gewinnung genomischer DNA einzelner Embryonen*

Für die Gewinnung genomischer DNA zur Überprüfung der Mutagenese wurden Kontrollen und Embryonen nach CRISPR/Cas-vermitteltem Gen-Knockdown (Crispants) im Alter von 24 hpf verwendet. Die Embryonen wurden mit 0,016 % Tricain in E3 anästhesiert [90], bevor einzelne Embryonen mit Pasteurpipetten in 1,5 ml Reaktionsgefäßen isoliert wurden. Mit einer Pipette wurde das E3-Medium aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die Lyse des Gewebes erfolgte in 30  $\mu\text{l}$  50 mM NaOH durch 30-minütiges Erhitzen auf 95 °C [96]. Die Reaktion wurde durch Kühlung auf Eis und Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  1M Tris-HCl beendet. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein sauberes Reaktionsgefäß pipettiert. Die

Lagerung erfolgte für bis zu zwei Tage bei 4 °C. Längerfristig wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### *PCR mit DreamTaq DNA-Polymerase*

Die genomische DNA von Kontroll-Embryonen und Embryonen aus den Experimentalgruppen diente als Template für eine PCR-Amplifikation. Es wurde ein Sequenzabschnitt von etwa 500 bp, der die Zielsequenz der sgRNA beinhaltetete, mit den in Tab. 5 aufgelisteten genomischen Primern amplifiziert. Die PCR wurde mit 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt, die sich aus 17 µl nukleasefreiem Wasser, 2,5 µl 10 x DreamTaq-Puffer, 1 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl DMSO, 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl Forward-Primer (50 mM), 0,5 µl Reverse-Primer (50 mM), 0,5 µl DreamTaq-Polymerase und 2 µl Template zusammensetzten. Auf eine initiale Denaturierung über 30 s bei 98 °C folgten 35 Zyklen bestehend aus 10 s bei 98 °C, 30 s bei der primerspezifischen Annealing-Temperatur und 15 s bei 72 °C. Die finale Elongation erfolgte über 10 min bei 72 °C. Zur Überprüfung von Konzentration und Spezifität des Produkts wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und ihre DNA-Konzentration wurde bestimmt, ebenfalls wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Die optimale Annealing-Temperatur der Primer wurde vorab durch versuchsweise Durchführung der soeben beschriebenen PCR mit einem Temperaturgradienten bestimmt. Es wurden Annealing-Temperaturen zwischen 55 °C und 75 °C getestet. Zur Überprüfung des Produkts wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt und ausgewertet, wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Auf Basis dieser Analyse wurde die Annealing-Temperatur ausgewählt, die zur höchsten Konzentration und Spezifität des Produkts geführt hatte. Diese Temperatur betrug 60 °C für *tmem63c*, 67 °C für *pomt2* (Exon 2), 66 °C für *pomt2* (Exon 16) und 64 °C für *noxred1*.

#### *Integration in den pGEM-T Easy Vektor*

Das Produkt der soeben beschriebenen PCR wurde in den pGEM-T Easy Vektor integriert. Vor der Mischung der Reaktion wurde der pGEM-T Easy Vektor kurz zentrifugiert, um die Lösung am Boden des Gefäßes zu sammeln. Die Ligationsreaktion enthielt 5 µl 2x Ligationspuffer, 1 µl pGEM-T Easy Vektor (50 ng), 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss Units), 10 ng DNA und nukleasefreies Wasser zur Auffüllung auf ein



Gesamtreaktionsvolumen von 10  $\mu\text{l}$ . Durch Pipettieren wurde die Reaktion gemischt. Es folgte eine Inkubation bei 4  $^{\circ}\text{C}$  über 15 h.

#### *Transformation in chemisch kompetente E. coli*

Ein 2 ml-Reaktionsgefäß mit kompetenten DH5 $\alpha$ -Zellen, die zuvor bei -80  $^{\circ}\text{C}$  verwahrt wurden, wurde für einige Minuten auf Eis gelagert, bis der Inhalt getaut war. Das Reaktionsgefäß mit der Ligationsreaktion wurde kurz zentrifugiert, um den gesamten Inhalt am Boden des Gefäßes zu sammeln. 2  $\mu\text{l}$  der Ligationsreaktion wurden auf die kompetenten Zellen pipettiert. Durch leichtes Schwenken wurde der Inhalt des Reaktionsgefäßes vermischt. Anschließend wurde das Gefäß für 20 min auf Eis gelagert. Unmittelbar nach einem Hitzeschock für 45 s bei 42  $^{\circ}\text{C}$  im Heizblock wurde das Reaktionsgefäß erneut für 2 min auf Eis gekühlt. Der Suspension wurden 950  $\mu\text{l}$  raumtemperiertes Super Optimal Broth with Catabolite Repression (SOC)-Medium hinzugefügt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 1,5 h im Schüttelschrank bei 37  $^{\circ}\text{C}$  und 150 U/min inkubiert.

#### *Ampicillin-Selektion*

Vorbereitend wurden Agarplatten hergestellt. Hierzu wurde 1,5 % Agar in Lysogeny Broth (LB)-Medium autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50  $^{\circ}\text{C}$  wurden dem Medium 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin zugefügt und die Lösung wurde in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Platten erfolgte lichtgeschützt bei 4  $^{\circ}\text{C}$ . Für jede der zuvor durchgeführte Transformationen wurden zwei Platten vorbereitet. Für jede Platte wurde eine Mischung aus 40  $\mu\text{l}$  Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid und 40  $\mu\text{l}$  5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid angefertigt und einem Drigalskispatel gleichmäßig auf der Agarplatte verteilt. Anschließend wurden die in SOC-Medium inkubierten Zellen auf den Platten ausgestrichen. Dabei wurden je 200  $\mu\text{l}$  auf die erste Platte und 750  $\mu\text{l}$  auf die zweite Platte gegeben, um auf Selektionen mit unterschiedlicher Konzentration zurückgreifen zu können. Nach einer Inkubation der Platten für 16-24 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  wurden sie bei 4  $^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Blau-Weiss-Selektion diente der Identifikation jener Bakterienkolonien, die erfolgreich rekombinierte Vektoren enthielten. Diese bildeten weiße Kolonien. Vorbereitend wurden je inkubierte Platte zehn 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 50  $\mu\text{l}$  LB-Medium befüllt. Mit autoklavierten Zahnstochern wurden zehn weiße Bakterienkolonien gepickt. Jeder Zahnstocher wurde in einem der 1,5 ml Reaktionsgefäße platziert. Durch vorsichtiges Drehen des Zahnstochers zwischen den Fingern wurden die Kolonien in

dem Medium gelöst. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße für 2 h bei 37 °C inkubiert. Von jeder der Suspensionen wurden 2 µl als Template für eine PCR-Amplifikation mit DreamTaq DNA-Polymerase nach der zuvor beschriebenen Methodik genutzt. Für die PCR wurden die genomischen Primer des entsprechenden Gens verwendet. Der Erfolg der Amplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft und das Produkt anschließend aufgereinigt wie unter 2.2.2.1 beschrieben. Die aufgereinigte DNA wurde im Verhältnis 1:3 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und zur Sequenzierung an die Firma Source Bioscience (Berlin) geschickt. Die Analyse der Sequenzierungsdaten hinsichtlich Frequenz und Art hervorgerufener Mutationen erfolgte manuell mit der Software A Plasmid Editor (APE).

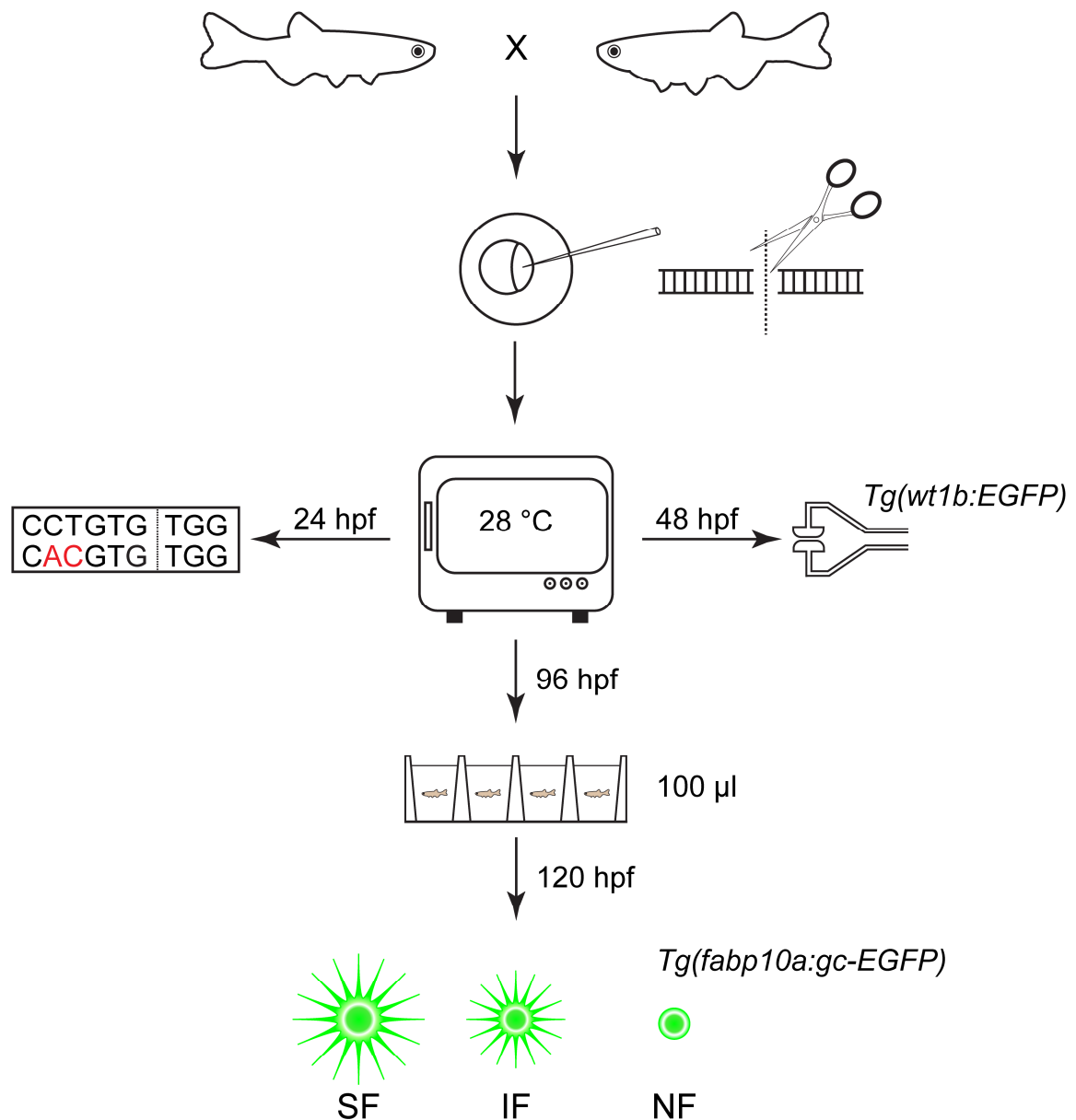
## 2.2.3 Phänotypische Untersuchung

### 2.2.3.1 Strukturelle *in vivo*-Analyse des Pronephros bei Embryonen der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)*

Mittels phänotypischer Analysen bei Embryonen der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* wurden die Auswirkungen der transienten Mutagenese auf die strukturelle Integrität des Pronephros untersucht. Grundlage der Analysen war die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese, wie unter 2.2.2 beschrieben. Die Lagerung der Embryonen erfolgte entsprechend 2.2.1. Die unverblindete hellfeld- und fluoreszenzstereomikroskopische Untersuchung wurde 48 hpf durchgeführt. Die Larven wurden mit 0,016 % Tricain in E3-Medium anästhesiert [90] und anschließend mit 2 % Methylcellulose in E3-Medium auf einem Objektträger positioniert. Die hellfeldmikroskopische Untersuchung der allgemeinen Morphologie erfolgte in Seitenlage bei 4-facher Vergrößerung. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Pronephros fand in Bauchlage bei 10-facher Vergrößerung statt. Sowohl die hellfeldmikroskopische als auch die fluoreszenzmikroskopische Ansicht wurde jeweils durch eine Bildaufnahme dokumentiert. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einer Belichtungszeit von 4,0 ms für durchlichtmikroskopische und 42,0 ms für fluoreszenzmikroskopische Bilder. Die technischen Einstellungen für die durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen blieben jeweils über Versuchsreihen hinweg konstant. Nach Beendigung der Untersuchung wurden alle Embryonen durch Inkubation in 300 mg/l Tricain in E3-Medium und anschließender Gefrierung bei -20 °C über mind. 24 h getötet [97].

### 2.2.3.2 Funktionelle *in vivo*-Analyse der glomerulären Filtrationsbarriere bei Larven der transgenen Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*

Zur funktionellen Analyse der GFB diente die transgene Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*. Die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese und die anschließende Behandlung der Embryonen wurden durchgeführt, wie unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben. 96 hpf wurden die Larven mit 0,016 % Tricain in E3-Medium anästhesiert [90]. In 96-Well-Mikrotiterplatten erfolgte die isolierte Inkubation aller Larven in je einem Nöpfchen mit 100 µl E3-Medium bei 28 °C. 120 hpf wurde die unverblindete fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Die intravasale gc-EGFP-Konzentration der isolierten Larven wurde fluoreszenzmikroskopisch unter konstanten technischen Bedingungen visuell beurteilt. Es zeichneten sich drei unterschiedliche Intensitäts- und Verteilungsmuster der Fluoreszenz ab, denen sich die Larven zuteilen ließen. Diese Gruppen wurden entsprechend der abgestuften Intensität der intravasalen Fluoreszenz als SF (stark fluoreszierend), IF (intermediär fluoreszierend) und NF (nicht fluoreszierend) bezeichnet. Um eine zuverlässige Zuordnung der einzelnen Larven zu der entsprechenden Gruppe zu ermöglichen, erfolgte die Klassifizierung jedoch nicht primär anhand der subjektiv schwer zu quantifizierenden Fluoreszenzintensität, sondern anhand des Verteilungsmusters. Definierendes Merkmal der SF-Gruppe war eine ausgeprägte intravasale Fluoreszenz in der gesamten Larve, die eine Darstellung der intersegmentalen und kaudalen Gefäße ermöglichte. Die IF-Gruppe zeichnete sich dadurch aus, dass die Kopfregion fluoreszierte, die Gefäße der Schwanzregion jedoch nicht nachvollzogen werden konnten. In der NF-Gruppe war nur die Autofluoreszenz des Dottersacks sichtbar. Die Kopf- und Schwanzregion fluoreszierten nicht und es waren keine Gefäße nachvollziehbar. Alle Larven wurden anhand dieses Scorings durch den Untersucher der entsprechenden Gruppe zugeordnet. Die Gruppengrößen wurden dokumentiert. Zur fotografischen Dokumentation des Phänotyps wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von exemplarischen Kontroll-Larven bei 3,2-facher Vergrößerung in Seitenlage mit einer Belichtungszeit von 42,0 ms angefertigt. Hierzu wurden Larven anästhesiert und auf dem Objektträger fixiert, wie unter 2.2.3.1 ausgeführt. Nach Abschluss der Untersuchung erfolgte die Tötung der Larven, wie zuvor beschrieben.



**Abb. 1: Strukturiertes Assay für Gen-Knockdown-induzierte Schäden der glomerulären Filtrationsbarriere (GFB) beim Zebrafisch.**

Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Grundlage der funktionellen Genanalyse von Transmembrane Protein 63C (*tmem63c*), Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) und NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1 (*noxred1*) bildete die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese beim Zebrafisch. Die Mikroinjektion der Mutagenesemixtur erfolgte in das Zytoplasma von Zebrafischembryonen im Einzellstadium. Es schlossen sich Untersuchungen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten an. Die Genotypisierung zur Überprüfung der Mutagenese erfolgte 24 Stunden nach der Befruchtung (hours post fertilization, hpf). 48 hpf wurde eine strukturelle *in vivo*-Analyse des Pronephros bei Embryonen der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)* durchgeführt. Die Embryonen zeichnen sich durch Expression eines fluoreszierenden Proteins in der relevanten anatomischen Region aus. Larven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* wurden 96 hpf isoliert in je 100 µl Medium inkubiert. 120 hpf erfolgte die funktionelle *in vivo*-Analyse des Pronephros. Es wurde die intravasale Konzentration eines fluoreszierenden Tracerproteins beurteilt, um einen möglichen Verlust des Proteins im Rahmen eines proteinurischen GFB-Defekts zu registrieren. Entsprechend der Intensität der intravasalen Fluoreszenz wurden die Larven einer von drei Gruppen zugeteilt. SF, stark fluoreszierend; IF, intermediär fluoreszierend; NF, nicht fluoreszierend.

#### 2.2.4 Bioinformatische Analyse

Die Recherche bezüglich bereits veröffentlichter Analysen von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* erfolgte in den Datenbanken PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und ZFIN (<https://zfin.org/>). Zur Recherche bioinformatischer Daten wurde die Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) genutzt.

#### 2.2.5 Statistische Analyse

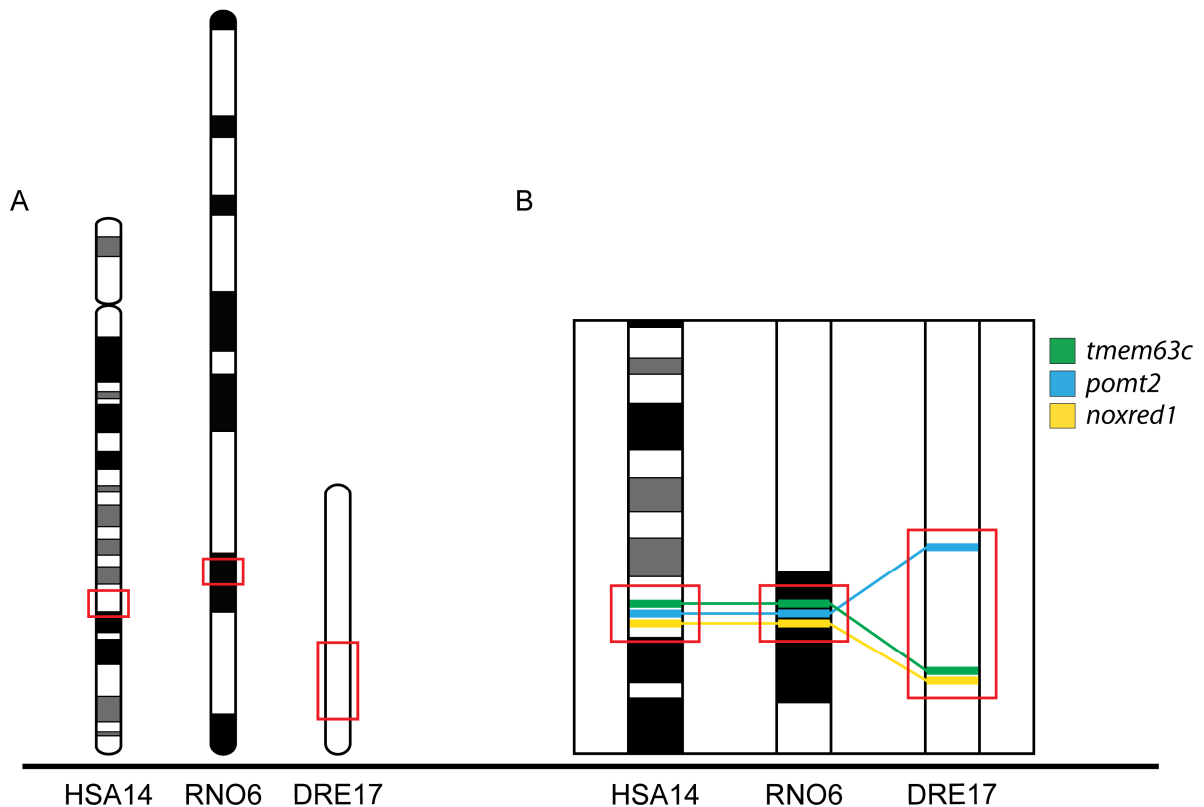
Die Auswertung gesammelter Daten erfolgte mit der Software SPSS 13.0. Alle Daten wurden als arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardfehler dargestellt. Unterschiede zwischen Kontrollen und Crispant-Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und anschließender Bonferroni-Post-hoc-Testung bestimmt. Als Signifikanzschwelle wurde ein p-Wert  $p < 0,05$  definiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bioinformatische Analyse

In Vorbereitung der Funktionsverluststudien beim Zebrafisch erfolgte zunächst eine speziesübergreifende bioinformatische Analyse der Kandidatengene und ihrer Transkripte. Es wurden Informationen zu Lokalisation und Sequenz der Kandidatengene im Kontext des Zebrafischgenoms erarbeitet. *Tmem63c* ist Teil der Transmembrane Protein (TMEM)-Familie, die etwa 300 verschiedene Proteine umfasst [98]. Im murinen Modell wurde *Tmem63c* als Teil einer Gruppe von Proteinen identifiziert, die als Calcium-abhängige, transmembranständige Natriumkanäle osmoregulatorisch wirksam sind [99]. Beim Zebrafisch wurde *tmem63c* zum gegebenen Zeitpunkt noch nicht charakterisiert. *POMT2* kodiert beim Menschen für ein Enzym, das zur Gruppe der Glykosyltransferasen gehört [100]. Es ist an der posttranslationalen O-Glykosylierung von Proteinen beteiligt und Mutationen des Gens sind mit verschiedenen Subtypen der kongenitalen Muskeldystrophie assoziiert [100]. Auch beim Zebrafisch weist *pomt2* eine Glykosyltransferaseaktivität auf [101]. Es wird während der gesamten Embryonalentwicklung des Zebrafisches, insbesondere während der ersten 24 h, ubiquitär exprimiert [101]. Die genaue Funktion von *Noxred1* ist bisher nicht geklärt. Das Transkript wird auch als Pyrroline-5-carboxylate reductase-like protein bezeichnet und ist in der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) als Protein mit mutmaßlicher Oxidoreduktaseaktivität gelistet [102]. Wahrscheinlich ist es an der Prolinbiosynthese beteiligt. Mutationen im Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 (*PYCR1*)-Gen wurden beim Menschen unter anderem mit dem Prostatakarzinom assoziiert [103]. Die Recherche zu den drei Kandidatengenen erlaubte somit keine konkreten Assoziationen zu proteinurischen Nierenschäden. Insgesamt waren nur spärliche Informationen zu *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* verfügbar. Eine vergleichende Darstellung der Lokalisationen im Genom von *Danio rerio*, *Rattus norvegicus* und *Homo sapiens* ergab eine speziesübergreifend konservierte Kolo-kalisation der drei Kandidatengene. Beim Zebrafisch sind *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* innerhalb eines Bereiches von 13.370.884 bp auf Chromosom 17 (DRE17) lokalisiert [45]. Ebenso sind die Orthologe des Menschen und der Ratte auf je einem Chromosom kolokalisiert. Die

entsprechenden Abschnitte umfassen 244.254 bp auf Homo sapiens (HSA) 14 [104] und 213.485 bp auf RNO6 [44]. Demnach kann für die Kandidatengene in Bezug auf die drei Organismen eine Syntanie konstatiert werden (Abb. 2).



**Abb. 2: Lokalisation der Albuminurie-Kandidatengene im Genom von Homo sapiens (HSA), Rattus norvegicus (RNO) und Danio rerio (DRE).**

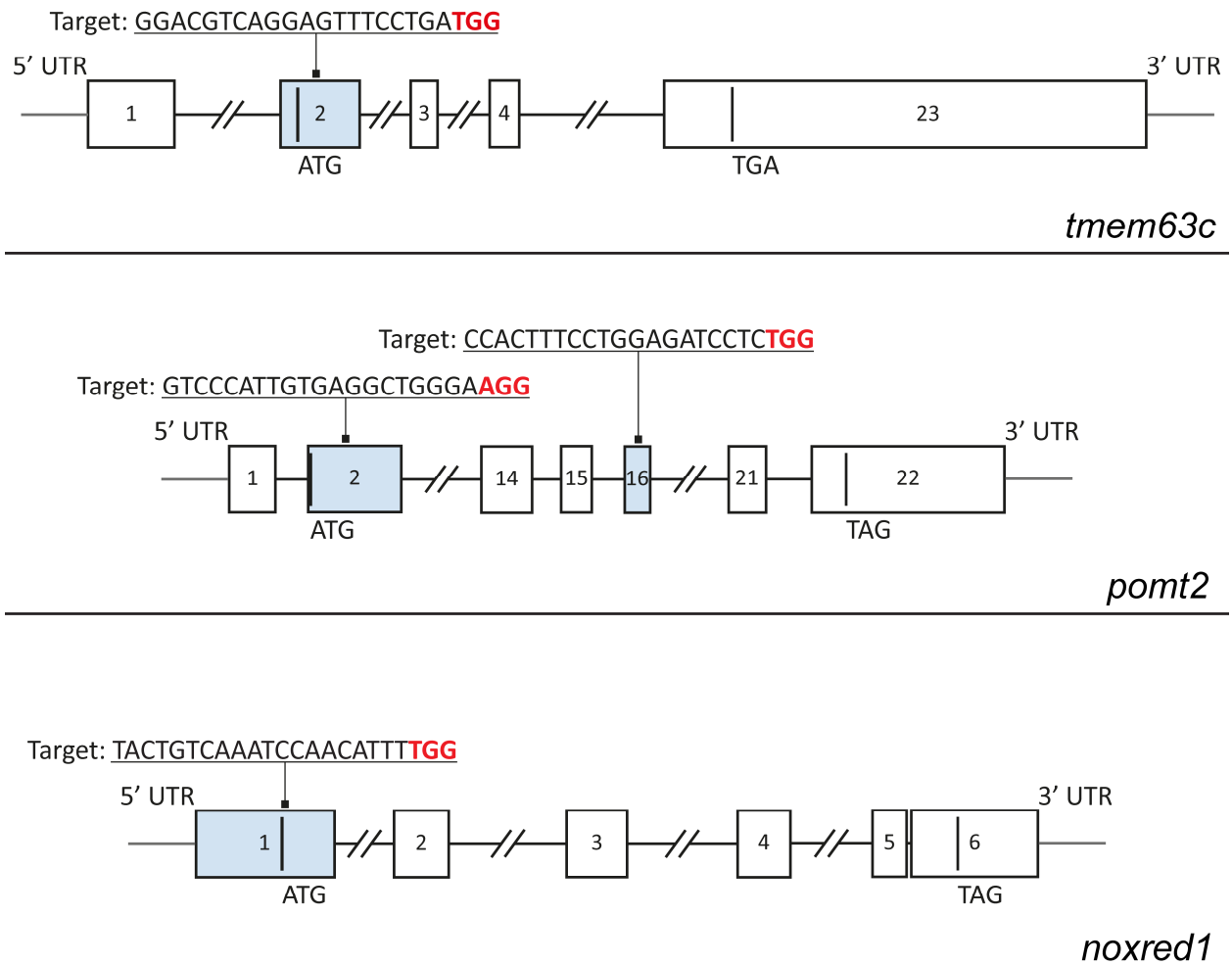
**A** Schematische Darstellung von HSA14, RNO6 und DRE17 in Anlehnung an Darstellungen der Datenbank Ensembl [102]. Die untersuchten Kandidatengene sind in den Genomen von HSA, RNO und DRE auf je einem Chromosom lokalisiert. Die roten Rahmen markieren den Abschnitt, welcher *tmem63c* (Transmembrane Protein 63c), *pomt2* (Protein-O-Mannosyltransferase 2) und *noxred1* (NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1) beinhaltet. Dieser umfasst 244.254 bp auf HSA14, 213.485 bp auf RNO6 und 13.370.884 bp auf DRE17 [44, 45, 104]. **B** Vergleich der Kandidatengenlokalisierung auf HSA14, RNO6 und DRE17 in einer Ausschnittsvergrößerung. Die roten Rahmen kennzeichnen die Abb. 2 A entsprechenden Abschnitte. Farbige Balken markieren die Lokalisation von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1*. Im Vergleich zu HSA14 und RNO6 sind *tmem63c* und *pomt2* auf DRE17 in umgekehrter Reihenfolge lokalisiert.

## 3.2 Design der sgRNA

Die CRISPR/Cas9-vermittelte Mutagenese erfolgte durch Co-Injektion von sgRNA und Cas9-Protein in das Zytoplasma im Einzellstadium der Embryonen. Die auf PCR-Amplifikation und anschließender *in vitro*-Transkription basierende Synthese der

sgRNA erforderte zunächst das Design der verwendeten Oligonukleotide. Der Reverse-Primer enthielt die Sequenz für die Haarnadelstruktur, die eine Bindung der Cas9 ermöglicht und konnte universell verwendet werden. Der Forward-Primer wurde für jede sgRNA individuell designt und enthielt die variable DNA-Erkennungssequenz. Um durch frühe Frame-Shift-Mutationen oder frühe Stopp-Codons einen Knockout des Gens zu erzielen, wurden insbesondere sgRNAs für 5'-nahe Exons entworfen. Die sgRNA für den Knockdown von *tmem63c* wurde in Vorarbeit der Arbeitsgruppe Dr. Daniela Panáková am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin, in Ermangelung der mittlerweile verfügbaren Software manuell designt. Dabei wurde auf Erkenntnisse von Gagnon et al. [92] und Bassett et al. [94] zurückgegriffen. Da das erste Exon von *tmem63c* noch Teil der 5'-Untranslated Region (UTR) ist, wurde die Zielsequenz 5'-GGACGTCAGGAGTTTCCTGATGG-3' im zweiten Exon gewählt (Abb. 3 A). Der GC-Gehalt, der von Gagnon et al. mit einer höheren Mutageneseeffizienz assoziiert wurde [92], betrug 55 %. Die gewählte Zielsequenz wurde nachträglich mit dem Webtool ChopChop [93] analysiert. Es wurde ein mögliches Off-Target mit drei Mismatches identifiziert, das in einem Bereich nicht kodierender DNA lokalisiert ist. Die voraussichtliche Effizienz wurde mit 61,03 % bewertet. Die Auswahl der Zielsequenzen für den Knockdown von *pomt2* und *noxred1* erfolgte mit Hilfe des Webtools ChopChop [93]. Für den Knockdown von *pomt2* wurden zwei sgRNAs designt, deren Zielsequenzen auf Exon 2 und Exon 15 lokalisiert waren. Für *pomt2* Exon 2 wurde die Zielsequenz 5'-GTCCCATTGTGAGGCTGGGAAGG-3' mit einem GC-Gehalt von 60 %, einem möglichen Off-Target und einer berechneten Effizienz von 56,05 % gewählt (Abb. 3 B). Von den möglichen Zielsequenzen für *pomt2* Exon 16 wurde die Sequenz 5'-CCACTTTCCTGGAGATCCTCTGG-3' ausgewählt (Abb. 3 C). Der GC-Gehalt betrug 55 %, es wurden zwei mögliche Off-Targets identifiziert und die berechnete Effizienz lag bei 57,37 %. Für *noxred1* wurde die Zielsequenz 5'-TACTGTCAAATCCAACATTTTGG-3' gewählt (Abb. 3 D). Der GC-Gehalt betrug 30 %. Es wurden zwölf potenzielle Off-Targets identifiziert, die an jeweils drei Nukleotiden von der Zielsequenz abwichen. Die berechnete Effizienz wurde mit 25,6 % angegeben.





**Abb. 3: Zielsequenzen für CRISPR/Cas9-vermittelten Gen-Knockdown von Albuminurie-Kandidatengen beim Zebrafisch.**

Schematische Darstellung von *tmem63c* (Transmembrane Protein 63c), *pomt2* (Protein-O-Mannosyltransferase 2) und *noxred1* (NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1) bei *Danio rerio* [102]. Rechtecke symbolisieren Exons und sind entsprechend nummeriert. Exons, auf denen sich eine Zielsequenz (Target) befindet, sind blau markiert. Schwarze, horizontale Linien symbolisieren Introns. Unterbrechungen der Linie kennzeichnen eine nicht maßstabgetreue Darstellung zur Verbesserung der Anschaulichkeit. Vertikale Balken stellen Start-/Stopp-Codons dar und sind entsprechend betitelt (ATG bzw. TGA oder TAG). Die 3'-Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Sequenz (NGG) der Zielsequenzen ist rot markiert. UTR, Untranslated Region.

### 3.3 Genotypisierung der Crispants

Um die Effektivität der CRISPR/Cas9-gesteuerten Mutagenese zu überprüfen, wurde 24 hpf genomische DNA aus Embryonen der Crispants isoliert. Mittels PCR wurde ein Bereich von etwa 500 bp, der die Zielsequenz enthielt, amplifiziert. Es folgten die

Sequenzierung des relevanten Sequenzabschnitts und die manuelle Überprüfung von Frequenz und Art der Mutationen im relevanten Sequenzabschnitt.

#### *Genotypisierung nach Knockdown von *tmem63c**

Es wurde genomisches Material aus zwei Embryonen sequenziert, von denen beide Mutationen aufwiesen. Insgesamt wurden 18 Sequenzen analysiert, von denen 17 Mutationen aufwiesen (Abb. 4). Auffällig war, dass in über 50 % der mutierten Sequenzen mehrfache Mutationen nachweisbar waren. Von allen identifizierten Mutationen waren 37 % Single Nucleotide Variations (SNV), 54 % Deletionen mit einer Größe von 1-11 nt und 9 % Insertionen mit einer Größe von 1-9 nt.

#### *Genotypisierung nach Knockdown von *pomt2**

Für den Knockdown von *pomt2* wurden zwei verschiedene sgRNAs designt - je eine für Exon 2 und Exon 16. Für *pomt2* (Exon 2) wurden insgesamt 25 Proben von vier Embryonen analysiert (Abb. 5). In allen Embryonen wurden Mutationen nachgewiesen, wobei jeweils 57-100 % der Proben eines Embryos betroffen waren. Die identifizierten Mutationen waren zu 79 % SNV. Deletionen von 1-11 nt machten 12 % und Insertionen von 1-2 nt 9 % der Mutationen aus. Die zweite sgRNA, deren Ziel-DNA auf Exon 16 lokalisiert war, führte in allen analysierten Embryonen zu nachweisbaren Mutationen (n = 2) (Abb. 6). In 100 % der elf analysierten Sequenzen waren Mutationen nachweisbar. 63 % der identifizierten Mutationen waren SNV, 31 % Deletionen von 1-11 nt und 6 % waren Insertionen von 2-6 nt.

#### *Genotypisierung nach Knockdown von *noxred1**

Die Sequenzierung genomischer DNA nach dem Knockdown von *noxred1* ergab Mutationen in zwei von drei analysierten Embryonen (Abb. 7). Insgesamt wurden 20 Sequenzen analysiert. In den zwei betroffenen Embryonen wiesen 40 % beziehungsweise 63 % der Sequenzen Mutationen auf, wobei es sich in allen Fällen um SNV handelte. 86 % der identifizierten SNV waren innerhalb der PAM-Sequenz lokalisiert.

| A                                    |       | B  |                   |
|--------------------------------------|-------|--|-------------------|
| GGACGTCAGGAGTTTCCTGA                 | TGG   | GGACGTCAGGAGTTTCCTGA                       | TGG               |
| GGACGTCAGGAGTTTCCTGA                 | TGG 1 | GGACGTCAGGAGTTTC-TGA                       | TGG 1             |
| GGACGT <sup>*</sup> CCA-----CCTGC    | AGG 1 | GGACGTCAG <sup>A</sup> AGTTTC----          | -GG 1             |
| GGACGTCAGGAGTTTC-----                | TGG 1 | <sup>C</sup> GT <sup>C</sup> CTCGGA-T----- | TGG 1             |
| GGACGTCAGGAG-----                    | --G 1 | GGAC-----AG-----                           | TGG 2             |
| GGACGTCAGGAG-----A                   | TGG 1 | GGACGTCAGGAGTT-----                        | -GG 1             |
| GGACGTC <sup>G</sup> AGAGTT-----     | TGG 1 | GGACGTCAGGAGT <sup>*</sup> -----           | TGG 2             |
| GGACGTCAGGAGTT-----                  | TGG 1 | GGACGTCAGGAGTTTCCTGA                       | <sup>C</sup> GG 1 |
| GGACGTCAGGAG <sup>*</sup> -----      | -GG 1 | GGACGTCAGGAGTTTC----                       | TGG 1             |
| <sup>*</sup> A <sup>*</sup> AACAGCAC |       | <sup>*</sup> AGTAGCAGG                     |                   |

**Abb. 4: Genotypisierung von zwei Embryonen nach Knockdown von Transmembrane Protein 63c (*tmem63c*).**

Alignment der DNA-Sequenzen zweier Embryonen (**A** und **B**) nach Knockdown von *tmem63c* mit der Zielsequenz auf Exon 2. Die Zielsequenz befindet sich als Referenz in der obersten Zeile der Abbildung. Die Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Sequenz 5'-TGG-3' ist in einem separaten Rahmen dargestellt. Die Ziffern in der rechten Spalte beschreiben die Häufigkeit der in der entsprechenden Zeile gelisteten Sequenz. Single Nucleotide Variations sind in Rot dargestellt. Deletionen sind mit roten Strichen (-) markiert. Sterne (\*) kennzeichnen Insertionen, die in der entsprechenden Farbe in der untersten Zeile erläutert werden.

| A                                 |       | B                                 |       |
|-----------------------------------|-------|-----------------------------------|-------|
| GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | AGG   | GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | AGG   |
| GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | ATG 1 | GTCCATTGTGAGGCTGGAA               | ATG 1 |
| GTCCATTGTGAGGCTGGAA               | ATG 2 | GTCC <sup>*</sup> ATTGTGAGGCTGGGA | ATG 2 |
| GTCCATTGTG <sup>*</sup> AGGAATGGA | AGG 1 | GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | ATG 1 |
| GTCCATT <sup>A</sup> TN-GACTGGGA  | AGG 1 | GTCC-ATT <sup>*</sup> TGAAGATGAAG | AGG 1 |
| <sup>*</sup> A                    |       | <sup>*</sup> C <sup>*</sup> C     |       |

| C  |       | D                                 |       |
|--|-------|-----------------------------------|-------|
| GTCCATTGTGAGGCTGGGA                            | AGG   | GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | AGG   |
| GTCCATTGTGAGGCTGGGA                            | AGG 2 | GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | AGG 3 |
| GTCCATTG-----CTGGGA                            | ATG 1 | GTCCATTGTG-----                   | -GG 1 |
| GTCCATTGTG-----                                | --G 1 | GTCCATTGTGAGGCTGGGA               | ATG 2 |
| GTCCAG <sup>A</sup> ATGAGGCTGGG-               | AGG 1 | GTCCATTGTGAGG <sup>*</sup> CTGGGA | ATG 1 |
| GTCC-ATT <sup>*</sup> TGAAGATGAAG              | AGG 1 | <sup>*</sup> G                    |       |
| GTCCCAT <sup>C</sup> GGAG <sup>A</sup> AATCTCA | --G 1 |                                   |       |
| GTCCTCTTCATCTTCAAGAA                           | TGG 1 |                                   |       |
| <sup>*</sup> C <sup>*</sup> AT                 |       |                                   |       |

**Abb. 5: Genotypisierung von vier Embryonen nach Knockdown von Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) Exon 2.**

Alignment der DNA-Sequenzen von vier Embryonen (**A-D**) nach Knockdown von *pomt2* mit der Zielsequenz auf Exon 2. Die Zielsequenz befindet sich als Referenz in der obersten Zeile der Abbildung. Die Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Sequenz 5'-AGG-3' ist in einem separaten Rahmen dargestellt. Die Ziffern in der rechten Spalte beschreiben die Häufigkeit der in der entsprechenden Zeile gelisteten Sequenz. Single Nucleotide Variations sind in Rot dargestellt. Deletionen sind mit roten Strichen (-) markiert. Sterne (\*) kennzeichnen Insertionen, die in der entsprechenden Farbe in der untersten Zeile erläutert werden.

A

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| CCACTTTCCTGGAGATCCTC | TGG |   |
| CCACTTTCATGGAGAT-CTC | TGG | 1 |
| CCACTTTC-----C       | TGG | 2 |
| CCACTTTCCTGGAGATC--- | TGG | 2 |
| CCACTTTCCTCA*GAGACTC | TGG | 1 |
| CCACTTTCCTGGAGAAA--G | TGG | 2 |
| <u>*ACCCAT</u>       |     |   |

B

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| CCACTTTCCTGGAGATCCTC | TGG |   |
| CCACTTTCCTGGAGATC-TC | TGG | 1 |
| CCACTTTC-NGGAGATCCTA | NGG | 1 |
| C--TTTTAATCAAC*ATTC  | TGG | 1 |
| <u>*TT</u>           |     |   |

**Abb. 6: Genotypisierung von zwei Embryonen nach Knockdown von Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) Exon 16.**

Alignment der DNA-Sequenzen zweier Embryonen (A und B) nach Knockdown von *pomt2* mit der Zielsequenz auf Exon 16. Die Zielsequenz befindet sich als Referenz in der obersten Zeile der Abbildung. Die Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Sequenz 5'-TGG-3' ist in einem separaten Rahmen dargestellt. Die Ziffern in der rechten Spalte beschreiben die Häufigkeit der in der entsprechenden Zeile gelisteten Sequenz. Single Nucleotide Variations sind in Rot dargestellt. Deletionen sind mit roten Strichen (-) markiert. Sterne (\*) kennzeichnen Insertionen, die in der entsprechenden Farbe in der untersten Zeile erläutert werden.

A

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG |   |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG | 7 |

C

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG |   |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG | 3 |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGC | 2 |

B

|                      |     |   |
|----------------------|-----|---|
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG |   |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG | 3 |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGC | 2 |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | AGG | 2 |
| TACTGTCAAATCCAACATTT | TGG | 1 |

**Abb. 7: Genotypisierung von drei Embryonen nach Knockdown von NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1 (*noxred1*).**

Alignment der DNA-Sequenzen dreier Embryonen (A-C) nach Knockdown von *noxred1* mit der Zielsequenz auf Exon 1. Die Zielsequenz befindet sich als Referenz in der obersten Zeile der Abbildung. Die Protospacer Adjacent Motif (PAM)-Sequenz 5'-TGG-3' ist in einem separaten Rahmen dargestellt. Die Ziffern in der rechten Spalte beschreiben die Häufigkeit der in der entsprechenden Zeile Sequenz. Single Nucleotide Variations sind in Rot dargestellt.

### 3.4 Funktionelle Genanalyse bei Embryonen der Linie *Tg(wt1b:EGFP)*

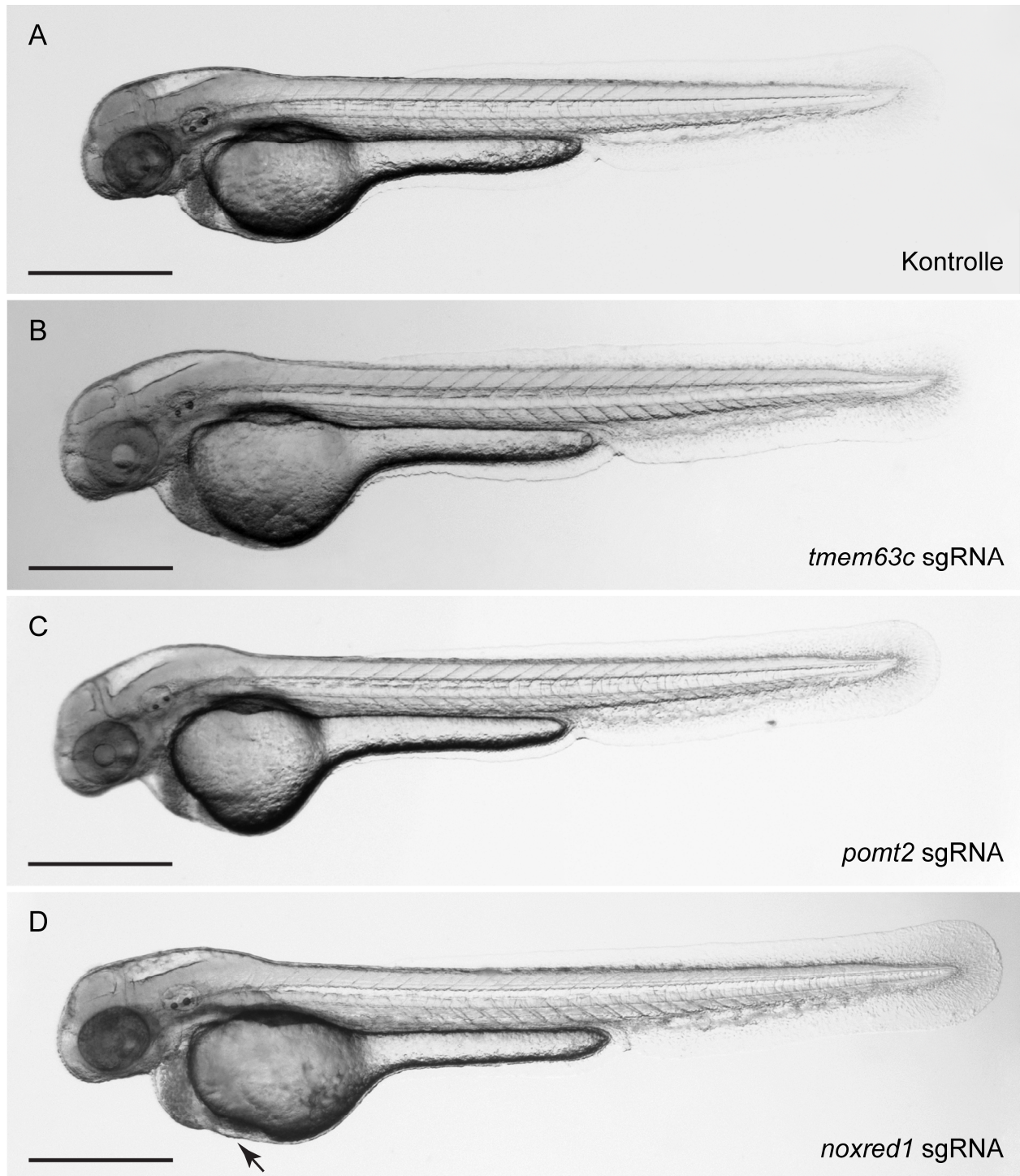
Um die Kandidatengene *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* in Hinblick auf ihre Bedeutung für die strukturelle Integrität der GFB und die Entwicklung des Pronephros zu charakterisieren, wurde eine CRISPR/Cas9-gestützte Mutagenesestudie bei transgenen Zebrafischen der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* durchgeführt. Neben einer Kontrollgruppe wurden auch Embryonen nach Cas9-Injektion untersucht, um eine

Beeinflussung des Phänotyps durch das Protein auszuschließen. In Folge der Injektionen wurde weder bei Cas9-Kontrollen, noch bei den Embryonen nach Gen-Knockdown erhöhte Mortalitäts- und Fehlbildungsraten oder behaviorale Auffälligkeiten detektiert. In Ruhe schwammen die Embryonen in Bauchlage. Taktile Reize führten zu reflexartigen, mehrfachen Muskelkontraktionen.

### 3.4.1 Hellfeldmikroskopische Untersuchung der Morphologie

Die phänotypische Charakterisierung von Kontrollen (n = 35), Cas9-Kontrollen (n = 11) und Crispants nach Knockdown von *tmem63c* (n = 33), *pomt2* (n = 20) und *noxred1* (n = 18) erfolgte 48 hpf zunächst mittels hellfeldmikroskopischer Untersuchung in Seitenlage, um den Verlauf der Embryogenese zu kontrollieren und mögliche Auswirkungen der Mutagenese auf die Morphologie zu identifizieren. Hierzu wurden digitale Aufnahmen von Embryonen in Seitenlage mit 4-facher Vergrößerung angefertigt (Abb. 8). Die Kontroll-Embryonen präsentierten sich 48 hpf entsprechend der embryologischen Charakterisierung von Kimmel et al. [51] mit gerader Körperachse und einer Länge von etwa 3 mm (Abb. 8 A). Der Kopf war in Relation zur Körperachse nach ventral gekippt. Atrium und Ventrikel des Herzens waren erkennbar. Der Herzschlag war regelmäßig und beförderte Blut durch das Gefäßsystem, das sich über die dorsale Aorta und die kaudalen Arterien bis an das kaudale Ende des Schwanzes erstreckte. Der Durchmesser des Dottersacks entsprach in etwa dem des Kopfes. Seine zylindrische Verlängerung war etwa 1,5 Mal so lang wie der Dottersack selbst und verjüngte sich nach kaudal. Dorsal des Dottersacks war die Anlage der Schwimmblase erkennbar. Die olfaktorischen Plakoden waren an der anterioren Augenkante sichtbar. Der Abstand der Ohranlage zum posterioren Rand des Auges betrug etwa die Hälfte des Durchmessers der Ohranlage. Die Morphologie der Embryonen nach Injektion von Cas9-Protein entsprach dem Phänotyp der Kontrollen.

Die Beurteilung der *tmem63c*- und *pomt2*-Crispant ergab keine sichtbaren Abweichungen vom morphologischen und habituellen Phänotyp der Kontrollen (Abb. 8 A-C). Insbesondere konnten keine Ödeme als typische Zeichen einer renalen Dysfunktion festgestellt werden. Der Knockdown von *noxred1* führte zu vereinzelter Ausbildung milder perikardialer Ödeme (Abb. 8 D).

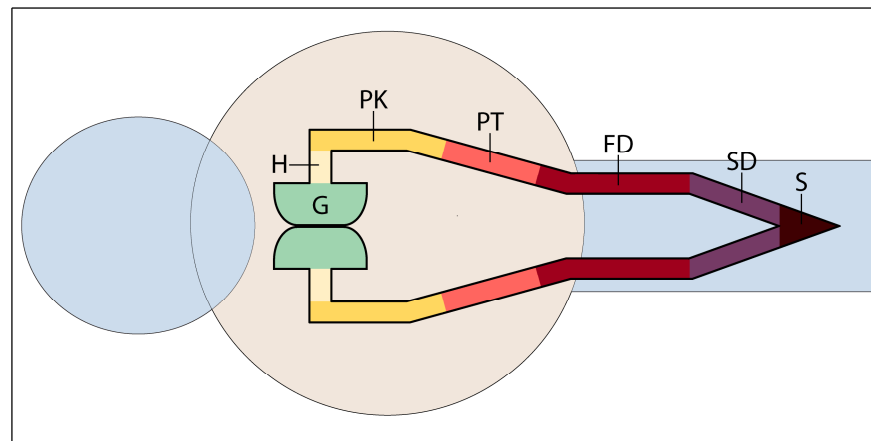


**Abb. 8: Morphologie von Zebrafischembryonen nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengen.**

Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von transgenen Zebrafischembryonen der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* 48 Stunden nach der Befruchtung in Seitenlage bei 4-facher Vergrößerung. Der CRISPR/Cas9-vermittelte Knockdown von Kandidatengen erfolgte durch Co-Injektion von single guide RNA (sgRNA) und Cas9-Protein bei Embryonen im Einzellstadium. Kontroll-Embryonen (A) sowie Embryonen nach Knockdown von Transmembrane Protein 63c (*tmem63c*) (B) und Protein-O-Mannosyltransferase 2 (*pomt2*) (C) wiesen eine physiologische Morphologie ohne für eine Nierenschädigung typische Phänotypen auf. Der Knockdown von NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1 (*noxred1*) (D) führte zu einem milden perikardialen Ödem (Pfeil). Maßstab entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

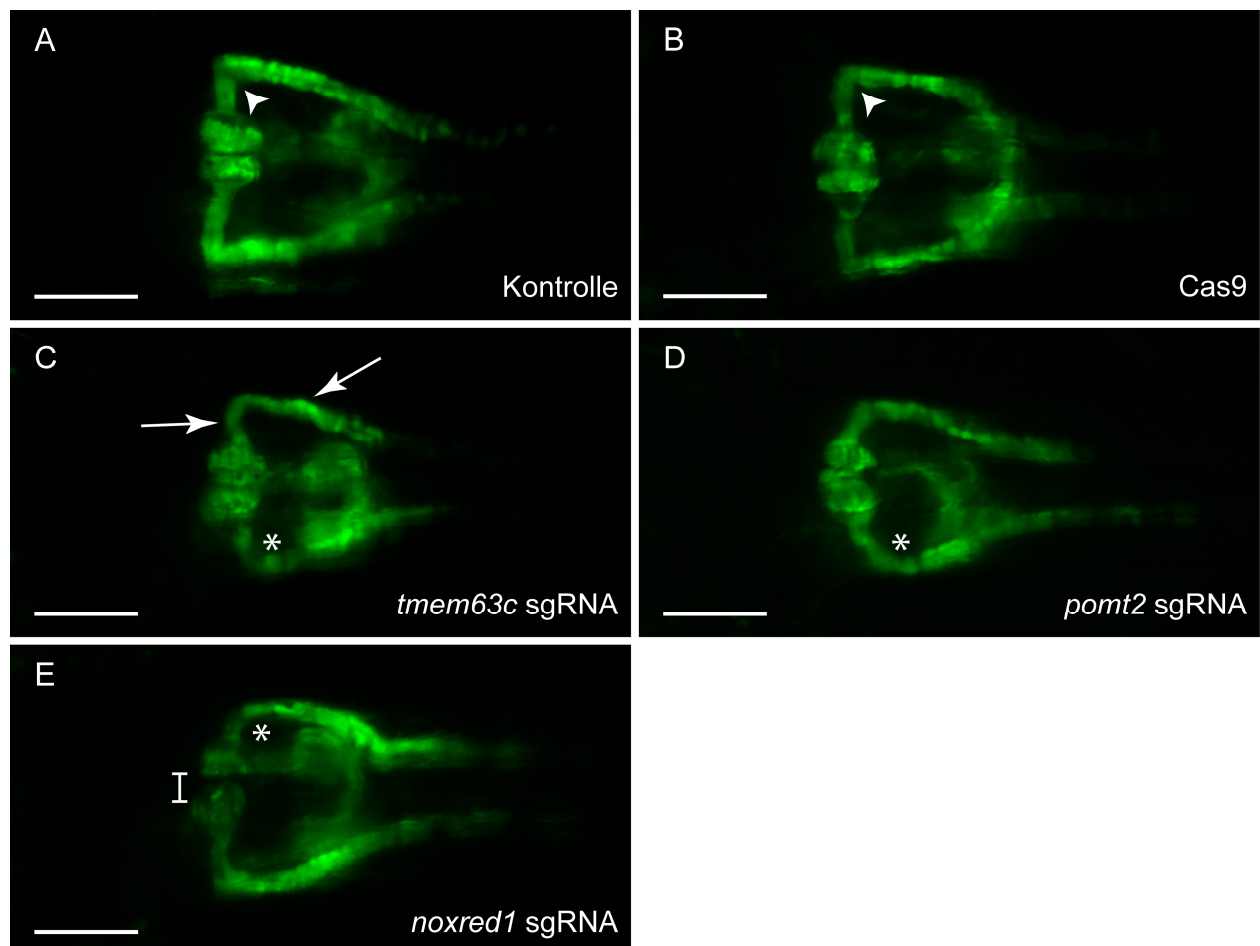
### 3.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung des Pronephros

Mit Hilfe der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)* wurden die Glomeruli, Tubulushäse und proximalen Konvolute von Kontroll-Embryonen und Crispants (Abb. 9) fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Untersuchung der Embryonen fand 48 hpf in Bauchlage statt. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt waren die Glomeruli in der Kontrollgruppe im Prozess der Fusionierung an der embryonalen Mittellinie (Abb. 10 A). Die pronephrischen Tubulushäse entsprangen zentral am jeweiligen Glomerulum und verliefen orthogonal zur Mittellinie in entgegengesetzte Richtungen nach lateral. Der Tubulushals war etwa 1,5 Mal so lang wie der Durchmesser eines Glomerulums. In einem leicht spitzen Winkel führte im weiteren Verlauf das proximale Konvolut nach kaudal. Im Verlauf des proximalen geraden Tubulus schwächte das Fluoreszenzsignal ab, sodass es optisch nicht mehr detektierbar war. Der pronephrische Phänotyp der Kontrollen 48 hpf entsprach zuvor veröffentlichten Beschreibungen [56, 65, 68]. Der Phänotyp der Cas9-Kontrollen entsprach dem der Kontrollgruppe (Abb. 10 B). Auch nach Knockdown der Kandidatengene blieb in allen drei Gruppen die grundsätzliche strukturelle Integrität erhalten (Abb. 10 C-E). Allerdings umfasste der pronephrische Phänotyp der Crispants einige, gering ausgeprägte, strukturelle Veränderungen an Glomeruli und Tubuli. So führte der Knockdown von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* zu einem gehäuftem Auftreten eines vergrößerten Abstands zwischen den zwei Glomeruli. In einigen Fällen wurde dieser Phänotyp um eine aberrante räumliche Beziehung der Glomeruli zueinander ergänzt. Diese Phänomene waren in allen Crispant-Gruppen gleichermaßen zu beobachten. Ein weiteres Merkmal aller Mutagenesegruppen war der im Vergleich zur Kontrolle veränderte Verlauf der pronephrischen Tubuli. Auffällig waren insbesondere stumpfere Winkel zwischen Tubulushals und proximalem Konvolut sowie eine leicht asymmetrische Struktur der pronephrischen Konstruktion. Neben diesen phänotypischen Besonderheiten, die in allen Crispant-Gruppen detektierbar waren, zeichneten sich die *tmem63c*-Crispant durch ein weiteres Merkmal aus. Bei den Embryonen dieser Gruppe wurde ein undulierender Verlauf von Tubulushäsen und proximalen Konvoluten beobachtet (Abb. 10 C).



**Abb. 9: Der Pronephros des Zebrafischs**

Schematische Darstellung des embryonalen Pronephros von *Danio rerio*. G, Glomerulum; H, Tubulushals; PK, proximales Konvolut; PT, proximaler Tubulus; FD, früher distaler Tubulus; SD, später distaler Tubulus; S, Sammelrohr. In Anlehnung an Drummond und Davidson [105].



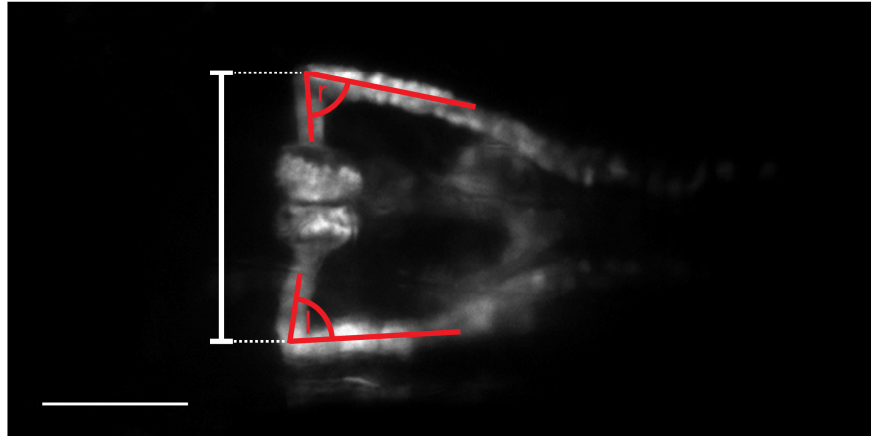
**Abb. 10: Strukturelle Untersuchung des Pronephros von Zebrafischembryonen nach CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen.**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zebrafischembryonen der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)* in Bauchlage bei 10-facher Vergrößerung, 48 Stunden nach der Befruchtung. Kontrollen (A) und Cas9-Kontrollen (B) zeigten einen physiologischen Phänotyp. Die Struktur des Pronephros war symmetrisch,



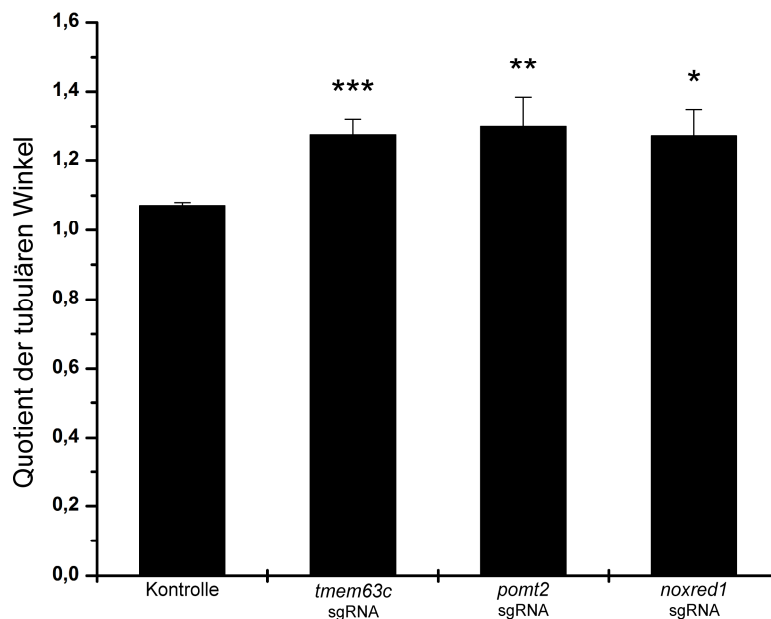
(Fortsetzung: Abb. 10) Glomeruli waren im Prozess der Fusion, tubuläre Winkel maßen etwa 90° (Pfeilspitzen). *Tmem63c*-Crispant (C) zeichneten sich durch stumpfere tubuläre Winkel (Sterne) und undulierende Tubuli (Pfeile) aus. Ebenso gehörten vergrößerte tubuläre Winkel zum Phänotyp nach Knockdown von *pomt2* (D) und *noxred1* (E) (Sterne). Teilweise wurde eine verzögerte Fusion der Glomeruli beobachtet (vertikaler Balken). *tmem63c*, Transmembrane Protein 63c; *pomt2*, Protein-O-Mannosyltransferase 2; *noxred1*, NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1; sgRNA, single guide RNA. Maßstab entspricht 200 µm.

Anhand fotografischer Aufnahmen von 106 Larven konnten phänotypische Merkmale computergestützt quantifiziert werden. Hierzu wurden jeweils der rechte und linke Winkel zwischen Tubulushals und proximalem Konvolut ermittelt (Abb. 11). Zusätzlich wurde die Distanz zwischen den Scheitelpunkten dieser Winkel bestimmt. Um die visuell detektierte Asymmetrie des Pronephros zu quantifizieren, wurde für alle Larven der Quotient aus beiden tubulären Winkeln berechnet, wobei jeweils der größere der beiden Werte als Dividend in die Berechnung einging. Eine größere Abweichung der beiden Werte voneinander schlug sich in einem höheren Wert des Quotienten nieder. Die Untersuchung ergab signifikant höhere Quotienten in allen Crispant-Gruppen ( $p < 0,008$  für *tmem63c*,  $p < 0,02$  für *pomt2*,  $p < 0,05$  für *noxred1*) (Abb. 12). Mit der Vermessung der Distanz zwischen linkem und rechtem Scheitelpunkt wurde der Abstand der Tubuli voneinander bestimmt. Es wurde eine leichte Verringerung dieses Abstands in allen Experimentalgruppen festgestellt. Die tubuläre Distanz der Kontrollen betrug im arithmetischen Mittel 166 µm. Dieser Wert reduzierte sich auf durchschnittlich 152 µm nach Knockdown von *tmem63c* ( $p < 0,0005$ ), 145 µm nach Knockdown von *pomt2* ( $p < 0,0001$ ) und 155 µm nach Knockdown von *noxred1* ( $p < 0,05$ ) (Abb. 13).



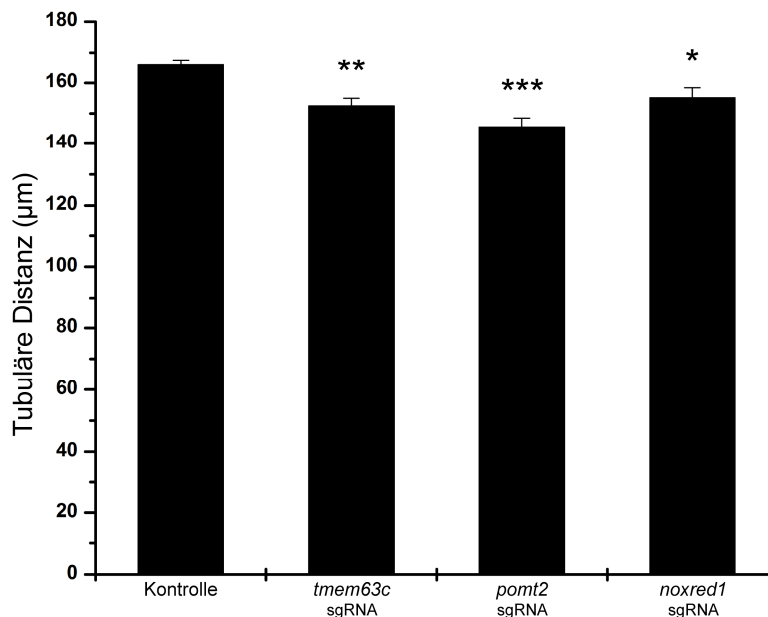
**Abb. 11: Tubulärer Winkel und tubuläre Distanz im Pronephros des Zebrafischs.**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Pronephros eines Kontroll-Embryos der Linie *Tg(wt1b:EGFP)* 48 Stunden nach der Befruchtung in Bauchlage bei 10-facher Vergrößerung. Tubuläre Winkel sind in Rot dargestellt. Der vertikale weiße Balken markiert die tubuläre Distanz. Maßstab entspricht 200 µm. r, rechts; l, links.



**Abb. 12: Quotient der tubulären Winkel im Pronephros nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengen beim Zebrafisch.**

Bei Zebrafischembryonen der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)* wurden die tubulären pronephrischen Winkel 48 Stunden nach der Befruchtung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Der CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Knockdown erfolgte durch Co-Injektion von single guide RNA (sgRNA) und Cas9-Protein bei Zebrafischembryonen im Einzellstadium. In die Berechnung des Quotienten ging der jeweils größere tubuläre Winkel eines Embryos als Dividend, der jeweils kleinere tubuläre Winkel eines Embryos als Divisor ein. Der Wert des Quotienten wurde als Maß für die Asymmetrie der pronephrischen Struktur genutzt. Vergleich von Kontrollen und Embryonen nach CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockdown von Albuminurie-Kandidatengen 48 Stunden nach der Befruchtung. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,02$  vs. Kontrolle, \*\*\*  $p < 0,008$  vs. Kontrolle. *tmem63c*, Transmembrane Protein 63c; *pomt2*, Protein-O-Mannosyltransferase 2; *noxred1*, NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1.



**Abb. 13: Tubuläre Distanz im Pronephros nach Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen beim Zebrafisch.**

Bei Zebrafischembyonen der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)* wurde die Distanz zwischen den lateralen Enden des linken und rechten Tubulushalses 48 Stunden nach der Befruchtung fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Der CRISPR/Cas9-vermittelte Gen-Knockdown erfolgte durch Co-Injektion von single guide RNA (sgRNA) und Cas9-Protein bei Zebrafischembyonen im Einzellstadium. \*  $p < 0,03$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,0003$  vs. Kontrolle, \*\*\*  $p < 0,0001$  vs. Kontrolle. *tmem63c*, Transmembrane Protein 63c; *pomt2*, Protein-O-Mannosyltransferase 2; *noxred1*, NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1.

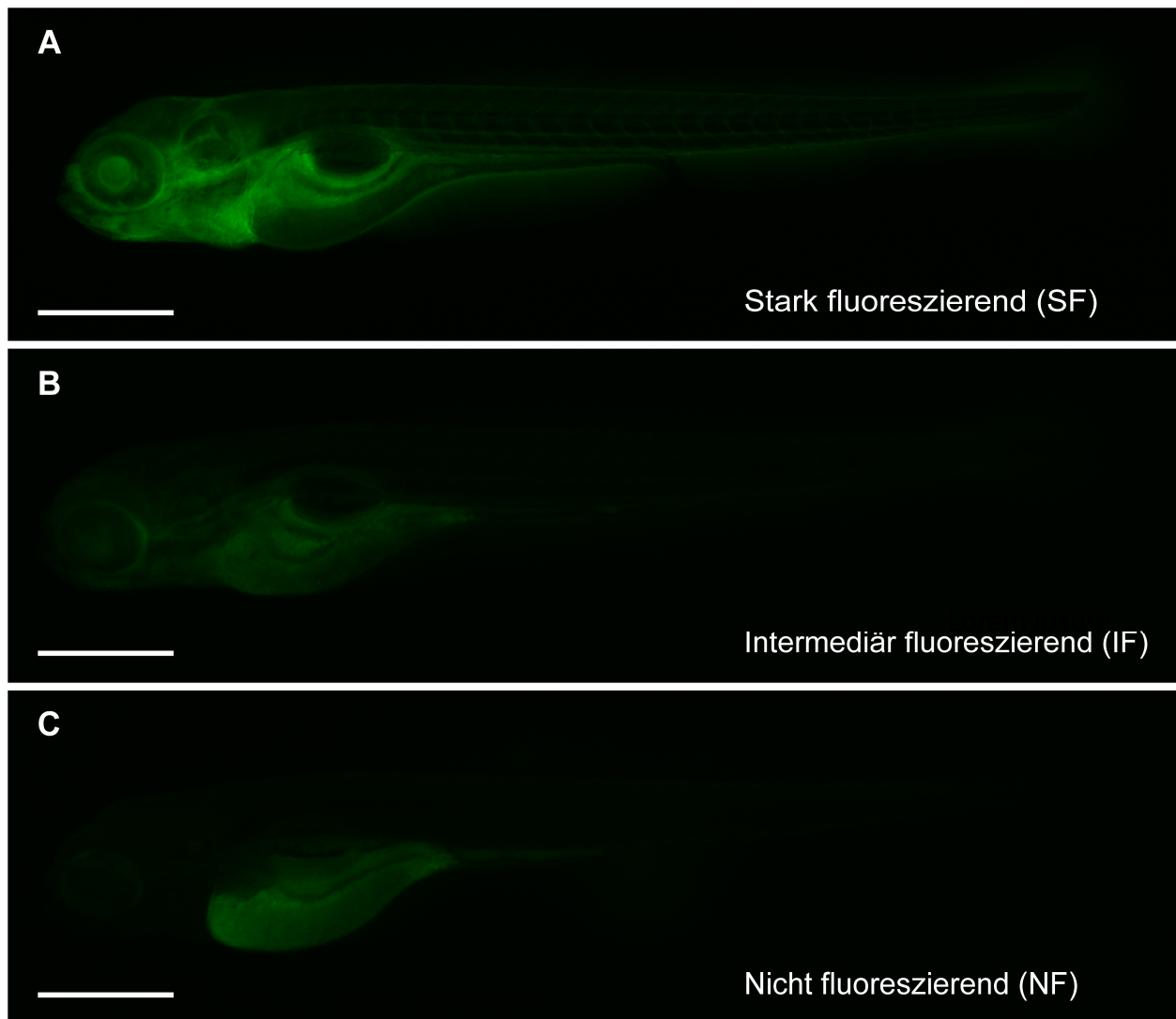
Die Charakterisierung der Morphologie und des pronephrischen Phänotyps 48 hpf zeigte einige leicht ausgeprägte, aber signifikante Veränderungen nach CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockdown von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1*. Der Funktionsverlust von *noxred1* führte zur Ausbildung milder perikardialer Ödeme. Der pronephrische Phänotyp umfasste verschiedene, gering ausgeprägte glomeruläre und tubuläre Malformationen, die in den drei Knockdown-Gruppen beobachtbar waren.

### 3.5 Funktionelle Genanalyse bei Larven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*

Die funktionellen Auswirkungen der Mutagenese auf die GFB wurden mit Hilfe der transgenen Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* untersucht. Das Tiermodell zeichnet sich durch die Expression eines fluoreszierenden Fusionsproteins aus, das unter normalen

Umständen im Gefäßsystem zirkuliert [88]. Bezüglich seiner Größe und elektrischen Ladung ähnelt das Protein dem humanen Albumin. Es wurde untersucht, ob die Fähigkeit der larvalen GFB, das Fusionsprotein zu retinieren, durch einen Funktionsverlust der Kandidatengene beeinflusst wird. Zu diesem Zweck erfolgte eine optische Beurteilung der intravasalen Fluoreszenz 120 hpf. Bezüglich der Morphologie konnten keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Mutagenesegruppen festgestellt werden. Ebenso unterschieden sich die Sterblichkeits- und Missbildungsraten der Crispants nicht von denen der Kontrollgruppe.

In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung 120 hpf in Seitenlage zeichneten sich bei den Larven unterschiedliche Intensitäten und Verteilungsmuster der intravasalen Fluoreszenz ab, anhand derer die Larven in drei Gruppen unterteilt werden konnten. Diese wurden als SF, IF und NF bezeichnet (Abb. 14). Die SF-Gruppe zeichnete sich durch eine starke intravasale Fluoreszenz aus. Besonders der Kopfbereich fluoreszierte stark. Die intersegmentalen und kaudalen Gefäße waren deutlich erkennbar. Neben der intermediären Fluoreszenzintensität mit insgesamt geringerer Ausprägung als in der SF-Gruppe war das definierende Merkmal der IF-Gruppe die vergleichsweise geringere Fluoreszenz in der Stammregion. Der Verlauf der kaudalen und intersegmentalen Gefäße konnte nicht eindeutig nachvollzogen werden. Die Kopfregion hingegen fluoreszierte. In der NF-Gruppe beschränkte sich die wahrnehmbare Fluoreszenz auf die Autofluoreszenz des Dottersacks. Kraniale und trunkale Gefäße fluoreszierten nicht.



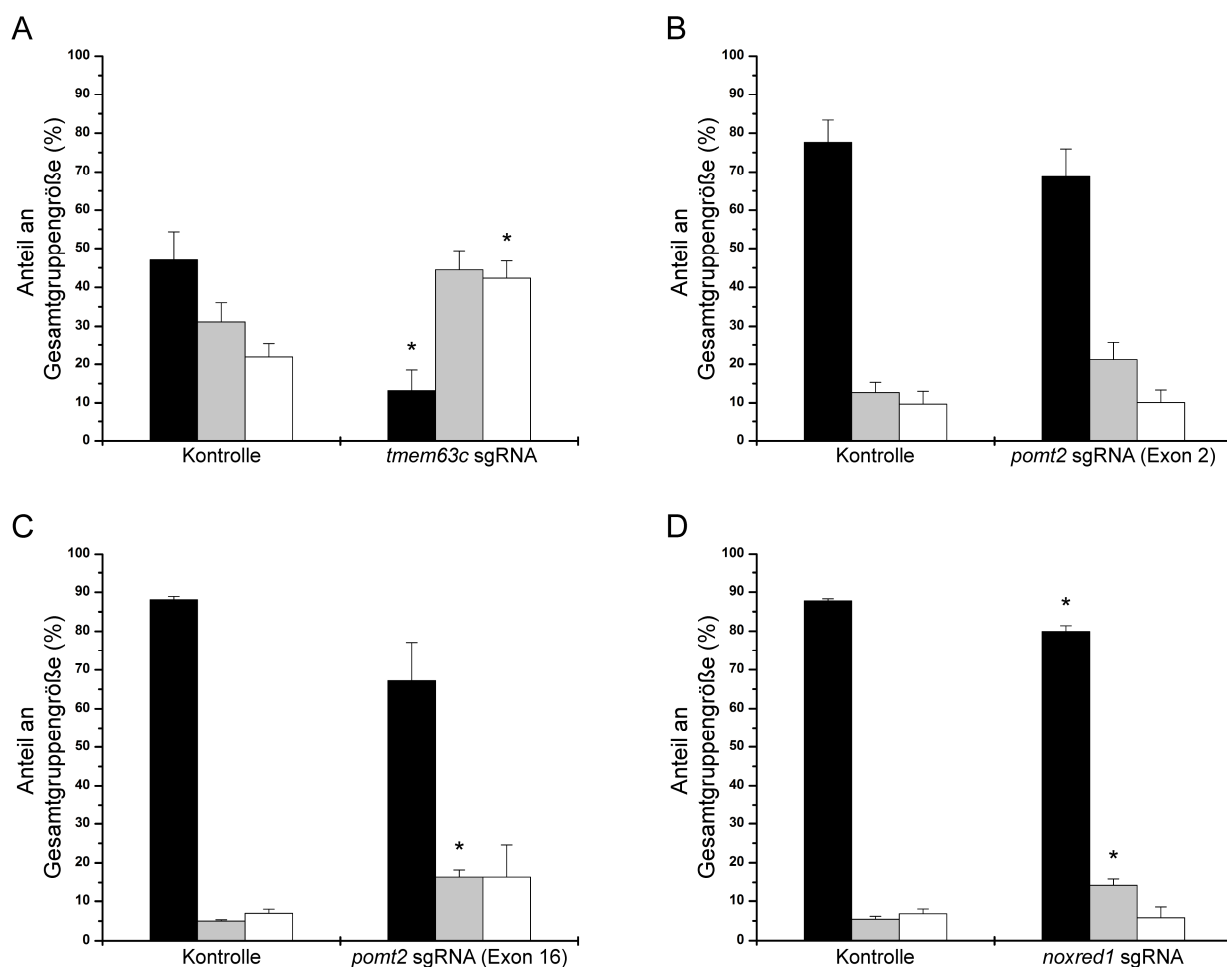
**Abb. 14: Fluoreszenz von Zebrafischlarven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*.**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von transgenen Zebrafischlarven in Seitenlage bei 3,2-facher Vergrößerung, 120 Stunden nach der Befruchtung. Das fluoreszierende Fusionsprotein aus Vitamin D-bindendem Protein und Enhanced Green Fluorescent Protein (gc-EGFP) zirkuliert im Gefäßsystem. Die phänotypische Charakterisierung zeigte drei bezüglich der Intensität ihrer intravasalen Fluoreszenz differierende Gruppen. **A** Repräsentative Zebrafischlarve der stark fluoreszierenden SF-Gruppe mit ausgeprägter intravasaler Fluoreszenz. Intersegmentale und kaudale Gefäße sind deutlich erkennbar. **B** Repräsentative Zebrafischlarve der intermediär fluoreszierenden IF-Gruppe mit mäßig ausgeprägter intravasaler Fluoreszenz. Die sichtbare Fluoreszenz konzentriert sich im kranialen Bereich. Kaudale Gefäße sind schwach erkennbar. **C** Repräsentative Zebrafischlarve der nicht fluoreszierenden NF-Gruppe. Die Autofluoreszenz des Dottersacks bleibt detektierbar, intravasale Fluoreszenz ist nicht sichtbar. Maßstab entspricht 500  $\mu\text{m}$ .

Insgesamt wurden 2439 Kontrollen und 1958 Crispant-Larven untersucht und der entsprechenden Fluoreszenzgruppe zugeteilt. Für den Knockdown von *pomt2* wurden in getrennten Versuchsreihen zwei verschiedene sgRNAs injiziert. Die Zielsequenzen waren auf Exon 2 und auf Exon 16 lokalisiert. Die Untersuchung der Kontrollgruppe ergab in verschiedenen Versuchsreihen Anteile von 20-90 % SF-Larven, 4-52 % IF-

Larven und 2-37 % NF-Larven. Im Verlauf der Experimentalphase veränderte sich die Merkmalsausprägung der Kontrollen. Die Knockdown-Analyse von *tmem63c* begann im Februar 2015. Die Kontrollgruppe beinhaltete durchschnittlich 47 % SF-Larven. Dieser Anteil stieg mit der Zeit an, sodass in den Analysen von *noxred1*, die im Dezember 2015 beendet wurden, durchschnittlich 88 % der Kontroll-Larven eine starke Fluoreszenz aufwiesen. Entsprechend sank der Anteil der Larven mit geringer ausgeprägter Fluoreszenz. Für jedes der Kandidatengene wurden mehrere Versuchsdurchläufe in zeitlichem Zusammenhang durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden gebündelt ausgewertet. Die Analysedaten der Crispants wurden ausschließlich mit Kontrolldaten der entsprechenden Versuchsreihe verglichen.

Die phänotypische Charakterisierung der *tmem63c*-Crispant (n = 655) ergab im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion des Anteils stark fluoreszierender Larven von 44 % auf 13 % ( $p < 0,0002$ ) (Abb. 15 A). Der Knockdown von *pomt2* mit der für Exon 2 designten sgRNA (n = 813) führte zu einer Reduktion des Anteils der SF-Gruppe an der Gesamtgruppe von 78 % auf 69 % ( $p < 0,02$ ) und einer relativen Vergrößerung der IF-Gruppe von 13 % auf 21 % ( $p < 0,05$ ) (Abb. 15 B). Der Einsatz der zweiten sgRNA, deren Zielsequenz auf *pomt2* Exon 16 lokalisiert war (n = 264), führte ebenfalls zu einer Vergrößerung des Anteils der Larven mit mäßig ausgeprägter Fluoreszenz. Dieser stieg von 5 % in der Kontrolle auf 16 % bei *pomt2*-Exon-16-Crispant an ( $p < 0,02$ ) (Abb. 15 C). Bei *noxred1*-Crispant (n = 226) wurde eine Reduktion des stark fluoreszierenden Gruppenanteils von 88 % auf 80 % und ein Anstieg des mäßig fluoreszierenden Gruppenanteils von 5 % auf 14 % verzeichnet ( $p < 0,008$ ) (Abb. 15 D).

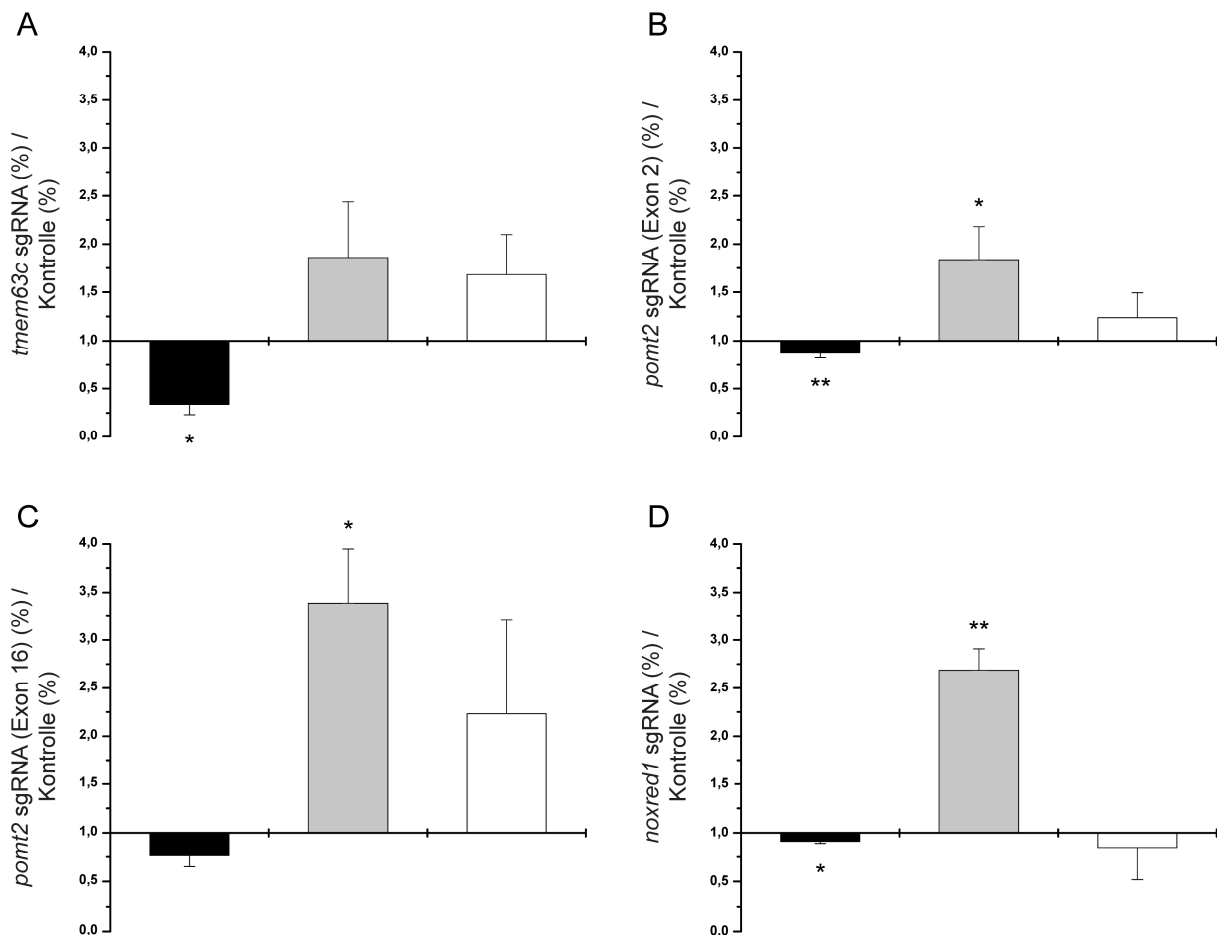


**Abb. 15: Prozentuale Anteile der phänotypischen Gruppen an der Gesamtgruppengröße bei Zebrafischarven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*.**

Starke Fluoreszenz (schwarz), intermediäre Fluoreszenz (grau), schwache Fluoreszenz (weiß). Vergleich von Kontrollen und Larven nach CRISPR/Cas9-vermitteltem Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen (Crispant), 120 Stunden nach der Befruchtung. **A** Vergleich von Kontrollen und *tmem63c*-Crispant, \*  $p < 0,005$ ; **B** Vergleich von Kontrollen und *pomt2*-Crispant (Exon 2); **C** Vergleich von Kontrollen und *pomt2*-Crispant (Exon 16), \*  $p < 0,005$ ; **D** Vergleich von Kontrollen und *noxred1*-Crispant, \*  $p < 0,008$ . *tmem63c*, Transmembrane Protein 63c; *pomt2*, Protein-O-Mannosyltransferase 2; *noxred1*, NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1; sgRNA, single guide RNA.

Um die phänotypische Analysen der Mutanten untereinander vergleichbar darzustellen, wurde jeweils der prozentuale Anteil einer Fluoreszenzgruppe der Experimentalgruppe zu dem entsprechenden Wert der Kontrollgruppe ins Verhältnis gesetzt. Der errechnete Quotient spiegelte die relative Veränderung des Anteils der jeweiligen Fluoreszenzgruppe an der Gesamtgruppengröße durch den Gen-Knockdown wider. Die statistische Analyse dieser Ergebnisse ergab eine signifikante Reduktion der stark fluoreszierenden Larvengruppe nach Knockdown von *tmem63c* ( $p < 0,0002$ ) (Abb. 16 A). Bei *pomt2*-Crispant (Exon 2) waren die Verkleinerung der SF-Gruppe ( $p < 0,002$ ) und die Vergrößerung der IF-Gruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb. 16 B). Ebenso konnte

eine Zunahme der Anzahl mäßig fluoreszierender Larven bei *pomt2*-Crispant (Exon 16) gezeigt werden ( $p < 0,02$ ) (Abb. 16 C). Für *noxred1*-Crispant ergaben die Berechnungen eine Verkleinerung der stark fluoreszierenden Gruppe ( $p < 0,02$ ) und eine Vergrößerung der IF-Gruppe ( $p < 0,002$ ) (Abb. 16 D).



**Abb. 16: Effekt des Knockdowns von Albuminurie-Kandidatengenen auf die intravasale Fluoreszenz bei Zebrafischlarven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*.**

Starke Fluoreszenz (schwarz), intermediäre Fluoreszenz (grau), schwache Fluoreszenz (weiß). Vergleich von Kontrollen und Larven nach CRISPR/Cas9-vermittelten Knockdown von Albuminurie-Kandidatengenen (Crispant) 120 Stunden nach der Befruchtung. Es wurde der Quotient aus dem prozentualen Anteil einer Fluoreszenzgruppe (stark, intermediär, schwach) an der Gesamtgröße der Crispant-Gruppe und dem entsprechenden Gegenwert der Kontrollgruppe berechnet. Ein Quotient  $>1,0$  entspricht einer relativ häufigeren Merkmalsausprägung nach Gen-Knockdown im Vergleich zur Kontrolle. **A** Effekt des Knockdowns von *tmem63c*, \*  $p < 0,0002$  vs. Kontrolle; **B** Effekt des Knockdowns von *pomt2* (Exon 2), \*  $p < 0,02$  vs. Kontrolle, \*\*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; **C** Effekt des Knockdowns von *pomt2* (Exon 16), \*  $p < 0,02$  vs. Kontrolle; **D** Effekt des Knockdowns von *noxred1*, \*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,002$ . *tmem63c*, Transmembrane Protein 63c; *pomt2*, Protein-O-Mannosyltransferase 2; *noxred1*, NADP Dependent Oxidoreductase Domain Containing 1; sgRNA, single guide RNA.



Die statistische Analyse der prozentualen Gruppenverteilung und die anschließend durchgeführte Berechnung des Quotienten dieser Anteile im Vergleich von Crispants und Kontrollen zeigten für alle Experimentalgruppen ähnliche Tendenzen auf. Insgesamt war das phänotypische Merkmal der intravasalen Fluoreszenz in den Experimentalgruppen geringer ausgeprägt als in der Kontrolle. Dies manifestierte sich in einem geringeren Anteil an stark fluoreszierenden Larven bei den Mutagenesegruppen aller Gene. Mit einer Reduktion um 66 % war diese Veränderung insbesondere bei *tmem63c*-Crispant ausgeprägt ( $p < 0,0002$ ). Gleichzeitig war insgesamt eine relative Vergrößerung des Anteils mäßig und schwach fluoreszierender Larven zu verzeichnen. Der Knockdown von *pomt2* und *noxred1* führte insbesondere zu einem höheren Anteil mäßig fluoreszierender Larven. Im Vergleich zur Kontrolle war dieser nach Knockdown von *pomt2* (Exon 16) um 238 % größer ( $p < 0,05$ ). Während der Anteil der Larven mit schwach ausgeprägter intravasaler Fluoreszenz durch den Knockdown von *pomt2* und *noxred1* nicht wesentlich beeinflusst wurde, enthielt die Crispant-Gruppe *tmem63c* im direkten Vergleich der prozentualen Anteile 20 % mehr NF-Larven, als die entsprechende Kontrolle ( $p < 0,005$ ).

## 4 Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war die Charakterisierung von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* in Bezug auf ihre pathogenetische Relevanz für die Ausbildung eines proteinurischen GFB-Defekts beim Zebrafisch. Die drei Kandidatengene sind in einem von Schulz et al. beim Rattenmodell identifizierten QTL für Albuminurie und Glomerulosklerose auf RNO6 lokalisiert [36]. Mit CRISPR/Cas9 wurde eine moderne Methode zur spezifischen Mutagenese gewählt, mit der innerhalb kurzer Zeit Funktionsverluststudien mit hohen Versuchszahlen möglich waren. Charakteristische Eigenschaften des Zebrafischmodells, wie hohe Nachkommenszahlen, kurze Generationszeiten und die extrauterine Entwicklung optisch transparenter Larven boten ideale Voraussetzungen für die Mikroinjektion sowie vielfältige phänotypische Analysen [49].

Beim Menschen sind verschiedene Erkrankungen bekannt, die durch eine Schädigung der GFB zu einer Albuminurie führen. Die Schäden können durch lokale und systemische Prozesse verursacht werden. Im Rahmen der CKD spielen hier insbesondere Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie sowie Glomerulonephritiden eine Rolle [1, 3]. Je nach zu Grunde liegender Erkrankung kann die Albuminurie Ausdruck unterschiedlicher histopathologischer Korrelate sein. Dabei kann jeder Bestandteil der GFB betroffen sein [106]. Insbesondere die hoch spezialisierten Podozyten, die mit ihren Zellfortsätzen von großer Wichtigkeit für die Funktion der GFB sind, wurden diesbezüglich eingehend untersucht [14, 106]. Viele Pathologien, die zu proteinurischen Erkrankungen führen, betreffen Komponenten der Zellarchitektur von Podozyten und ihren Schlitzdiaphragmen. Häufig sind spezifische Genmutationen für pathologische Veränderung einer glomerulären Komponente verantwortlich. So sind unter anderem Mutationen von Nephtrin und Podocin mit proteinurischen Nierenerkrankungen assoziiert [107].

Eine Voraussetzung für die Generierung aussagekräftiger Ergebnisse war die Verwendung eines Krankheitsmodells, das die komplexen molekularen Struktur-Funktions-Beziehungen der Säugetierniere widerspiegelt. Wie unter 1.5.2 ausführlich erläutert, weist der Pronephros des *Danio rerio* zahlreiche anatomische und physiologische Parallelen zur Säugetierniere auf. Er ist heute als Modell der

translationalen nephrologischen Forschung etabliert [52]. Da über das Nephron als zentrale Funktionseinheit die Architektur aller renalen Organanlagen von Vertebraten bestimmt wird, bleiben die Funktionsprinzipien der glomerulären Filtration und tubulären Reabsorption im Verlauf der Organogenese spezieübergreifend erhalten. Die detaillierte physiologische Charakterisierung des Zebrafischs zeigte, dass auch auf zellulärer und molekularer Ebene Parallelen zu höher entwickelten Nierenformen bestehen. Darüber hinaus exprimiert der Zebrafisch im Kontext der Nephrogenese zu Säugetieren orthologe Gene. Ein Beispiel hierfür ist das Wilms' Tumor Suppressor Gene 1 (*wt1*), das bei Mäusen wie auch beim Zebrafisch essentiell für die physiologische Entwicklung der Nieren ist [108, 109]. Weiterhin zeichnet sich der Zebrafisch dadurch aus, dass die glomeruläre Filtration bereits 38-48 hpf einsetzt [68]. Daher kann die phänotypische Charakterisierung junger Larven bereits Aufschluss über Struktur und Funktionalität der GFB geben. Somit verbindet der Pronephros des Zebrafischs Eigenschaften von Säugetiermodellen mit den technischen Vorzügen von Invertebraten. Die Arbeit mit dem Pronephros bewährte sich in zahlreichen Studien und trug unter anderem zum besseren Verständnis der Nephrogenese [68] und proteinurischer Pathologien wie der polyzystischen Nierenerkrankung [110] und Podozytenschäden [88] bei. Dies begründet die Eignung des Zebrafischs für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesestudien.

Mutagenesestudien sind ein wichtiger Bestandteil der biomedizinischen Forschung und seit Jahrzehnten als Methoden zur funktionellen Charakterisierung von Proteinen etabliert [69]. Seit der Entwicklung der klassischen Restriktionsendonukleasen in den 1970er Jahren wurde das Angebot an gentechnischen Methoden durch mehrere Innovationen erweitert. ZFN, TALEN und CRISPR/Cas9 zeichnen sich gegenüber ihren Vorgängern insbesondere dadurch aus, dass sie über eine von der Schnittdomäne separierte DNA-Erkennungssequenz verfügen [73, 74, 75]. Dies ermöglicht eine isolierte Modifikation der Erkennungssequenz und somit eine deutliche Vereinfachung der Neuprogrammierung. Alle drei Methoden wurden bereits beim Zebrafisch angewandt [60, 61, 62]. Um von den Vorteilen des Zebrafischmodells profitieren und effiziente Mutagenesestudien mit hohen Versuchszahlen durchführen zu können, wurden bei der Wahl der Methode für diese Arbeit entsprechende Kriterien beachtet. Es sollte eine Methode verwendet werden, die bei unkomplizierter und flexibler Anwendbarkeit den spezifischen und effizienten Knockdown der Kandidatengene

ermöglicht. CRISPR/Cas9 zeichnet sich durch die Möglichkeit der zeit- und kosteneffizienten Programmierung aus, die in der Struktur der RNA-gesteuerten Nuklease begründet liegt [75]. Die Wirksamkeit der Methode im Kontext von Funktionsverluststudien beim Zebrafisch wurde mehrfach belegt [62, 111]. Dies begründete die Verwendung von CRISPR/Cas9 als Methode für die im Rahmen dieser Arbeit durchzuführenden Mutagenesestudien.

Neben der Anwendbarkeit sind insbesondere Wirksamkeit und Spezifität entscheidende Kriterien bei der Entwicklung und Weiterentwicklung von Mutagenesetechniken. Die Effizienz von CRISPR/Cas9 wurde in bisherigen Arbeiten positiv bewertet. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten in ihren Studien Mutationen in 24-99 % der Versuchstiere verzeichnen [62, 92, 94, 111]. Bezüglich der Spezifität stellt die RNA-gesteuerte Cas9-Endonuklease Wissenschaftler strukturbedingt vor eine Herausforderung. Die kurze Erkennungssequenz der sgRNA kann insbesondere bei Anwendung in großen Genomen zu einer Beeinträchtigung der Spezifität führen. In verschiedenen Studien wurden nicht unerhebliche Raten von Mutationen an unerwünschten Lokalisationen registriert [112, 113]. Der aus solchen Off-Target-Mutationen resultierende Phänotyp kann das Ergebnis der folgenden Untersuchungen verfälschen. Seit der Etablierung von CRISPR/Cas9 als Mutagenesetechnik trugen detaillierte Charakterisierungen des Systems dazu bei, die Methode in Hinblick auf diese Eigenschaften zu optimieren. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde auf Erkenntnisse von Gagnon et al. [92], Bassett et al. [94] und Mosimann et al. [95] zurückgegriffen. Die sgRNA für den Knockdown von *tmem63c* beim Zebrafisch wurde entsprechend dieser Erkenntnisse manuell designt. Die Auswahl der Zielsequenzen für *pomt2* und *noxred1* erfolgte mit Hilfe des Online-Tools ChopChop, das für eine gegebene DNA-Sequenz mögliche Zielsequenzen aufzeigt und anhand verschiedener Kriterien ihre voraussichtliche Spezifität und Effizienz bewertet [93]. Ein Kriterium für Zielsequenzen war das Vorhandensein der 3' PAM-Sequenz 5'-NGG-3', die als spezifische PAM-Sequenz der SpCas9 identifiziert wurde [75]. Folgende Parameter flossen in die Bewertung der potenziellen Zielsequenzen ein: (I) identifizierte Off-Targets im relevanten Genom, (II) Mismatches innerhalb dieser Off-Targets im Vergleich zur Zielsequenz, (III) der GC-Gehalt der Zielsequenz und (IV) ein Guanin an Position 20 der Zielsequenz [93]. Bei der Entwicklung des Online-Tools wurde auf bereits publizierte Daten von Gagnon et al. [92] und Hsu et al. [112]

zurückgegriffen. Der Algorithmus zur Bewertung möglicher Off-Targets basiert auf Erkenntnissen von Hsu et al. [93, 112]. Demnach toleriert die Cas9 aus *Streptococcus pyogenes*, wie sie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam, Mismatches zwischen DNA und sgRNA in Abhängigkeit von deren Frequenz und Position innerhalb der DNA-Erkennungssequenz. Mismatches werden eher toleriert, wenn sie distal der PAM-Sequenz lokalisiert sind. Die 8-14 bp proximal der PAM-Sequenz gelegene Region erwies sich am sensibelsten gegenüber Mismatches [112]. Gagnon et al. konnten im Rahmen ihrer Untersuchungen einen GC-Gehalt von über 50 % und eine Guaninbase an Position 20 mit einer höheren Mutageneseeffizienz assoziieren [92].

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Knockdowns von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* konnten diese Idealbedingungen nicht vollständig erfüllt werden. Bei der Auswahl der Zielsequenzen wurden daher mit absteigender Priorität die PAM-Sequenz, identifizierte Off-Targets und der GC-Gehalt berücksichtigt, um möglichst optimale Voraussetzungen für die Mutagenese zu schaffen. Ein Großteil der identifizierten potenziellen Off-Targets war in nicht proteinkodierenden Sequenzabschnitten lokalisiert. Alle potenzielle Off-Targets unterschieden sich an drei Nukleotiden von der jeweiligen Zielsequenz. Für die Zielsequenzen zum Knockdown von *tmem63c* und *pomt2* wurde jeweils ein mögliches Off-Target identifiziert, das innerhalb eines Exons eines anderen Gens lokalisiert war. Eine Assoziation der Gene (zebrafish gene collection: 172051, disks large-associated protein 2a, slingshot protein phosphatase 1a) mit Nierenschädigungen ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht bekannt. Daher wurde die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der Versuchsergebnisse als gering eingeschätzt. Für die Zielsequenz innerhalb von *noxred1* wurden insgesamt zwölf potenzielle Off-Targets berechnet, von denen sechs nicht innerhalb proteinkodierender Abschnitte lokalisiert waren. Die verbleibenden möglichen Off-Targets waren innerhalb von Introns oder untranslatierten Bereichen folgender Gene lokalisiert: catenin (cadherin-associated protein) alpha 2, xyloside xylosyltransferase 1, solute carrier family 16 member 7, pre-B-cell leukemia transcription factor 4, V-set and transmembrane domain containing 2B und elongator complex protein 5. Alle möglichen Off-Targets unterschieden sich an drei Nukleotiden von der Zielsequenz auf Chromosom 17. Aufgrund der höheren Anzahl potenzieller Off-Targets ist die Wahrscheinlichkeit einer Beeinflussung der Ergebnisse höher einzuschätzen als bei dem Knockdown von *tmem63c* und *pomt2*. Dennoch ergab auch in diesen Fällen eine

Recherche in den Datenbanken PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und Ensembl (<https://www.ensembl.org>) keine Assoziation zu spezifischen Nierenphänotypen. Gegen eine ausgeprägte Beeinflussung der Ergebnisse durch Off-Target-Effekte sprechen die miteinander vereinbaren Effekte nach Knockdown von *pomt2* mit zwei unterschiedlichen sgRNAs. Ausschließen lässt sich ein ungewollter Effekt ohne entsprechende Genotypisierung jedoch nicht, sodass dies als mögliche Fehlerquelle in Betracht gezogen werden muss.

Neben der Nukleotidsequenz der Ziel-DNA konnte die Applikationsform der Cas9 als ausschlaggebender Faktor für die Wirksamkeit identifiziert werden. Seit der Etablierung der CRISPR/Cas9-vermittelten Mutagenese wurde mit verschiedenen Methoden versucht, eine möglichst hohe Verfügbarkeit der Endonuklease im Nukleus zu erreichen. Während der Vorbereitung dieser Arbeit waren bereits Studienergebnisse zu der Transfektion von Cas9-Protein [92], Cas9-Plasmid-DNA [86] und Cas9-mRNA [92] verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Injektionen von Cas9-Protein durchgeführt, die von Gagnon et al. als effizient und nebenwirkungsarm identifiziert wurden [92]. Sie konnten mit einer im Vergleich zur Injektion von Cas9-mRNA sechsfach höheren Effizienz assoziiert werden und zeichneten sich durch hohe Überlebensraten von >90 % aus. Das Cas9-Protein ist nach der Co-Injektion mit sgRNA sofort verfügbar. Außerdem wird das Risiko der Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom nach Cas9-vermittelter DSB-Induktion vermieden [92]. Die Mutagenese mit den erläuterten Methoden führte im Rahmen dieser Arbeit in 91 % der analysierten Embryonen (n = 11) zu nachweisbaren Mutationen. In den betroffenen Embryonen wurden in 82 % der analysierten Sequenzen (n = 67) Veränderungen verzeichnet. Diese Ergebnisse sind mit zuvor publizierten Daten vereinbar [62, 92, 94]. Anzumerken ist, dass die zuvor berechnete Effizienz der Zielsequenzen für den Knockdown von *tmem63c* und *pomt2* zwischen 56 % und 61 % lag, während für die Zielsequenz zum Knockdown von *noxred1* eine Effizienz von 25,6 % errechnet wurde. In diesem Kontext ist der GC-Gehalt zu beachten, der in erstgenannten Fällen deutlich höher war. Die Ergebnisse der Genotypisierung zeigten hiermit vereinbar ausgeprägtere Veränderungen nach Knockdown von *tmem63c* und *pomt2*. Unter anderem war der Anteil unbetroffener Sequenzen deutlich geringer (Abb. 5-7).

Die Wirksamkeit des Mutagenesewerkzeugs CRISPR/Cas9 wurde im Rahmen dieser Arbeit als sehr gut bewertet. Dank der Flexibilität des Systems ließen sich die gesetzten Ziele innerhalb kurzer Zeit umsetzen. Dennoch handelt es sich noch um eine junge Methode und nicht alle Einzelheiten ihrer Funktionsweise sind bekannt. Insbesondere wegen der großen Aufmerksamkeit, die der Nuklease derzeit gewidmet wird, ist davon auszugehen, dass auch zukünftig neue Erkenntnisse und Innovationen zu einer Optimierung der Methode beitragen werden. Bisher wurde unter anderem versucht, die Spezifität durch den simultanen Einsatz zweier sgRNAs mit benachbarter Ziel-DNA zu erhöhen [114]. Erfolgversprechende Studienergebnisse erbrachte ebenso die Konversion der Cas9 in eine Nickase [113]. Darüber hinaus erleichtern detailliertere Charakterisierungen und eine wachsende verfügbare Datenmenge über in verschiedenen Organismen durchgeführte Mutagenesestudien die Vorhersage potenzieller Off-Targets.

Um eine Grundlage für die Interpretation der erarbeiteten Ergebnisse zu schaffen, gingen den Versuchen Recherchen zu den Kandidatengen voraus. Es sollten der aktuelle Wissensstand zur Funktion der Transkripte und bereits assoziierte Phänotypen erfasst werden. *Tmem63c* ist Teil der TMEM-Familie, die etwa 300 verschiedene Proteine umfasst [98]. Die funktionelle Bedeutung von *Tmem63c* ist bisher nicht vollständig geklärt. Zhao et al. konnten der murinen *Tmem63*-Familie, die drei Proteine umfasst, eine osmorezeptive Funktion zuordnen [99]. Sie vermuteten, dass es sich um Orthologe der in Pflanzen identifizierten, osmolaritätsabhängigen Kationenkanalproteine AtCSC1 und OSCA1 handelt. Eine entsprechende Funktion in Podozyten könnte eine funktionelle Relevanz von *Tmem63c* für die GFB-Integrität erklären. In einer weiteren Studie ließ sich die hyperosmolaritätsabhängige Aktivierung von *Tmem63c* jedoch nicht bestätigen, sodass es zur abschließenden Klärung zusätzlicher Untersuchungen bedarf [115]. Kürzlich wurde von Schulz et al. eine umfassende Charakterisierung von *Tmem63c* als Albuminurie-Kandidatengen publiziert [43]. Verschiedene Untersuchungen beim Zebrafisch, bei der Ratte und beim Humanpatienten lieferten weitere Hinweise auf die Bedeutung von *Tmem63c* für die funktionelle Integrität der GFB. Der durch den CRISPR/Cas9-vermittelten Knockdown von *tmem63c* induzierte, albuminurieartige Phänotyp beim Zebrafisch ließ sich durch Einsatz von Morpholino Antisense Oligonukleotiden reproduzieren. Erfolgreiche Rescue-Versuche durch zeitgleiche Injektion von *tmem63c* mRNA und dem sgRNA-Cas9-Komplex belegten

darüber hinaus die Spezifität dieses Phänotyps. Elektronenmikroskopisch konnten ausgeprägte ultrastrukturelle Veränderungen der GFB von *tmem63c*-Crispant nachgewiesen werden. Hierzu zählten unter anderem Podozytenschäden mit signifikant verminderter Anzahl an Schlitzdiaphragmen. Um die klinische Relevanz von TMEM63C für Nierenschädigungen beim Humanpatienten zu evaluieren, wurde die Genexpression in Glomeruli gesunder Kontrollen und Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose verglichen. Diese weisen histopathologische Veränderungen auf, die auch bei alternden MWF-Ratten ähnlich beschrieben wurden [116]. Zu den Charakteristika der fokal segmentalen Glomerulosklerose gehören Podozytenschäden und die Ausbildung einer glomerulären Proteinurie [117]. Bei gesunden Kontrollen wurde TMEM63C in Podozyten aller Glomeruli exprimiert. Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen eine signifikant verminderte Expression von TMEM63C bei Patienten mit fokal segmentaler Glomerulosklerose [43]. Die zusätzlichen Erkenntnisse zur Funktion von *Tmem63c* sind mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar.

*Pomt2* kodiert für die Protein-O-Mannosyltransferase 2, welche zu den Glykosyltransferasen gehört und an der posttranslationalen O-Glykosylierung von Proteinen beteiligt ist [100]. Mutationen des humanen POMT2-Gens sind mit verschiedenen Arten der kongenitalen Alpha-Dystroglykanopathie assoziiert, die pathophysiologisch auf eine fehlerhafte, posttranslationale O-Glykosylierung des Oberflächenmembranproteins  $\alpha$ -Dystroglykan zurückzuführen sind. Der klinische Phänotyp variiert abhängig von der Art der Mutation und reicht von milden muskulären Dystrophien bis zum Walker-Warburg Syndrom, das von muskulärer Dystrophie, gestörter neuronaler Migration und ophthalmologischen Symptomen geprägt ist [100]. Im Jahr 2010 führten Avsar-Ban et al. eine funktionelle Analyse von *pomt2* im Zebrafischmodell durch und bestätigten die O-Mannosyltransferaseaktivität des Proteins [101]. Mittels qPCR konnte eine ubiquitäre Expression von *pomt2* mRNA während der gesamten embryonalen Entwicklung mit Höchstwerten bei 0 hpf, 6 hpf und 24 hpf festgestellt werden. Der Morpholino-gestützte Knockdown im Ein- oder Zweizellstadium führte zu einer detektierbaren Entwicklungsverzögerung im Vergleich zur Kontrollgruppe ab 18 hpf. 48 und 72 hpf wurden weitere Auffälligkeiten, wie verdrehte Schwanzflossen, ödematöse Perikardien und eine abnorme Pigmentierung der Augen beschrieben [101]. Diese morphologischen Veränderungen konnten in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden.



Zu *noxred1* waren zum gegebenen Zeitpunkt nur spärliche Informationen verfügbar. Eine Suchanfrage in den Datenbanken PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) und PubMed Central (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) am 01.05.2016 ergab zwei Treffer. Die alternative Bezeichnung des Transkripts, putative pyrroline-5-carboxylate reductase-like protein, ist auf die strukturellen Eigenschaften zurückzuführen, die Anhaltspunkte für eine Oxidoreduktaseaktivität des Proteins liefern [102]. Die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase katalysiert die Prolinsynthese und ist beim Menschen unter anderem mit dem Prostatakarzinom assoziiert [102].

Die recherchierten Daten erlaubten zum gegebenen Zeitpunkt keine eindeutige Assoziation der Kandidatengene mit proteinurischen GFB-Schäden beim Zebrafisch oder anderen Organismen. Als einziges der drei Gene wurde *pomt2* bereits beim Zebrafisch charakterisiert. Die assoziierte Ödemneigung, die Teil eines vielseitigen Phänotyps war [101], wäre als Korrelat einer Nierenschädigung denkbar.

Für die vorliegende Arbeit wurde das CRISPR/Cas9-System angewandt, um durch DSB-Induktion einen Knockdown jeweils eines der Kandidatengene *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* bei Zebrafischembryonen zu bewirken. Die Auswirkungen des Knockdowns wurden anschließend in verschiedenen Untersuchungen analysiert. Die Charakterisierung der Morphologie der Larven 48 hpf sollte erste Hinweise auf mögliche Auswirkungen der Mutagenese liefern. Die hellfeldmikroskopische Untersuchung bei 4-facher Vergrößerung diente dem Screening auf embryogenetische Entwicklungsverzögerungen im Vergleich zur Kontrolle, Fehlbildungsraten und somatische Auffälligkeiten. Dabei entsprach das Erscheinungsbild von *tmem63c*- und *pomt2*-Crispant dem der Kontrollen. Somit konnte der von Avsar-Ban et al. beschriebene Phänotyp nach *pomt2*-Funktionsverlust [101] nicht bestätigt werden. Eine Ödemneigung, die sich als Folge eines renalen Proteinverlustes entwickeln kann, wurde nur in *noxred1*-Crispant registriert. Hier bestand ein gehäuftes Auftreten milder perikardialer Wassereinlagerungen. Die Ödembildung wurde beim Zebrafisch bereits als charakteristischer Phänotyp im Rahmen renaler Pathologien beschrieben [118]. Jedoch können Ödeme können als unspezifisches Symptom beispielsweise auch in Folge von kardialen Prozessen, Intoxikationen oder verschiedenen Entwicklungsstörungen auftreten [118]. Darüber hinaus schließt ein physiologischer Habitus der Larven eine glomeruläre Schädigung nicht aus [119].

Spezifischere Informationen zum pronephrischen Phänotyp ergab die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der embryonischen Nieren 48 hpf in transgenen Larven der Linie *Tg(wt1b:EGFP)*. Bollig et al. generierten die transgene Linie *Tg(wt1b:EGFP)*, um mit Hilfe von EGFP das Expressionsmuster von *wt1b* zu illustrieren und regulierende Elemente der nierenspezifischen Expression zu identifizieren [56]. Das humane WT1-Gen kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit regulatorischer Bedeutung für die Organogenese insbesondere der Nieren, der als Tumorsuppressor fungiert und bei Mutationen mit dem pädiatrischen Wilms'-Tumor und urogenitalen Malformationen assoziiert ist [108, 120]. Der Zebrafisch verfügt über zwei Paraloge des *wt1*-Gens, *wt1a* und *wt1b*, die für zwei Proteine mit einer zu 90 % identischen Aminosäuresequenz kodieren [121]. Eine Expression von *wt1b* war im Pronephros ab 15 hpf nachweisbar [121]. Durch die Fusion des Reportergens an einen nicht kodierenden Abschnitt, der Kontrollregionen für *wt1b* enthält, wurde die transgene Linie *Tg(wt1b:EGFP)* generiert [56]. Das Expressionsmuster des Reportergens spiegelte somit das des *wt1*-Paralogs mit einer Verzögerung von 1-2 h wider und konnte fluoreszenzmikroskopisch nachvollzogen werden. Beginnend mit einer bilateralen Streifenform im intermediären Mesoderm um 17 hpf verdichtet sich die EGFP-Expression ab etwa 24 hpf in den lateralen glomerulären Strukturen. Die zusätzliche tubuläre EGFP-Expression ermöglicht ab etwa 35 hpf die umfassende Darstellung der pronephrischen Region [121]. *Tg(wt1b:EGFP)* hat sich unter anderem als Modell für genetische Funktionsanalysen [121] und zur Analyse der Effekte potenziell nephrotoxischer Agenzien auf die Nephrogenese [119] bewährt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermöglichte *Tg(wt1b:EGFP)* bei 10-facher Vergrößerung eine detaillierte, fluoreszenzmikroskopische *in vivo*-Analyse der relevanten Strukturen. Neben einer Kontrollgruppe wurde auch eine Cas9-Kontrollgruppe untersucht. Die injizierte Lösung enthielt, abgesehen von der sgRNA, alle Bestandteile der zur Mutagenese verwendeten Lösung. Somit sollte eine unphysiologische Entwicklung der Larven im Kontext der erfolgten Manipulationen oder einer eventuellen toxischen Wirkung des Cas9-Enzyms ausgeschlossen werden. Der Phänotyp der Cas9-Kontrollen entsprach in allen Belangen dem Phänotyp der Kontrollgruppe. Schwerwiegende embryotoxische Effekte im Kontext der Intervention konnten somit ausgeschlossen werden. Die Analyse der Crispants zeigte eine grundsätzlich erhaltene Integrität der anatomischen Struktur mit mild ausgeprägten, mikroanatomischen Veränderungen am Pronephros. Ein Merkmal, das in allen Crispant-Gruppen beobachtet wurde, war der im

Vergleich zur Kontrolle größere Abstand zwischen den beiden Glomeruli. Dies könnte als Zeichen einer verzögerten glomerulären Fusion gewertet werden, die im Rahmen der physiologischen Entwicklung am zweiten Tag der Embryogenese abgeschlossen sein sollte [68]. Auffällig war auch die leicht asymmetrische Konstruktion des Pronephros bei Crispants, die anhand der tubulären Winkel quantifiziert werden konnte und sich im Gegensatz zu den symmetrisch angelegten Pronephroi der Kontrollgruppe und der Cas9-Kontrollen präsentierte. In der Gruppe der *tmem63c*-Crispans war zudem als spezifischer Phänotyp ein undulierender Verlauf der Tubuli und proximalen Konvolute sichtbar. Diese Beobachtungen sind konkordant mit den Ergebnissen von Westhoff et al., die die Nephrotoxizität verschiedener Medikamente im Zebrafischmodell überprüften [119]. In der Folge beschrieben sie unter anderem glomeruläre Malformationen, zystische Veränderungen der Glomeruli, vergrößerte tubuläre Winkel und eine verringerte maximale tubuläre Distanz. Die von Westhoff et al. beschriebenen Phänotypen wurden durch Applikation nierentoxisch wirkender Medikamente induziert. Es wäre also denkbar, dass die Injektion der sgRNA bei den Zebrafischembryonen leicht nephrotoxische Effekte hatte.

Ausgeprägte organogenetische Störungen des Pronephros nach Knockdown der Kandidatengene konnten mithilfe der durchgeführten Untersuchung ausgeschlossen werden. Die Funktionalität der GFB wird maßgeblich auf Zell- und molekularer Ebene determiniert. Grundlage der größen- und ladungssensitiven Filtration ist unter anderem eine physiologische Zell-Zell-Interaktion der Podozyten. Spezialisierte Transmembranproteine vernetzen die Podozytenfüßchen untereinander, sodass die verbleibenden Schlitzdiaphragmen von einer selektiv permeablen Membran bedeckt sind [122]. Eine Funktionseinschränkung der Schlitzdiaphragmen führt zu einem Verlust hochmolekularer Proteine und folglich zur Proteinurie. Zwei für die Integrität dieser Schlitzdiaphragmen bedeutsame Proteine sind Nephrin und Podocin. Während Nephrin unmittelbarer Bestandteil der Schlitzdiaphragmen ist, trägt Podocin als intrazelluläres Protein zum Aufbau der Zellkontakte bei. Mutationen beider Proteine führen zu einem Defekt der GFB und sind mit verschiedenen Nierenerkrankungen assoziiert [122]. Eine Charakterisierung des im Rahmen dieser Arbeit induzierten Phänotyps auf zellulärer und molekularer Ebene wäre aufschlussreich. Dabei könnten auf Erkenntnisse aus bereits durchgeführten Studien zurückgegriffen werden. Zhou et al. nutzten die transgenen Zebrafischlinien *flk1::GFP* und *pod::NTR-mCherry*, um

konfokalmikroskopisch das Gefäßendothel und die Podozyten darzustellen [88]. Das *in vivo*-Screening könnte durch histologische Analysen sinnvoll ergänzt werden [119]. Das von Schulz et al. verwendete albuminurische MWF-Rattenmodell zeichnet sich durch progrediente Glomerulosklerose, Tubulosklerose und renale interstitielle Fibrose aus [36, 37, 39]. Die renale interstitielle Fibrose wies darüber hinaus eine signifikante Kopplung zum QTL für Albuminurie auf RNO6 auf [36, 42]. Vor diesem Hintergrund wären zusätzliche ultrastrukturelle Analysen beim Zebrafisch von besonderem Interesse.

Die Albuminurie ist beim Menschen ein sensibles Symptom einer defekten GFB und eine entsprechende Diagnostik ist klinisch etabliert [1]. Trotz der vollständigen Genomsequenzierung konnte jedoch beim Zebrafisch bisher kein Albumin-Ortholog identifiziert werden [88]. Seit einigen Jahren steht die transgene Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* zur Verfügung, die hier als Modell für einen proteinurischen Defekt der GFB verwendet wurde [88]. Sie wurde 2012 von Zhou und Hildebrandt zur Dokumentation der Auswirkungen eines Podozytenschadens auf Struktur und Funktion der GFB generiert. Die Reporterlinie exprimiert ein Fusionsprotein aus VDBP und EGFP unter der Kontrolle eines Promoters des liver-specific fatty acid-binding protein (*l-fabp*). Das Tracerprotein aus VDBP und GFP weist mit einem Molekulargewicht von 79,6 kDa und einem isoelektrischen Punkt bei 5,97 bezüglich Größe und Ladung mit Humanalbumin vergleichbare Charakteristika auf [88]. Es wird nach der hepatischen Synthese gleich dem endogenen VDBP in das Gefäßsystem sezerniert und sollte unter physiologischen Bedingungen die GFB nicht in wesentlichen Mengen passieren können.

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*-Larven wurde 120 hpf durchgeführt. Die Ergebnisse sprechen für einen vermehrten pronephrischen Verlust des Tracerproteins nach erfolgtem Knockdown der Kandidatengene. Um einen Vergleich der verschiedenen Experimentalgruppen zu ermöglichen, wurden die Larven bei der phänotypischen Untersuchung entsprechend der Intensität ihrer intravasalen Fluoreszenz in drei phänotypische Gruppen aufgeteilt. Diese Gruppen wurden in Reihenfolge einer abnehmenden Merkmalsausprägung als SF, IF und NF bezeichnet. Die Anteile der phänotypischen Gruppengrößen an der Gesamtgruppengröße wurden zwischen Crispants und Kontrollen verglichen. Die Kontrollgruppen enthielten überwiegend stark fluoreszierende Larven. Es wurde gezeigt, dass der Knockdown von

*tmem63c* und *noxred1* zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl stark fluoreszierender Larven führte. Diese Veränderung war bei *tmem63c*-Crispans besonders ausgeprägt. Hier zeigte sich eine Reduktion des SF-Gruppenanteils in Relation zum Kontrollwert um über 60 %. Gleichzeitig war insbesondere bei *pomt2*- und *noxred1*-Crispans der im Vergleich zu den Kontrollen höhere Anteil mäßig fluoreszierender Larven ausgeprägt. Dieser stieg nach Knockdown von *pomt2* (Exon 16) um 237 %. Die Reduktion der Fluoreszenz wurde als Korrelat eines vermehrten renalen Verlusts des fluoreszierenden Tracerproteins gewertet, der zu einer geringeren intravasalen Konzentration führte. Eine vermehrte glomeruläre Permeation des Proteins spricht für eine Schädigung der GFB und somit für eine Funktionseinschränkung des larvalen Pronephros. Am eindrucksvollsten zeigte sich der Effekt des Knockdowns von *pomt2* und *noxred1* an der Vergrößerung des Anteils mäßig fluoreszierender Larven. Unter der Annahme, dass durch den Knockdown eines Gens ein funktioneller Schaden der GFB hervorgerufen wurde, würde eine Larve mit ursprünglich stark ausgeprägter Fluoreszenz, wie sie mehrheitlich in den Kontrollgruppen vertreten war, durch einen pronephrischen Proteinverlust eine geringer ausgeprägte intravasale Fluoreszenz aufweisen. Dies könnte die nach Knockdown von *pomt2* und *noxred1* signifikant größeren IF-Anteile bei hiervon nicht betroffenen NF-Anteilen erklären.

Interessant war auch der Einsatz zweier verschiedener sgRNAs für den Knockdown von *pomt2*. Die zuerst eingesetzte sgRNA zielte auf eine Sequenz auf Exon 2, während sich die Zielsequenz der zweiten sgRNA auf Exon 16 befand. Auch wenn durch die statistischen Analysen einige Unterschiede sichtbar wurden, waren insgesamt die gleichen Tendenzen erkennbar. In beiden Fällen wurde tendenziell eine Reduktion der Fluoreszenzintensität erwirkt, wobei der Anteil mäßig fluoreszierender Larven am deutlichsten betroffen war. Dies wurde als Bestätigung der Aussagekraft der durchgeführten Funktionsverluststudien gewertet.

Dass sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Experimentalgruppen jeweils alle Ausprägungsstufen des relevanten Phänotyps vertreten waren, wurde auf eine heterozygote Ausprägung des entsprechenden Merkmals bei den Parentaltieren zurückgeführt. Im Verlauf der Experimentalphase, die sich über etwa ein Jahr erstreckte, zeigte sich eine Veränderung der jeweiligen Gruppenanteile innerhalb der Kontrollen. Wiesen in den ersten Experimenten noch durchschnittlich 47 % der

Kontrolllarven eine stark ausgeprägte Fluoreszenz auf, so stieg dieser Anteil auf durchschnittlich 88 % in den Knockdown-Analysen von *pomt2* (Exon 16). Die Anteile der Larven mit schwächer ausgeprägter Fluoreszenz sanken entsprechend ab. Dies lässt sich mit den zur Linienhaltung durchgeführten Verpaarungen erklären. Die Nachkommen wurden 120 hpf selektiert, bevor sie in das Tanksystem zur Aufzucht eingegliedert wurden. Dabei wurden sowohl Larven mit Missbildungen oder auffälligen Entwicklungsverzögerungen als auch solche mit schwach ausgeprägter Fluoreszenz aussortiert und entsprechend den Leitlinien getötet [97]. Auf diese Weise sollte eine Linie mit möglichst gesunden und homogen fluoreszierenden Tieren erhalten werden. Mit Hilfe des berechneten Quotienten aus den jeweiligen prozentualen Anteilen in der Experimentalgruppe und der Kontrollgruppe konnte der Effekt eines Gen-Knockdowns auf die intravasale Fluoreszenz unabhängig von der ursprünglichen Merkmalsausprägung in der Kontrolle bewertet werden. Dies ermöglichte ebenso einen Vergleich zwischen den drei Mutagenesegruppen. Daher ist die Bedeutung der sich im zeitlichen Verlauf ändernden Kontrolle für die durchgeführten Analysen als gering zu bewerten.

Der CRISPR/Cas9-vermittelte Knockdown der Kandidatengene *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* beim Zebrafisch konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Genotypisierung der Embryonen nach Knockdown belegte eine effektive Mutagenese. In der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung des Pronephros wurde in allen drei Experimentalgruppen milde strukturelle Veränderungen registriert, die in ähnlicher Form zuvor mit medikamenteninduzierten Nierenschäden beim Zebrafisch assoziiert wurden. Ausgeprägte Strukturschäden oder Entwicklungsstörungen wurden ausgeschlossen. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* 120 hpf sprechen für einen renalen Proteinverlust aufgrund eines GFB-Defekts nach Funktionsverlust der Kandidatengene. Alle Gene wurden mit einem signifikanten Rückgang der intravasalen Tracerprotein-Konzentration assoziiert. *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* waren zuvor als Kandidatengene für Albuminurie im Rattenmodell identifiziert worden. Im Genom der Ratte befinden sie sich innerhalb eines QTL für Albuminurie auf RNO6 [36]. Sie zeichneten sich durch eine differentielle Genexpression in isolierten Glomeruli albuminurischer Ratten aus. Die speziesübergreifend bestehende Relevanz von *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* für die Integrität der GFB konnte durch die vorliegende Arbeit validiert werden. Es handelt sich um die erste CRISPR/Cas9-

basierte, funktionelle Charakterisierung von *tmem63c*, *pomt2* und *noxred1* beim Zebrafischmodell.

Aufbauend auf den erarbeiteten Ergebnissen sind weitere Analysen nötig, um die Erkenntnisse zu sichern und auszuweiten. Aufschlussreich wären insbesondere ergänzende Charakterisierungen der Phänotypen sowie die Überprüfung der Ergebnisse durch den Einsatz weiterer Methoden zur Mutagenese. Der strukturelle, pronephrische Phänotyp beim Zebrafisch könnte durch elektronen- oder konfokalmikroskopische sowie histologische Untersuchungen noch detaillierter analysiert werden. Eine Assoziation der Kandidatengene mit ultrastrukturellen Schädigungen einzelner GFB-Komponenten könnte so überprüft und pathologische Korrelate der Proteinurie könnten identifiziert werden. Der proteinurische Phänotyp nach Knockdown der Kandidatengene bei Larven der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* ließe sich durch einen antikörpergestützten Nachweis von EGFP im Larvenmedium ergänzend analysieren. Dieser könnte einen weiteren Anhaltspunkt für einen GFB-Defekt und eine resultierende Proteinurie liefern. Eine Möglichkeit zur Überprüfung der beschriebenen Phänotypen wäre die Durchführung von Funktionsverluststudien unter Verwendung von Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden. Um den Phänotyp zu validieren, könnten Rescue-Versuche durchgeführt werden. Ist der Proteinurie-Phänotyp nach Knockdown des Kandidatengens durch Co-Injektion der entsprechenden mRNA reversibel, spricht dies für dessen Spezifität. Um synergistische Auswirkungen der Kandidatengene auf die GFB-Funktion zu dokumentieren, wäre zudem der simultane, CRISPR/Cas9-vermittelte Knockdown mehrerer Kandidatengene beim Zebrafisch von Interesse. Auch hierfür wäre die Verwendung der transgenen Linien *Tg(wt1b:EGFP)* und *Tg(fabp10a:gc-EGFP)* interessant. Weiterhin müssen zusätzliche Studien darüber Aufschluss geben, ob sich die gewonnenen Erkenntnisse auf Säugetiermodelle und auch auf den Humanpatienten übertragen lassen. Im Rahmen einer umfangreichen Charakterisierung von *Tmem63c* wurden viele der genannten Untersuchungen bereits erfolgreich durchgeführt [43]. Auf die methodische Erfahrung kann bei der weiteren Charakterisierung von *Pomt2* und *Noxred1* zurückgegriffen werden. Neben *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* beinhaltet der zuvor auf RNO6 lokalisierte QTL weitere Kandidatengene, die hinsichtlich einer potenziellen Albuminurie-Entwicklung ebenso entsprechend charakterisiert werden könnten.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Relevanz von *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* für die Ausbildung einer spontanen Albuminurie. Diese ist ein klinisch etablierter Nierenfunktionsparameter und wird zur Diagnostik und Stadieneinteilung der epidemiologisch hochrelevanten CKD verwendet [1, 11, 12]. Darüber hinaus konnte eine erhöhte  $U_{\text{Aib}}$  mit einem höheren renalen und kardiovaskulären Risiko assoziiert werden [12, 19, 21, 22, 23]. Der typische Krankheitsverlauf der CKD stellt Patienten, Behandler und Wissenschaftler bis heute vor zahlreiche Herausforderungen. Eine Diagnosestellung im Frühstadium wird durch die gering ausgeprägte Symptomatik erschwert. Im weit fortgeschrittenen Stadium verbleibt als therapeutische Möglichkeit nur die Nierenersatztherapie durch Dialyse oder Transplantation. Zahlreiche Komplikationen erhöhen das Risiko für Patienten [1]. Neue Ansatzpunkte zur spezifischen Diagnostik und Therapie sind daher nötig, um zukünftig die Prognose der CKD zu verbessern. So könnte die Identifikation neuer Parameter die Frühdiagnostik erleichtern oder eine gezielte Pharmakotherapie der Albuminurie einer Nierenschädigung im Rahmen der CKD entgegenwirken. Der intrinsisch nephrotoxische Effekt von Albumin wurde bereits dokumentiert [20]. Der kardioprotektive Effekt einer medikamentösen Senkung der Albuminurie konnte ebenfalls gezeigt werden [22, 27, 28]. Mit Hilfe neuer therapeutischer Ansätze könnte somit das renale und das kardiovaskuläre Risiko vermindert werden. Neben der medikamentösen Therapie eröffnet der wissenschaftliche Fortschritt im Bereich Gentherapie weitere Möglichkeiten [123]. Voraussetzung für die Identifikation neuer diagnostischer und therapeutischer Targets für Albuminurie ist die detaillierte Kenntnis der ursächlichen Pathomechanismen auf molekularer Ebene. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte funktionelle Genanalyse schafft hierfür eine mögliche Grundlage und bestätigt die Albuminurie-Kandidatengene *Tmem63c*, *Pomt2* und *Noxred1* als interessante Targets für die weitere translationale Forschung.



## 5 Literaturverzeichnis

1 Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, Moe SM, Shroff R, Tonelli MA, Toussaint ND, Vervloet MG, Leonard MB. Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder: Synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2017 Clinical Practice Guideline Update. *Ann Intern Med.* 2018.

2 Tojo A, Kinugasa S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol.* 2012;2012:481520.

3 Jha V, Garcia-garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* 2013;382(9888):260-72.

4 Anderson S, Halter JB, Hazzard WR, Himmelfarb J, Horne FM, Kaysen GA, Kusek JW, Nayfield SG, Schmader K, Tian Y, Ashworth JR, Clayton CP, Parker RP, Tarver ED, Woolard NF, High KP; workshop participants. Prediction, progression, and outcomes of chronic kidney disease in older adults. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1199-209.

5 Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, Levin A. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet.* 2013;382(9887):158-69.

6 Hamer RA, El Nahas AM. The burden of chronic kidney disease. *BMJ.* 2006;332(7541):563-4.

7 Brück K, Stel VS, Gambaro G, Hallan S, Völzke H, Ärnlöv J, Kastarinen M, Guessous I, Vinhas J, Stengel B, Brenner H, Chudek J, Romundstad S, Tomson C, Gonzalez AO, Bello AK, Ferrieres J, Palmieri L, Browne G, Capuano V, Van Biesen W, Zoccali C, Gansevoort R, Navis G, Rothenbacher D, Ferraro PM, Nitsch D, Wanner C, Jager KJ; European CKD Burden Consortium. CKD Prevalence Varies across the European General Population. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):2135-47.

8 Volzke H, Alte D, Schmidt CO, Radke D, Lorbeer R, Friedrich N, Aumann N, Lau K, Piontek M, Born G, Havemann C, Ittermann T, Schipf S, Haring R, Baumeister SE, Wallaschofski H, Nauck M, Frick S, Arnold A, Junger M, Mayerle J, Kraft M, Lerch MM, Dorr M, Reffelmann T, Empen K, Felix SB, Obst A, Koch B, Glaser S, Ewert R, Fietze I, Penzel T, Doren M, Rathmann W, Haerting J, Hannemann M, Ropcke J, Schminke U, Jurgens C, Tost F, Rettig R, Kors JA, Ungerer S, Hegenscheid K, Kuhn JP, Kuhn J, Hosten N, Puls R, Henke J, Gloger O, Teumer A, Homuth G, Volker U, Schwahn C, Holtfreter B, Polzer I, Kohlmann T, Grabe HJ, Roszkopf D, Kroemer HK, Kocher T, Biffar R, John U, Hoffmann W: Cohort Profile: The Study of Health in Pomerania. *Int J Epidemiol* 2011;40:294-307.

9 Ishani A, Grandits GA, Grimm RH, Svendsen KH, Collins AJ, Prineas RJ, Neaton JD. Association of single measurements of dipstick proteinuria, estimated

glomerular filtration rate, and hematocrit with 25-year incidence of end-stage renal disease in the multiple risk factor intervention trial. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(5):1444-52.

10 Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet.* 2012;379(9811):165-80.

11 Johnson DW, Jones GR, Mathew TH. Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. *Med J Aust.* 2012;197(4):224-5.

12 Gansevoort RT, De jong PE. The case for using albuminuria in staging chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(3):465-8.

13 Gekle M. Renal Proximal Tubular Albumin Reabsorption: Daily Prevention of Albuminuria. *News Physiol Sci.* 1998;13:5-11.

14 Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev.* 2008;88(2):451-87.

15 Scott RP, Quaggin SE. Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol.* 2015;209(2):199-210.

16 Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(11):2440-5.

17 Satchell SC, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(5):F947-56.

18 Jeansson M, Haraldsson B. Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(1):F1111-6.

19 Hallan SI, Ritz E, Lydersen S, Romundstad S, Kvenild K, Orth SR. Combining GFR and albuminuria to classify CKD improves prediction of ESRD. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(5):1069-77.

20 Erkan E, De leon M, Devarajan P. Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK(1) cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(6):F1107-14.

21 Brantsma AH, Bakker SJ, Hillege HL, de Zeeuw D, de Jong PE, Gansevoort RT; PREVEND Study Group. Urinary albumin excretion and its relation with C-reactive protein and the metabolic syndrome in the prediction of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28(10):2525-30.

22 De zeeuw D, Parving HH, Henning RH. Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(8):2100-5.

- 23 Freedman BI, Langefeld CD, Lohman KK, Bowden DW, Carr JJ, Rich SS, Wagenknecht LE. Relationship between albuminuria and cardiovascular disease in Type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(7):2156-61.
- 24 Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA. Microalbuminuria as predictor of vascular disease in non-diabetic subjects. Islington Diabetes Survey. *Lancet.* 1988;2(8610):530-3.
- 25 Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE; Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation.* 2002;106(14):1777-82.
- 26 Hillege HL, Janssen WM, Bak AA, Diercks GF, Grobbee DE, Crijns HJ, Van Gilst WH, De Zeeuw D, De Jong PE; Prevend Study Group. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med.* 2001;249(6):519-26.
- 27 Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wan Y. Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension.* 2005;45(2):198-202.
- 28 Asselbergs FW, Diercks GF, Hillege HL, van Boven AJ, Janssen WM, Voors AA, de Zeeuw D, de Jong PE, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH. Effects of fosinopril and pravastatin on cardiovascular events in subjects with microalbuminuria. *Circulation.* 2004;110(18):2809-16.
- 29 Jang YY, Cai L, Ye Z. Genome editing systems in novel therapies. *Discov Med.* 2016;21(113):57-64.
- 30 Doris PA. Genetic susceptibility to hypertensive renal disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69(22):3751-63.
- 31 Forsblom CM, Kanninen T, Lehtovirta M, Saloranta C, Groop LC. Heritability of albumin excretion rate in families of patients with Type II diabetes. *Diabetologia.* 1999;42(11):1359-66.
- 32 Fox CS, Yang Q, Guo CY, Cupples LA, Wilson PW, Levy D, Meigs JB. Genome-wide linkage analysis to urinary microalbuminuria in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Kidney Int.* 2005;67(1):70-4.
- 33 Krolewski AS, Poznik GD, Placha G, Canani L, Dunn J, Walker W, Smiles A, Krolewski B, Fogarty DG, Moczulski D, Araki S, Makita Y, Ng DP, Rogus J, Duggirala R, Rich SS, Warram JH. A genome-wide linkage scan for genes controlling variation in urinary albumin excretion in type II diabetes. *Kidney Int.* 2006;69(1):129-36.

- 34 Kreutz R, Hübner N. Congenic rat strains are important tools for the genetic dissection of essential hypertension. *Semin Nephrol.* 2002;22(2):135-47.
- 35 Ganten D, Jong WD. *Experimental and Genetic Models of Hypertension.* Elsevier Science Health Science Division; 1994.
- 36 Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R. A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3081-9.
- 37 Hackbarth H, Gartner K, Alt JM, Stolte H: A subline of the Munich Wistar (MW) strain: Response to selection for surface glomeruli. *Rat News Lett* 7:1378–1384,1980
- 38 Kreutz R, Kovacevic L, Schulz A, Rothermund L, Ketteler M, Paul M. Effect of high NaCl diet on spontaneous hypertension in a genetic rat model with reduced nephron number. *J Hypertens.* 2000;18(6):777-82.
- 39 Hackbarth H, Gwinner W, Alt JM, Hagemann I, Thiemann A, Finke B. The Munich Wistar Frömter rat: proteinuria and blood pressure in correlation to the number of superficial glomeruli. *Ren Physiol Biochem.* 1991;14(6):246-52.
- 40 Schulz A, Schlesener M, Weiss J, Hansch J, Wendt N, Kossmehl P, Grimm D, Vetter R and Kreutz R: Protective Effect of Female Gender on the Development of Albuminuria in a Polygenetic Rat Model Is Enhanced Further by Replacement of a Major Autosomal QTL. *Clin Sci (Lond).* 2008;114:305-311.
- 41 Neugarten J, Golestaneh L. Gender and the prevalence and progression of renal disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2013;20(5):390-5.
- 42 Schulz A, Weiss J, Schlesener M, Hänsch J, Wehland M, Wendt N, Kossmehl P, Sietmann A, Grimm D, Stoll M, Nyengaard JR, Kreutz R. Development of overt proteinuria in the Munich Wistar Frömter rat is suppressed by replacement of chromosome 6 in a consomic rat strain. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(1):113-21.
- 43 Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links Tmem63c to kidney damage. *eLife.* 2019;8:e42068.
- 44 Rat Genome Sequencing Consortium. *Rattus norvegicus (Rnor\_6.0).* INSDC Assembly GCA\_000001895.4, Jul 2014. (Accessed 2015/07/01, at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001895.5](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001895.5)).
- 45 Genome Reference Consortium. *Zebrafish Build 10 (GRCz10).* INSDC Assembly GCA\_000002035.3, Sep 2014. (Accessed 2015/07/01, at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000002035.5](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000002035.5)).

- 46 Streisinger G, Walker C, Dower N, Knauber D, Singer F. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*. 1981;291(5813):293-6.
- 47 Postlethwait JH, Johnson SL, Midson CN, Talbot WS, Gates M, Ballinger EW, Africa D, Andrews R, Carl T, Eisen JS. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*. 1994;264(5159):699-703.
- 48 Haffter P, Nüsslein-volhard C. Large scale genetics in a small vertebrate, the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 1996;40(1):221-7.
- 49 Mullins MC, Hammerschmidt M, Haffter P, Nüsslein-volhard C. Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate. *Curr Biol*. 1994;4(3):189-202.
- 50 Driever W, Solnica-krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkuis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development*. 1996;123:37-46.
- 51 Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn*. 1995;203(3):253-310.
- 52 Drummond IA. Kidney development and disease in the zebrafish. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(2):299-304.
- 53 Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthravadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C,

Hubbard TJ, Roest Crollius H, Rogers J, Stemple DL. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498-503.

54 Goldman IL, Kadulin SG, Razin SV. Transgenic animals in medicine: integration and expression of foreign genes, theoretical and applied aspects. *Med Sci Monit*. 2004;10(11):RA274-85.

55 Stuart GW, McMurray JV, Westerfield M. Replication, integration and stable germ-line transmission of foreign sequences injected into early zebrafish embryos. *Development*. 1988;103(2):403-12.

56 Bollig F, Perner B, Besenbeck B, Köthe S, Ebert C, Taudien S, Englert C. A highly conserved retinoic acid responsive element controls wt1a expression in the zebrafish pronephros. *Development*. 2009;136(17):2883-92.

57 Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T, Smith SF, North P, Callaway H, Kelly K, Walter K, Abnizova I, Gilks W, Edwards YJ, Cooke JE, Elgar G. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol*. 2005;3(1):e7.

58 Cheng CL, Huang SJ, Wu CL, Gong HY, Ken CF, Hu SY, Wu JL. Transgenic expression of omega-3 PUFA synthesis genes improves zebrafish survival during *Vibrio vulnificus* infection. *J Biomed Sci*. 2015;22:103

59 Li L, Bonneton F, Tohme M, Bernard L, Chen XY, Laudet V. In Vivo Screening Using Transgenic Zebrafish Embryos Reveals New Effects of HDAC Inhibitors Trichostatin A and Valproic Acid on Organogenesis. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0149497.

60 Sood R, Carrington B, Bishop K, Jones M, Rissone A, Candotti F, Chandrasekharappa SC, Liu P. Efficient methods for targeted mutagenesis in zebrafish using zinc-finger nucleases: data from targeting of nine genes using CompoZr or CoDA ZFNs. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57239.

61 Zu Y, Tong X, Wang Z, Liu D, Pan R, Li Z, Hu Y, Luo Z, Huang P, Wu Q, Zhu Z, Zhang B, Lin S. TALEN-mediated precise genome modification by homologous recombination in zebrafish. *Nat Methods*. 2013;10(4):329-31.

62 Hwang WY, Fu Y, Reyon D, Maeder ML, Tsai SQ, Sander JD, Peterson RT, Yeh JRJ, Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol*. 2013;31(3):227-9.

63 Seth A, Stemple DL, Barroso I. The emerging use of zebrafish to model metabolic disease. *Dis Model Mech*. 2013;6(5):1080-8.

64 Faa G, Gerosa C, Fanni D, Monga G, Zaffanello M, Van Eyken P, Fanos V. Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. *J Cell Physiol*. 2012;227(3):1257-68.

- 65 Gerlach GF, Wingert RA. Kidney organogenesis in the zebrafish: insights into vertebrate nephrogenesis and regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(5):559-85.
- 66 Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:509-29.
- 67 Reidy KJ, Rosenblum ND. Cell and molecular biology of kidney development. *Semin Nephrol.* 2009;29(4):321-37.
- 68 Drummond IA, Majumdar A, Hentschel H, Elger M, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Stemple DL, Zwartkuis F, Rangini Z, Driever W, Fishman MC. Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development.* 1998;125(23):4655-67.
- 69 Chandrasegaran S, Carroll D. Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *J Mol Biol.* 2016;428(5 Pt B):963-8.
- 70 Roth DB, Wilson JH. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol.* 1986;6(12):4295-304.
- 71 Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21(2):121-31.
- 72 Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol Cell Biol.* 1994;14(12):8096-106.
- 73 Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(3):1156-60.
- 74 Boch J, Scholze H, Schornack S, Landgraf A, Hahn S, Kay S, Lahaye T, Nickstadt A, Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science.* 2009;326(5959):1509-12.
- 75 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337(6096):816-21.
- 76 Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33.
- 77 Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565-75.

- 78 Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2005;151(Pt 8):2551-61.
- 79 Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-12.
- 80 Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Haft DH, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Terns RM, Terns MP, White MF, Yakunin AF, Garrett RA, van der Oost J, Backofen R, Koonin EV. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722-36.
- 81 Ratner HK, Sampson TR, Weiss DS. Overview of CRISPR-Cas9 Biology. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(12):pdb.top088849.
- 82 Briner AE, Barrangou R. Guide RNAs: A Glimpse at the Sequences that Drive CRISPR-Cas Systems. *Cold Spring Harb Protoc*. 2016;2016(7):pdb.top090902.
- 83 Nuñez JK, Lee AS, Engelman A, Doudna JA. Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature*. 2015;519(7542):193-8.
- 84 Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. *Biochimie*. 2015;117:119-28.
- 85 Jinek M, Jiang F, Taylor DW, Sternberg SH, Kaya E, Ma E, Anders C, Hauer M, Zhou K, Lin S, Kaplan M, Iavarone AT, Charpentier E, Nogales E, Doudna JA. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*. 2014;343(6176):1247997.
- 86 Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife*. 2013;2:e00471.
- 87 Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013;153(4):910-8.
- 88 Zhou W, Hildebrandt F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(6):1039-47.
- 89 Cunliffe V. *Zebrafish: A Practical Approach*. Edited by Nüsslein-Volhard and R. Dahm. Oxford University Press. 2002.
- 90 Westerfield, M. *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.
- 91 Swinarski M. PCP-driven cardiac remodeling couples changes in actomyosin tension with myocyte differentiation. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. 2017. <https://doi.org/10.18452/17775>.



- 92 Gagnon JA, Valen E, Thyme SB, Huang P, Akhmetova L, Pauli A, Montague TG, Zimmerman S, Richter C, Schier AF. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e98186.
- 93 Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W272-6.
- 94 Bassett AR, Tibbit C, Ponting CP, Liu JL. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system. *Cell Rep*. 2013;4(1):220-8.
- 95 Burger A, Lindsay H, Felker A, Hess C, Anders C, Chiavacci E, Zaugg J, Weber LM, Catena R, Jinek M, Robinson MD, Mosimann C. Maximizing mutagenesis with solubilized CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Development*. 2016;143(11):2025-37.
- 96 Meeker N, Hutchinson S, Ho L, Trede N. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. *BioTechniques*. 2007;43(5), pp.610-614.
- 97 American Veterinary Medical Association [Internet] 2013. AVMA guidelines on euthanasia, 2013 Edition. (Accessed December 2, 2016, at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>)
- 98 Wrzesiński T, Szeląg M, Cieślowski WA, Ida A, Giles R, Zdro E, Szumska J, Poźniak J, Kwias Z, Bluysen HA, Wesoly J. Expression of pre-selected TMEMs with predicted ER localization as potential classifiers of ccRCC tumors. *BMC Cancer*. 2015;15:518.
- 99 Zhao X, Yan X, Liu Y, Zhang P, Ni X. Co-expression of mouse TMEM63A, TMEM63B and TMEM63C confers hyperosmolarity activated ion currents in HEK293 cells. *Cell Biochem Funct*. 2016;34(4):238-41.
- 100 Messina S, Mora M, Pegoraro E, Pini A, Mongini T, D'Amico A, Pane M, Aiello C, Bruno C, Biancheri R, Berardinelli A, Boito C, Farina L, Morandi L, Moroni I, Pezzani R, Pichiecchio A, Ricci E, Ruggieri A, Saredi S, Scuderi C, Tessa A, Toscano A, Tortorella G, Trevisan CP, Uggetti C, Santorelli FM, Bertini E, Mercuri E. POMT1 and POMT2 mutations in CMD patients: a multicentric Italian study. *Neuromuscul Disord*. 2008;18(7):565-71.
- 101 Avsar-ban E, Ishikawa H, Many H, Watanabe M, Akiyama S, Miyake H, Endo T, Tamaru Y. Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology*. 2010;20(9):1089-102.
- 102 Yates A, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Billis K, Carvalho-Silva D, Cummins C, Clapham P, Fitzgerald S, Gil L, Girón CG, Gordon L, Hourlier T, Hunt SE, Janacek SH, Johnson N, Juettemann T, Keenan S, Lavidas I, Martin FJ, Maurel T, McLaren W, Murphy DN, Nag R, Nuhn M, Parker A, Patricio M, Pignatelli M, Rahtz M, Riat HS, Sheppard D, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Wilder SP, Zadissa A, Birney E,

Harrow J, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Spudich G, Trevanion SJ, Cunningham F, Aken BL, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D710-6.

103 Zeng T, Zhu L, Liao M, Zhuo W, Yang S, Wu W, Wang D. Knockdown of PYCR1 inhibits cell proliferation and colony formation via cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer. *Med Oncol.* 2017;34(2):27.

104 Genome Reference Consortium. Human Build 38 (GRCh38.p3). INSDC Assembly GCA\_000001405.25, Dec 2013. Accessed 2015/07/01, at: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001405.29](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.29).

105 Drummond IA, Davidson AJ. Zebrafish kidney development. *Methods Cell Biol.* 2010;100:233-60.

106 Kalluri R. Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(9):2383-9.

107 Guan N, Ding J, Zhang J, Yang J. Expression of nephrin, podocin, alpha-actinin, and WT1 in children with nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2003;18(11):1122-7.

108 Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, Jaenisch R. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74(4):679-91.

109 Perner B, Englert C, Bollig F. The Wilms tumor genes wt1a and wt1b control different steps during formation of the zebrafish pronephros. *Dev Biol.* 2007;309(1):87-96.

110 Huang L, Xiao A, Wecker A, McBride DA, Choi SY, Zhou W, Lipschutz JH. A possible zebrafish model of polycystic kidney disease: knockdown of wnt5a causes cysts in zebrafish kidneys. *J Vis Exp.* 2014;(94).

111 Jao LE, Wente SR, Chen W. Efficient multiplex biallelic zebrafish genome editing using a CRISPR nuclease system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013;110(34):13904-9.

112 Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol.* 2013;31(9):827-32.

113 Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 2014;24(1):132-41.

114 Zhou J, Wang J, Shen B, Chen L, Su Y, Yang J, Zhang W, Tian X, Huang X. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9-mediated mouse genome targeting. *FEBS J.* 2014;281(7):1717.

- 115 Murthy SE, Dubin AE, Whitwam T, Jojoa-Cruz S, Cahalan SM, Mousavi SAR, Ward AB, Patapoutian A. OSCA/TMEM63 are an Evolutionarily Conserved Family of Mechanically Activated Ion Channels. *Elife*. 2018;7
- 116 Schulz A, Kreutz R. Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res*. 2012;35(7):675-94.
- 117 D'agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(25):2398-411.
- 118 Hanke N, Staggs L, Schroder P, Litteral J, Fleig S, Kaufeld J, Pauli C, Haller H, Schiffer M. "Zebrafishing" for novel genes relevant to the glomerular filtration barrier. *Biomed Res Int*. 2013;2013:658270.
- 119 Westhoff JH, Giselbrecht S, Schmidts M, Schindler S, Beales PL, Tönshoff B, Liebel U, Gehrig J. Development of an automated imaging pipeline for the analysis of the zebrafish larval kidney. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e82137.
- 120 Rivera MN, Haber DA. Wilms' tumour: connecting tumorigenesis and organ development in the kidney. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):699-712.
- 121 Bollig F, Mehringer R, Perner B, Hartung C, Schäfer M, Scharl M, Volff JN, Winkler C, Englert C. Identification and comparative expression analysis of a second *wt1* gene in zebrafish. *Dev Dyn*. 2006;235(2):554-61.
- 122 Kramer-Zucker AG, Wiessner S, Jensen AM, Drummond IA. Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephtrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. *Dev Biol*. 2005;285(2):316-29.
- 123 Blau HM, Springer ML. Gene therapy-a novel form of drug delivery. *N Engl J Med*. 1995;333(18):1204-7.

# Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Theodor Lorenzen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Funktionelle Genanalyse ausgewählter Albuminurie-Kandidatengene im Zebrafischmodell (Functional analysis of selected candidate genes for albuminuria in the zebrafish model)* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Theodor Lorenzen hatte folgenden Anteil an untenstehender Publikation:

Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage. eLife. 2019;8:e42068.

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit an der methodischen Konzeptionierung und detaillierten Ausarbeitung eines strukturierten Assays für Gen-Knockdown-induzierte Schäden der glomerulären Filtrationsbarriere beim Zebrafisch. Hierzu gehörten Haltung und Zucht transgener Zebrafische der Linie *Tg(fabp10a:gc-EGFP)*, Design und Synthese der sgRNA, Mikroinjektion bei Zebrafischembryonen im Einzellstadium, Genotypisierung und phänotypische Untersuchungen mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops 120 Stunden nach der Befruchtung.

---

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers  
Prof. Dr. Reinhold Kreutz

---

Unterschrift des Doktoranden  
Theodor Lorenzen

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## Publikationsliste

Lorenzen T, Bschor T. Therapie der Depression — vom Gestern zum Morgen. DNP. 2019;20, 66-74.

Schulz A, Müller NV, van de Lest NA, Eisenreich A, Schmidbauer M, Barysenka A, Purfürst B, Sporbert A, Lorenzen T, Meyer AM, Herlan L, Witten A, Rühle F, Zhou W, de Heer E, Scharpfenecker M, Panáková D, Stoll M, Kreutz R. Analysis of the genomic architecture of a complex trait locus in hypertensive rat models links *Tmem63c* to kidney damage. eLife. 2019;8:e42068.

Kreutz R, Schulz A, Meyer AM, Lorenzen T, Stoll M, Panáková D. Functional analysis of *tmem63c* in zebrafish reveals its role as a novel candidate for albuminuria and chronic kidney disease. Journal of hypertension. 2016; 34 Suppl 2 - ESH 2016 Abstract Book:e51.

# Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz für die Möglichkeit, am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin meine Promotion durchzuführen und für die engmaschige, zielführende Betreuung.

Außerdem möchte ich mich Frau Dr. Daniela Panáková für die umfangreiche Unterstützung während meiner Tätigkeit am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin und darüber hinaus bedanken.

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Dr. Angela Schulz für die sehr intensive Betreuung und Unterstützung in allen Belangen.

Darüber hinaus danke ich Herrn Alexander Meyer für die geduldige Einarbeitung am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin und für seine Hilfsbereitschaft während meiner Tätigkeit im Labor.

Auch möchte ich den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Prof. Kreutz und Dr. Panáková, insbesondere Frau Dr. Anne Merks, Claudia Plum und Heike Negatu danken. Sie haben mich herzlich aufgenommen und standen mir bei kleinen und großen Herausforderungen zur Seite.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meiner Freundin Violeta, die mir durch ihre Unterstützung in jeder Hinsicht alles ermöglichten und mir besonders in arbeitsintensiven und belastenden Zeiten Rückhalt gaben.