

Transkriptionsregulation der Matrixmetalloproteinase MT1-MMP
und genetische Varianten bei entzündlichen Nierenerkrankungen
des Menschen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

im Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Astrid Munkert
aus Nürnberg

Hamburg 2007

Meiner Mutter

Diese Arbeit wurde durch ein Promotions Stipendium
der Werner-Otto-Stiftung unterstützt.

A - Inhaltsverzeichnis

A - INHALTSVERZEICHNIS.....	3
B - ABKÜRZUNGEN.....	5
C - ZUSAMMENFASSUNG	7
D - EINLEITUNG	8
D.1. Die Niere.....	8
D.2. Entzündliche Nierenerkrankungen (Glomerulonephritiden).....	9
D.2.1 Die Minimal-Change-Glomerulonephritis	10
D.2.2 Die fokal-segmentale Glomerulosklerose.....	10
D.3. Nichtcodierende DNA, Transkriptionsfaktoren und SNPs	11
D.4. Die Enzymfamilie der Matrixmetalloproteinasen	13
D.5. Die Matrixmetalloproteinase MT1-MMP.....	14
D.5.1 Regulation der MT1-MMP Genexpression	15
E - MATERIAL UND METHODEN.....	16
E.1. Material	16
E.1.1 Mikroorganismen und Zelllinien.....	16
E.1.1.1 <i>E. coli</i>	16
E.1.1.2 Eukaryotische Zelllinien.....	16
E.1.2 DNA.....	16
E.1.2.1 Plasmide und Vektoren.....	16
E.1.2.2 Oligonukleotide.....	17
E.1.2.2.1 PCR Primer zur Generierung von Luciferase Konstrukten.....	17
E.1.2.2.2 EMSA Sonden.....	18
E.1.2.2.3 Mutagenese Primer.....	19
E.1.2.2.4 Allgemeine PCR Primer.....	19
E.1.3 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial	20
E.1.4 Geräte	23
E.1.5 <i>In silico</i>	24
E.1.5.1 Software	24
E.1.5.2 Internetdienste	24
E.2. Methoden	26
E.2.1 Kultivierung von Zelllinien.....	26
E.2.2 Proteinextraktionen.....	26
E.2.2.1 Proteinextraktion aus Gesamtzelllysat.....	26
E.2.2.2 Kernproteinextraktion nach Dignam	26

E.2.2.3 Kernproteinextraktion nach Crabtree	28
E.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	29
E.2.4 Herstellung von DNA Konstrukten in <i>E.coli</i>	29
E.2.4.1 Luciferase Reportergenkonstrukte	29
E.2.4.1.1 Klonierung in pGEM-T Easy Vektor	29
E.2.4.1.2 Klonierung in pGL3 Basic Vektor	30
E.2.4.1.3 Gerichteter Basenaustausch (Mutationskonstrukte)	31
E.2.4.2 Haplotypen Klonierung in pGEM-T Easy Vektor	31
E.2.5 Hitzetransformation von <i>E.coli</i>	31
E.2.6 Dotblot	32
E.2.7 Transfektion eukaryotischer Zellen	33
E.2.8 Luciferase und β -Galaktosidase Assay	33
E.2.9 DNA Präparationen	34
E.2.9.1 Plasmid Präparationen	34
E.2.9.2 Präparation von humaner, genomischer DNA	34
E.2.9.2.1 DNA Präparation aus Biopsien	34
E.2.9.2.2 DNA Präparation aus Blut	35
E.2.10 DNA Sequenzierung	35
E.2.10.1 DNA Sequenzierung einzelner Proben	35
E.2.10.2 DNA Sequenzierung im Hochdurchsatz	36
E.2.11 Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA)	36
E.2.12 Supershift EMSA	37
E.2.13 Statistik	38
E.2.13.1 Luciferase Assays	38
E.2.13.2 DNA-Screening	38
E.2.13.2.1 Berechnung der Macht des Screenings (Poweranalyse)	38
E.2.13.2.2 Berechnung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium	39
F - ERGEBNISSE	40
F.1. Identifizierung von cis-regulatorischen Elementen und funktionellen SNPs im MT1-MMP Promotor des Menschen	40
F.1.1 Datenbank Screening für SNPs und Transkriptionsfaktor Bindungsstellen	40
F.1.2 Charakterisierung der Transkriptionsregulation des MT1-MMP Gens mittels Luciferase Assay	41
F.1.3 Einfluss der SNPs -378 T/C und -364 G/T auf die Transkriptionsregulation	42
F.1.4 EMSA der Bindungsstellen RR1 und Sp1	45
F.1.5 Nachweis von spezifischen Bindungsproteinen an die RR1	47
F.2. DNA Screening von Patienten mit Minimal-Change-Glomerulonephritis und fokal-segmentaler Glomerulosklerose	50
F.2.1 Design des Patientenscreenings	50
F.2.2 Genotypen- und Allelfrequenz der SNPs -378 T/C und -364 G/T und Hardy-Weinberg Verteilung	52
F.2.3 Diplotypen Verteilung bei MCGN und FSGS Patienten	54
G - DISKUSSION	57
H - LITERATURVERZEICHNIS	65
I - ANHANG	73
J - DANK	74

B - Abkürzungen

'	Minuten
''	Sekunden
Aqua dest	Bidestilliertes Wasser
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BS	Blutspender
dIdC	Desoxyinosidphosphat-Desoxycytidinphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dNTPs	Desoxynukleotide
EDTA	Ethylendiamin- N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	<u>E</u> thylenglycol-bis(beta-aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMSA	Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FSGS	Fokal-segmentale Glomerulosklerose
FSSGN	Fokal-segmental sklerosierende Glomerulonephritis
g	Erdbeschleunigung
GN	Glomerulonephritis
h	Stunde(n)
Ig	Immunglobulin
LB _{Amp}	Luria-Broth Medium incl. 100µg/ml Ampicillin
M	Molar
M1	Mutante 1 oder Zellkulturmedium ohne FCS
M2	Mutante 2 oder Zellkulturmedium mit 10% FCS
M3	Mutante 3
MCGN	Minimal-Change-Glomerulonephritis
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MZ	Mesangiumzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁺	D-PBS mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ Ionen
PBS w/o	D-PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ Ionen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-acetat
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RR1	Regulatorische Region 1
RT	Raumtemperatur

rpm	Umdrehungen pro Minute
s	second
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
T	Thymin
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trizma Base, 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol
U	Unit(s)
UV	ultraviolett
üN	über Nacht
V	Volt
VT	Volumenteil
v/v	Volumen pro Volumen (Konzentrationsangabe)
Wt	Wildtyp

C - Zusammenfassung

Die Matrixmetalloproteinase MT1-MMP spielt in verschiedenen Tiermodellen entzündlicher Nierenerkrankungen für die Krankheitsentstehung und deren Verlauf eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation dieses Enzyms und deren Bedeutung für Glomerulonephritiden beim Menschen untersucht.

Die transkriptionelle Regulation der MT1-MMP wird in renalen Mesangiumzellen von zwei synergistisch wirkenden Enhancern gesteuert, einer Sp1 Bindungsstelle und einer Regulatorischen Region 1 (RR1). Letztere enthält eine Ets Bindungsstelle, welche die Transkriptionsfaktoren Elf-1 und E1AF/PEA3 bindet. In der 5' Regulationsregion konnten zwei funktionelle SNPs, -378 T/C und -364 G/T, in enger Nachbarschaft zur RR1 identifiziert werden. Das Vorliegen von SNP -378 C führt zu einer starken Verminderung der Bindung nukleärer Proteine an die RR1 und damit auch zu einer Reduktion der Enhancerfunktion. Für die entzündlichen Nierenerkrankungen Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) und fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS) konnte eine Risikoreduktion nur für das Auftreten einer FSGS nachgewiesen werden, wenn mindestens in einer Kopie der 5' regulatorischen Region des MT1-MMP Gens eine der beiden SNP Mutanten vorliegt. Eine Analyse der SNPs könnte somit zukünftig in der klinischen Diagnostik der FSGS von Bedeutung sein.

D - Einleitung

D.1. Die Niere

Die Niere ist ein komplexes Organ, welches im menschlichen Organismus für die Entsorgung von Stoffwechsel Endprodukten und verschiedene endokrine Funktionen zuständig ist. Sie reguliert die Zusammensetzung des Harns, den Wasser-, Elektrolyt-, und Säure-Basen-Haushalt, die Mineralisierung der Knochen, den Blutdruck und die Blutbildung. Das zentrale Bauelement der Niere ist das Nephron, dessen Filtrations-einheit der Glomerulus ist. Die Filtration des Blutes erfolgt durch das gefensterte Epithel der Kapillaren, die glomeruläre Basalmembran und die darauf sitzenden hoch spezialisierten Epithelzellen, die sogenannten Podozyten (Abbildung 1). Podozyten bilden eng ineinander greifende Fußfortsätze aus, an deren Grenzflächen

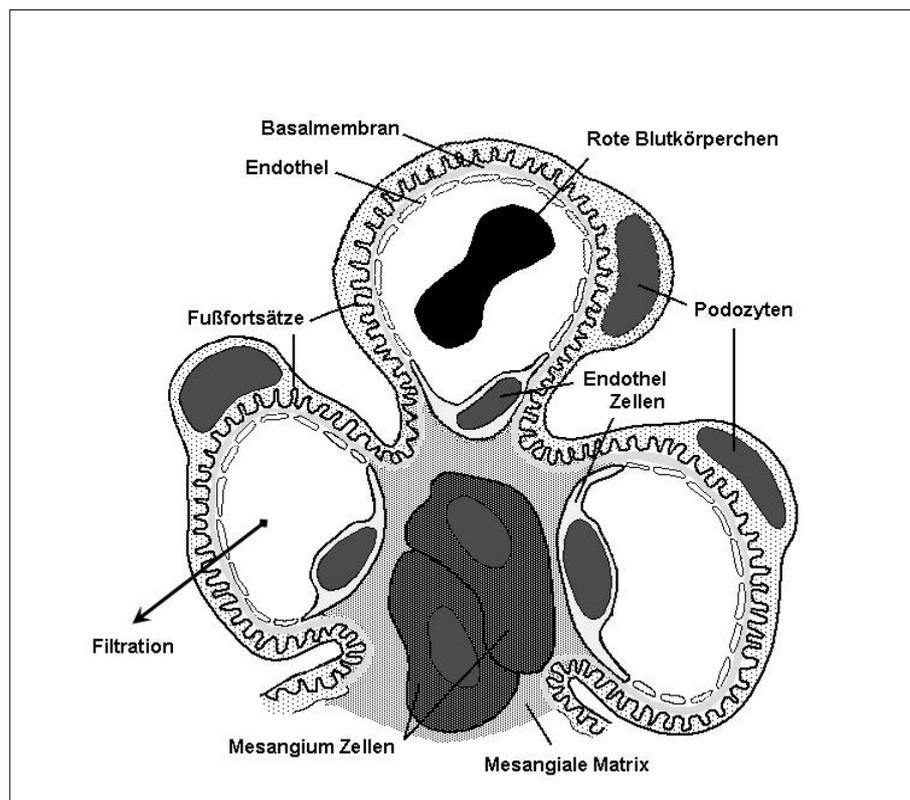


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Elektronenmikroskopie eines Glomerulus';
Bildquelle: University of Florida, Pathologie Website

sogenannte Schlitzmembran liegt. Sie spielt eine zentrale Rolle im Filtrationsprozess. Zwischen den Kapillaren liegt das Mesangium, ein Bereich, welcher als Gerüst für die physiologischen Strukturen des Glomerulus dient. Er setzt sich aus Mesangiumzellen und extrazellulärer, mesangialer Matrix zusammen.

D.2. Entzündliche Nierenerkrankungen (Glomerulonephritiden)

Glomerulonephritiden (GN) sind entzündliche Erkrankungen der Glomeruli. Sie sind durch eine immunpathologische Genese gekennzeichnet, können in allen Glomeruli beider Nieren auftreten oder nur in bestimmten Bereichen. Dementsprechend werden sie als diffus oder fokal bezeichnet. Sind innerhalb eines Glomerulus alle Kapillarschleifen betroffen, spricht man von einem globalen, sind nur einzelne Abschnitte erkrankt von einem segmentalen Erscheinungsbild (Siegenthaler and Blum 2006). Die molekularen Ursachen dieser Gruppe von Erkrankungen sind immer noch weitgehend unverstanden. Zur Einteilung und Unterscheidung der verschiedenen GN Formen werden unter anderem auch Veränderungen der einzelnen funktionellen Bereiche der Niere wie der Glomeruli, der Tubuli und des Interstitiums sowie der Nierengefäße und –kapillaren herangezogen. Je nach Typ der GN können beispielsweise Verlust der Fußfortsätze der Podozyten, Proliferation der Mesangiumzellen oder Akkumulation extrazellulärer Matrix auftreten. Das Ausmaß dieser Veränderungen trägt entscheidend zum weiteren Verlauf der Erkrankungen bei, der im ungünstigen Fall zum kompletten Verlust der Filtrationsfunktion führen kann (Bruijn et al. 1988; Klahr et al. 1988; Floege et al. 1991; Ebihara et al. 1993; Tryggvason 1999). Mitursächlich für die Matrixablagerung ist häufig eine Verschiebung im Gleichgewicht von Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix.

D.2.1 Die Minimal-Change-Glomerulonephritis

Bei der Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) ist als einzige histologische Veränderung der Verlust der podozytären Fußfortsätze charakteristisch. Die Patienten leiden an einer großen Proteinurie, einer pathologischen Ausscheidung von Proteinen im Urin, was klinisch zu ausgeprägten Ödemen führt. Die Erkrankung lässt sich durch eine kurzzeitige Therapie mit Steroiden in den meisten Fällen sehr gut behandeln (Grabensee 2002).

D.2.2 Die fokal-segmentale Glomerulosklerose

Mit fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS) wird eine Form der GN bezeichnet, die lichtmikroskopisch sichtbare Sklerosierungen jeweils nur in Teilen des Glomerulus (segmental) aufweist und zunächst meist nur einen kleinen Prozentsatz aller Glomeruli betrifft (fokal). Elektronenmikroskopisch findet sich auch in Glomeruli mit nicht sklerosierten Kapillarschlingen ein diffuser Verlust der Fußfortsätze der Podozyten. Die Pathogenese ist nicht geklärt, es könnte sich jedoch um einen Übergang von MCGN in eine FSGS handeln, die daher in der Literatur neuerdings auch FSSGN (fokal-segmental sklerosierende GN (Siegenthaler and Blum 2006)) bezeichnet wird, um den noch fortschreitenden Charakter zu betonen. Lässt sich eine bei einem Patienten nierenbiotisch diagnostizierte MCGN mit Steroiden nicht suffizient behandeln, so könnte es sich bei dem Biopsat um einen sogenannten „sampling error“ handeln. In der Regel wird dann eine erneute Nierenbiopsie durchgeführt und gezielt nach lichtmikroskopischen Zeichen einer FSGS gesucht. Bis heute gibt es keine humoralen oder genetischen Marker, welche bei steroidresistentem nephrotischem Syndrom eine Unterscheidung dieser beiden Nierenerkrankungen ermöglichen würden.

D.3. Nichtcodierende DNA, Transkriptionsfaktoren und SNPs

Eukaryotische Genome setzen sich im Gegensatz zu prokaryotischen zu großen Teilen aus nichtcodierenden Basensequenzen zusammen. Eine der Funktionen solcher DNA liegt darin, die Transkription der codierenden DNA zu steuern, die streng reguliert wird. Die Kontrolle der Genexpression findet auf verschiedenen Ebenen statt: bei der Transkription, der Prozessierung der mRNA, über ihren Transport, ihre Lokalisierung und Langlebigkeit sowie bei der Translation. Ist ein Protein gebildet, kann über die Kontrolle seiner Aktivität und Lebensdauer Einfluss auf seine letztendliche Wirkung genommen werden.

Sowohl in der codierenden als auch in der nichtcodierenden DNA treten Punktmutationen mit einer gewissen Häufigkeit in einer Population auf, sogenannte Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Sie kommen im menschlichen Genom durchschnittlich alle 1000 Basenpaare vor (Gura 2001). Für die Analyse der Funktion eines SNPs ist das diploide Genom des Menschen zu berücksichtigen: der Genotyp setzt sich aus zwei Allelen zusammen, das heißt den genetischen Ausprägungen bezüglich einer definierten Base auf beiden homologen Chromosomen. Gemeinsames Auftreten mehrerer SNPs auf einem Chromosom wird als Haplotyp und die genetische Gesamtkonstellation als Diplotyp bezeichnet. Untersuchungen dieser Art führten zur Veröffentlichung der HapMap (The HapMap Consortium 2005; Frazer et al. 2007), einer Kartierung des menschlichen Genoms, welche mehrere Millionen der häufig vorkommenden SNPs im menschlichen Genom darstellt.

Die Mutation einer einzelnen Base kann im codierenden Bereich eines Gens zum Austausch einer Aminosäure führen, was die Wirkungsweise des Proteins verändern kann. Sie kann aber auch die Bildung eines Stop-Codons auslösen, was den kompletten Verlust der Proteinfunktion bedeuten kann. Tritt ein SNP im nichtcodierenden Bereich eines Gens auf, kann er ohne Wirkung bleiben (Bahring et al. 2003) oder er kann die Bindung eines Transkriptionsfaktors (TF) beeinflussen, was

wiederum unterschiedliche Wirkung auf die Transkription des gesamten Gens haben kann. In der 5' Regulationsregion der Matrixmetalloproteinase (MMP) MMP-1 ist beispielsweise ein SNP bei -1607bp bekannt, dessen Variation zur Entstehung einer Ets-1 Bindungsstelle führt (Rutter et al. 1998). Für die Regulation der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP-2) sind zwei SNPs, -1575 A und -1306 T, von Bedeutung, welche die Bindung der Transkriptionsfaktoren Sp1 und Östrogenrezeptor inhibieren und sogar mit verminderter genetischer Fitness verbunden sind (Harendza et al. 2003). Eine Reihe von weiteren funktionellen SNPs in den Regulationsregionen verschiedener MMPs wurden identifiziert und einzeln oder in Kombination mit diversen Krankheiten korreliert (MMP-3, -7, -9, -12, und -13; Zhu et al. 2001; Bauters et al. 2007; Hughes et al. 2007).

Es gibt eine wachsende Anzahl von Arbeiten, welche zeigen, dass genetische Faktoren zur Entstehung und zum Verlauf von chronischen Glomerulonephritiden beitragen (Boute et al. 2000; Gharavi et al. 2000; Hsu et al. 2000; Caridi et al. 2001; Galla 2001; Frishberg et al. 2002; Winn 2002; Eitner and Floege 2003; Kim et al. 2003; Chow et al. 2005; Padiyar and Sedor 2005). Mehr und mehr zeigt sich auch, dass selbst Punktmutationen in der Form von SNPs im nichtcodierenden Bereich von Genen diesbezüglich eine Rolle spielen. Jüngste Arbeiten von Kitamura et al. und Buraczynska et al. beschreiben für den SNP -634 C/G im Interleukin-6 Promotor sowohl eine Rolle bei der Progression der diabetischen Nephropathie als auch für die chronische Glomerulonephritis (Kitamura et al. 2002; Buraczynska et al. 2007). Auch für die IgA Glomerulonephritis konnte zwischen einem Promotor SNP und der Progression der Erkrankung ein Zusammenhang gefunden werden: -159 C im CD14 Gen ist mit einem schnelleren Fortschreiten der GN assoziiert (Yoon et al. 2003).

D.4. Die Enzymfamilie der Matrixmetalloproteinasen

Die Familie der Matrixmetalloproteinasen kann in ihrer Gesamtheit so gut wie alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen und stellt somit die Hauptakteure für deren Umbau (Parks et al. 2004). Im menschlichen Organismus gibt es 24 Enzyme, welche dieser Familie zugeordnet werden. Diese teilen eine gemeinsame Grundstruktur an Untereinheiten und benötigen Zink (Zn^{2+}) als Cofaktor im katalytischen Zentrum. Membranständige Matrixmetalloproteinasen tragen an ihrem C-Terminus eine Transmembran-Domäne, der eine cytosolische Domäne anhängt. Alternativ können sie auch einen Glycosyl-phosphatidyl-inositol Anker (GPI) besitzen.

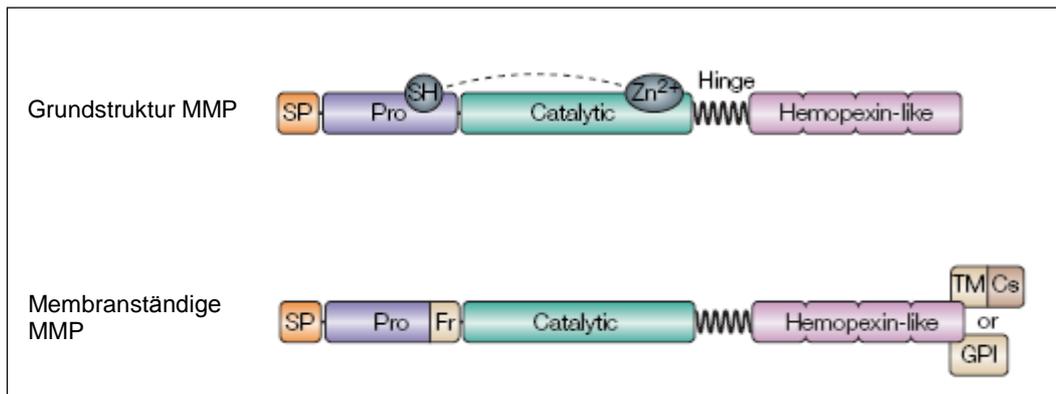


Abbildung 2: Proteinstruktur Schema der Matrixmetalloproteinasen, adaptiert nach (Parks et al. 2004).

Die Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -2, -3, -9 und -14 wurden als wesentliche Faktoren der Matrixveränderungen bei Glomerulopathien beschrieben (Nakamura et al. 1993; Carome et al. 1994; Schafer et al. 1995; Hayashi et al. 1998).

D.5. Die Matrixmetalloproteinase MT1-MMP

Die Matrixmetalloproteinase MT1-MMP (MMP-14) wurde 1994 von Sato et al. entdeckt (Sato et al. 1994) und ist eine von sechs membranständigen Matrixmetalloproteinasen, die heute bekannt sind (Takino et al. 1995; Will and Hinzmann 1995; Puente et al. 1996; Pei 1999b, 1999a). Sie ist nicht nur Hauptaktivator einer der am häufigsten vorkommenden Matrixmetalloproteinasen, der MMP-2 (Kinoh et al. 1996; Ruangpanit et al. 2002; Holmbeck et al. 2004), sondern spaltet *in vivo* auch selbst wichtige Matrixbestandteile wie fibrilläre Kollagene, Fibrin, Syndecan-1 und die γ 2 Untereinheit von Laminin-5. Darüber hinaus sind weitere Substrate aus *in vitro* Studien bekannt (Parks et al. 2004). Die MT1-MMP stellt zusammen mit Nephrin, Podocin und CD2AP ein Protein der Schlitzmembran in der Niere dar, welches für den Erhalt dieser Filterstruktur von großer Bedeutung ist (Tryggvason 1999; Schwarz et al. 2001; Mayer et al. 2003). Ist die Interaktion der genannten Proteine gestört, kann es zum Verlust der Fußfortsätze der Podozyten und damit zur nephrotischen Proteinurie kommen (Smoyer and Mundel 1998; Saleem et al. 2002). Die MT1-MMP spielt bei sehr verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle, wie z. B. Wundheilung, Knochenentwicklung, Angiogenese, Entzündung, rheumatischer Arthritis, Arteriosklerose, Tumorinvasion und Metastasierung (Zucker et al. 2003). In der Niere ist die MT1-MMP die vorherrschende membranständige MMP. Sie wird von Mesangiumzellen des Menschen und der Ratte synthetisiert (Ward et al. 1994; Ailenberg and Silverman 1996). Die MT1-MMP Knockout Maus weist craniofacialen Dismorphismus, Arthritis, Osteopenien, Zwergwuchs und Fibrose von Bindegewebe aufgrund von fehlender essentieller collagenolytischer Aktivität auf, die zum Aufbau von Skelett und extraskelletalem Bindegewebe notwendig ist (Holmbeck et al. 1999).

D.5.1 Regulation der MT1-MMP Genexpression

Die membranständigen Matrixmetalloproteinasen tragen neben der Transmembrandomäne eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit, eine Erkennungsstelle für furin-ähnliche Proprotein Convertasen. Diese scheinen für eine konstitutive Aktivierung der MT1-MMP zu sorgen (Pei and Weiss 1996), was in COS-7 und Nierenzellen aus Hunden (MDCK) gezeigt wurde. Darüber hinaus ist für die MT1-MMP auch ein Furin-unabhängiger Aktivierungsweg bekannt (Sato et al. 1999). Über die transkriptionelle Regulation des MT1-MMP Genes beim Menschen ist wenig bekannt. Lohi et al. (Lohi et al. 2000) konnten eine Enhancerfunktion des Transkriptionsfaktors Sp1 zeigen. In von Hippel-Lindau Nierencarcinomzellen wurde zudem eine Regulation durch HIF2- α gezeigt, für den es zwei potentielle Bindungsstellen zwischen -323bp und -329bp und bei -56bp bis -51bp gibt (Petrella et al. 2005). Für das Mausgen sind darüber hinaus Aktivitäten der Faktoren NFATc1, Sp1 und Sp3 (Alfonso-Jaume et al. 2004) sowie Egr-1 nachgewiesen worden (Haas et al. 1999). In einem Rattenmodell der mesangioproliferativen GN (Anti-Thy 1.1 antibody nephritis) ist die Expression von MMP-2 und MT1-MMP erhöht (Hayashi et al. 1998). Steinmann-Niggli et al. konnten zeigen, dass im gleichen Tiermodell eine Hemmung der MMP-2 zu einer Reduktion der Krankheitsausprägung führt (Steinmann-Niggli et al. 1998). Die Untersuchung regulatorischer Vorgänge der Genexpression der MT1-MMP stellt daher einen Baustein im genaueren Verständnis der molekularen Grundlagen von entzündlichen Nierenerkrankungen dar.

Ziel dieser Arbeit war es, die Transkriptionsregulation der MT1-MMP genauer zu charakterisieren und das Auftreten sowie die potentielle Funktion von SNPs zu prüfen. Außerdem wurde ihre Rolle beim Vorliegen von Minimal-Change-Glomerulonephritis und fokal-segmentaler Glomerulosklerose untersucht.

E - Material und Methoden

E.1. Material

E.1.1 Mikroorganismen und Zelllinien

E.1.1.1 *E. coli*

Bezeichnung	Genotyp	Referenz
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80 <i>laqZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-arg</i>)U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>relA1</i> λ , <i>phoA</i> , <i>supE44</i> ,	Invitrogen

E.1.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
MC72 ⁺	Ratten Mesangium Zelllinie	Zur Verfügung gestellt von David Lovett (Marti et al. 1993)

E.1.2 DNA

E.1.2.1 Plasmide und Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pGL3 Basic	Luciferase Reporter Vektor, 4818bp, <i>luc</i> ⁺ , SV40 late poly(A) Signal, <i>Amp</i> ^r , <i>ori</i>	Promega
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor für PCR Produkte mit glatten Enden, 3015bp, <i>lacZ</i> , <i>Amp</i> ^r , <i>ori</i>	Promega

Plasmide, die für diese Arbeit generiert wurden:

Plasmid	Primer
pGL3-Luc 202	MT1 _{ex2} , MT1 M
pGL3-Luc 288	MT1 _{ex2} , MT1 L
pGL3-Luc 344	MT1 _{ex2} , MT1 F
pGL3-Luc 586 Wt	MT1 _{ex2} , MT1 G; MT1 V/V _{as}
pGL3-Luc 586 M1	MT1 _{ex2} , MT1 G
pGL3-Luc 586 M2	MT1 _{ex2} , MT1 G; Mutation genomisch vorhanden, BS 500
pGL3-Luc 586 M3	MT1 _{ex2} , MT1 G; M UN 47/48
pGL3-Luc 586 Neg RR1	MT1 AA/AB
pGL3-Luc 586 M1 Neg RR1	MT1 _{ex2} , MT1 G; MT1 U/U _{as}
pGL3-Luc 586 Neg RR1 Neg Sp1	MT1 AA/AB
pGL3-Luc 586 M1 Neg Sp1	MT1 _{ex2} , MT1 G; MUN43/44
pGL3-Luc 586 Wt Neg Sp1	MT1 V/V _{as} , MUN43/44
pGL3-Luc 1246	MT1 _{ex2} , MT1 J

E.1.2.2 Oligonukleotide

Legende	Beschreibung
as	antisense Primer
s	sense Primer
Bgl II	fügt am 3' Ende eine Bgl II Restriktionsschnittstelle ein
Kpn I	fügt am 5' Ende eine Kpn I Restriktionsschnittstelle ein

E.1.2.2.1 PCR Primer zur Generierung von Luciferase Konstrukten

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung	Bindungs- position im MT1-MMP Promotor ¹
MT1 _{ex2}	aga tct gag aaa tgg tcc gag acc ac	Alle pGL3 Basic Konstrukte	+7bp, as

¹ Die Nummerierung erfolgt ab dem Translationsstart des humanen MT1-MMP Gens in 5' Richtung mit negativem Vorzeichen, in Richtung 3' mit positivem Vorzeichen; MT1-MMP Promotorsequenz siehe Anhang.

MT1 F	ggt acc cag gct aaa aca acc acg tc	pGL3-Luc 344,Kpn I	-343bp, s
MT1 G	ggt acc gcc aca tag ccc cca ata tc	pGL3-Luc 586,Kpn I	-585bp, s
MT1 H	ggt acc aaa ggt tgg agc cac aga tc	pGL3-Luc 808,Kpn I	-817bp, s
MT1 J	ggt acc tcc tct ctc act ggc caa at	pGL3-Luc 1246,Kpn I	-1245bp, s
MT1 L	ggt acc agg aga ggc tgt ggg aga ag	pGL3-Luc 288,Kpn I	-287bp, s
MT1 M	ggt acc gat caa aaa ccg gaa aag agg	pGL3-Luc 202,Kpn I	-202bp, s
MT1-X	ggt acc caa aaa ggc aac tta gag gtg t	pGL3-Luc 407, Kpn I	-407bp, s

E.1.2.2.2 EMSA Sonden

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung	Bindungs- position im MT1-MMP Promotor
MUN 1 II	tgt ttt ttt ttt ttt tcc ttc cat ttc ttg	RR1 M2	s
MUN 2 II	caa gaa atg gaa gga aaa aaa aaa aaa aga	RR1 M2	as
MUN 5	gtg gga gaa ggg agg gac cag ag	noncanonical Sp1 (Alfonso-Jaume et al. 2004)	s
MUN 6	ctc tgg tcc ctc cct tct ccc ac	noncanonical Sp1 (Alfonso-Jaume et al. 2004)	as
MUN 19	tgt ttt ttt ctt ttt tcc ttc cag ttc ttg	RR1 M1	s
MUN 20	caa gaa ctg gaa gga aaa aag aaa aaa aca	RR1 M1	as
MUN 29	tgt ttt ttt ctt ggt tcc ttc cag ttc ttg	Neg RR1	s
MUN 30	caa gaa ctg gaa gga acc aag aaa aaa aca	Neg RR1	as
MUN 33	tgt ttt ttt ttt ttt tcc ttc cag ttc ttg	RR1 Wt	s
MUN 34	caa gaa ctg gaa gga aaa aaa aaa aaa aca	RR1 Wt	as
MUN 41	tgt ttt ttt ctt ttt tcc ttc cat ttc ttg	RR1 M3	s
MUN 42	caa gaa atg gaa gga aaa aag aaa aaa aca	RR1 M3	as
MUN 45	gga ggg cac tgg ggc ggg gac gga gga gag	Sp1 (Lohi et al. 2000)	s
MUN 46	ctc tcc tcc gtc ccc gcc cca gtc ccc tcc	Sp1 (Lohi et al. 2000)	as
PodSA	gta aga gtg taa gaa aca aat tat taa cag aaa	unspezifische Sonde	s
PodSA	gta aga gtg taa gaa aca aat tat taa cag aaa	unspezifische Sonde	as

E.1.2.2.3 Mutagenese Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung	Bindungs- position im MT1-MMP Promotor
MT1-U	caa ctt aga gga gtt ttt ttc ttg gtt cct tcc agt tct tgg ttg	M1 Neg RR1	-390bp, s
MT1- U _{as}	caa cca aga act gga agg aac caa gaa aaa aac acc tct aag ttg	M1 Neg RR1	-354bp, as
MT1-V	ggc aac tta gag gtg ttt ttt ttt ttt ttc ctt cca gtt ctt gg	RR1 M1	-400bp, s
MT1 V _{as}	cca aga act gga agg aaa aaa aaa aaa aac acc tct aag ttg cc	RR1 M1	-354bp, as
MT1-AA	caa ctt aga ggt gtt ttt ttt ttg gtt cct tcc agt tct tgg tgg	Wt Neg RR1	-390bp, s
MT1-AB	caa cca aga act gga agg aac caa aaa aaa aac acc tct aag ttg	Wt Neg RR1	-354bp, as
MUN 43	gga ggg cac tgg ttc ggg gac gga gga gag	Neg Sp1	-310bp, s
MUN 44	ctc tcc tcc gtc ccc gaa cca gtg ccc tcc	Neg Sp1	-281bp, as
MUN 47	caa ctt aga ggt gtt ttt ttc ttt t	RR1 M3	-390bp, s
MUN 48	ttc ctt cca ttt ctt ggt tg	RR1 M3	-354bp, as

E.1.2.2.4 Allgemeine PCR Primer

Name	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung	Bindungs- position im MT1-MMP Promotor
GLprimer2	ctt tat gtt ttt ggc gtc ttc ca	Sequenzierprimer für pGL3 Vektoren, as	–
MT1 A	gcc aca tag ccc cca ata at	Screening PCR	-585bp, s
MT1 B	ggg gat tgt tcc tca aag tg	Screening PCR	-147bp, as
MT1 E	aga tct ttg tct tcg gta	Screening PCR, Bgl II	-90bp, as
MT1-M _{as}	ctc ctc ttt tcc ggt ttt tga t	Sequenzierprimer DNA-Screening	-180bp, as
MT1-S	gtg aga caa atg ctg aat acc a	Sequenzierprimer DNA-Screening	-553bp, s
MUN 38	gaa ctg ggg tct ggt t	Sequenzierprimer DNA-Screening	-222bp, as
RVprimer3	cta gca aaa tag gct gtc cc	Sequenzierprimer für pGL3 Vektoren	s

SP6	tat tta ggt gac act ata g	Sequenzierprimer für pGEM-T Easy Vektor	s
T7	taa tac gac tca cta tag gg	Sequenzierprimer für pGEM-T Easy Vektor	as

E.1.3 Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterial (alphabetisch nach Herstellern)

Firma	Artikel
Amersham Biosciences (Freiburg)	G-50 Microspin Columns, Hybond N ⁺ Membran, Hybond P Membran, Redivue $\gamma^{32}\text{P}$ -Adenosintriphosphat [γ - ^{32}P]dATP, [α - ^{32}P]dCTP, Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) (Doppelstrang, Natriumsalz), Rapid-hyb Buffer
Apotheke, UKE intern	Ethanol (vergällt)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
Appligene (Illkirch, Frankreich)	Nona Primer Kit
Baxter (Unterschleißheim)	Aqua ad iniectabilia 1l
Becton Dickinson (Le Pont de Claix, Frankreich)	Falcon Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)
Böhringer (Mannheim)	Ampicillin, Expand High Fidelity PCR System
BIORAD (München)	Dc Protein Assay
Biozym (Hess. Oldendorf)	NuSieve 3 :1 Agarose, PCR Tubes (0,5ml), GelBond PAG Film
Braun (Melsungen)	Aqua ad iniectabilia 10ml, 20ml Einmalspritzen
Clontech Laboratories/Takara BIO (Mountain View, USA)	BD Advantage 2 Polymerase Mix
Dionova (Hamburg)	SOB Medium Kapseln
Eppendorf (Hamburg)	Combitips (2,5ml, 5ml, 12,5ml)
Fermentas (St. Leon-Rot)	6x Loading Dye Solution, Restriktionsenzyme, T4 Polynucleotid Kinase, 10mM dNTP Mix

Fluka (Buchs)	Glycerin (>99,5%), Isopropanol, Luminol (3-amino-phthalhydrazid), Wasserstoffperoxid p.A.
FUJI (Tokyo)	Medical x-ray film Super RX (Röntgenfilm)
GATC Biotech (Konstanz)	DNA Sequenzierungen
GIBCO (Karlsruhe)	D-PBS (+CaCl ₂ / MgCl ₂), D-PBS (-CaCl ₂ / MgCl ₂), FCS (hitzeinaktiviert), 1M Hepes, RPMI Medium (+ L-Glutamin, - Pyruvat), 100mM Natriumpyruvat, 0,5% Trypsin/EDTA
Greiner <i>bio-one</i> (Frickenhausen)	Cell star tubes (15ml, 50ml)
Invitrogen (Karlsruhe)	Agarose (Elektroph. Grade), Rekombinante Taq DNA Polymerase, 10bp und 1kb DNA Ladder, T4 DNA Ligase, Synthese von Oligonukleotiden, Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml bzw. 10000µg/ml), Random Primer (3µg/µl)
J.T. Baker (Deventer, Niederlande)	Ethanol absolut, Natriumchlorid
Macherey & Nagel (Düren)	Nucleo Spin Blood Quick Pure, Nucleo Spin Plasmid Quick Pure Kit, Nucleo Spin Plasmid, Nucleo Spin RNA Extract II, Nucleobond PC 100 und PC 500, NucleoSpin Extract II
Merck (Darmstadt)	Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Bromphenolblau, Ethanol p.A., HCl, Isopropanol, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, NaOH, Tween 20, SDS
Metabion (Martinsried)	Synthese von Oligonukleotiden
Minerva Biolabs (Berlin)	Venor GeM Mycoplasmen Kit
New England Biolabs (Frankfurt a. Main)	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP)
Novartis (Nürnberg)	Sandimmun Infusionslösungskonzentrat (100mg/ml) (CsA)
Promega (Mannheim)	T4 DNA Ligase, pGL3 Luciferase Reporter Vektoren, pGEM-T Easy Vektor
Q-Bio Gene (MP Biomedicals, Heidelberg)	LB-Agar Medium Kapseln
Qiagen (Hilden)	QIAquick PCR Purification Kit, QIAamp DNA Mini Kit, Gel Extraction Kit, DNeasy Blood & Tissue Kit

Riedel-de Haen (Seelze)	Essigsäure
Roche Applied Science (Penzberg)	Klenow DNA-Polymerase
Roth (Karlsruhe)	Gel Blotting Paper, 1M IPTG, Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Methanol, Rotiszint Szintillationsflüssigkeit
Santa Cruz (Santa Cruz, USA)	Monoclonaler Maus NFATc1 Antikörper (7A6), Polyclonaler Ziege NFATc1 Antikörper (K-18), Polyclonaler Kaninchen Elf-1 Antikörper (C-20), Polyclonaler Kaninchen PEA3 Antikörper (H-120)
Sarstedt (Nümbrecht)	Pipettenspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl), Biosphere Filterspitzen (10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl), Reagiergefäße („Cups“) (0,5ml, 1,5ml), Zellkultur Tubes (5ml), Zellkulturflaschen (25cm ² , 75cm ² , 182 cm ²), Zell- kultur Flaschen, Sterilfilter Filtropur 2,0 µm, Zellkultur Schalen (6-Loch, Flat bottom)
Schott (Wertheim/Main)	Glaswaren
SERVA (Heidelberg)	Acrylamid/Bis-Lösung (29:1, 30% w/v), Ionomycin Calciumsalz (reinst), D-Luciferin (reinst), SERVAPOR Dialyseschlauch (Durchmesser 6mm), Proteinase- Inhibitor-Mix M, MOPS
Sigma-Aldrich (Steinheim)	Ammoniumpersulfat, Concanavalin A, DTT, Ethidiumbromid (500µg/ml), EDTA, EGTA, Endothelin 1 (human, porcine), Glycylglycin, IGEPAL CA-630 bzw. NP-40, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natrium Orthovanadat (min. 90% Titration), Paracumarsäure, PMA, PMSF, Polyethylenimin, β-Mercaptoethanol, TEMED, Triton X-100, Trizma Base (>99,9%), X-Gal, Xylencyanol
Stratagene (La Jolla, USA)	QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, High Sensitivity β-Galactosidase Assay Kit, <i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase
UKE Sequenzierservice, Institut für Pathologie	DNA Sequenzierungen
VWR (Darmstadt)	Sterile Einmalspatel
Wheaton (Millville, USA)	Loose Dounce Homogenisator

E.1.4 Geräte

(alphabetisch nach Gerät)

Artikel	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius R 160 P
Autoklav	Systemec 5075 ELV
Brutschrank	HERAEUS Hera Cell
Dotblot Apparatur	Schleicher & Schüll
Elektrophorese-apparaturen	BIORAD Protean II (EMSA)
Entwicklergerät	AGFA Curix 60
Geigerzähler	Berthold LB 122
Inkubationsschrank 37°C	HERAEUS B 6030
Kühl- und Gefrierschränke	+ 4°C : Liebherr Profi Line - 20°C : Privileg Öko Sparmeister, - 80°C : Harris Manufacturing Company IUF 850 20 VC-O-E
Laborwaage	OHAUS Navigator
Luftschüttler 37°C	GFL 3032
Luminometer/Photometer	Berthold Lumat LB 9501, Berthold Mithras LB 940
Magnetrührer	Monotherm Variomag
Mikroskop	ZEISS IM 35
PCR-Geräte	BIOMETRA T3 Thermocycler, BIOMETRA T Gradient
pH-Meter	Mettler Toledo MP 220
Photometer	Amersham Pharmacia Gene Quant Pro, Dynatech MR 5000 (96-Loch Format)
Pipettierhilfen	GILSON 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl; Costar Stripettor
Scanner	BIORAD Fluor-S Multi Imager
Scintillationszähler	Perkin Elmer Tri-Carb 2900 TR
Spannungsquellen	BIORAD Power Pac 1000 (EMSA), Höfer Scientific Instruments DC Power Supply (WB)
Sterilbänke	HERAEUS Hera Safe, Nuair NU 440-400E
Ultrazentrifugen	Beckmann Coulter Optima Max Benchtop Ultrazentrifuge, Beckman Coulter TLA-110 Rotor;

	Sorvall Discovery M120 Ultrazentrifuge, S 100 AT4 Rotor
UV-Detektionssystem	INTAS Gel Jet Imager
Vakuum Zentrifuge	Savant Speed Vac DNA 110
Vortexgerät	Heidolph Reax Top
Wärmeblock	Eppendorf Thermomixer 5436
Wasserbäder	HAAKE K20 (15°C), HAAKE DC1 (15°C), Julabo UC (37°C), Julabo MV (37°C), Julabo F25 (37°C), GFL 1083 (70°C), GFL 1012 (Oligoannealing), GFL 1004 (37°C, Zellkultur)
Wippe	LTE Labortechnik Rocky
Zentrifugen	Eppendorf 5415C, Eppendorf 5418D, HERAEUS Megafuge 1.0R (50ml tubes), HERAEUS Biofuge fresco (4°C)

E.1.5 *In silico*

E.1.5.1 Software

Aufgabe	Programm
Analyse von Punktmutationen	Mutation Surveyor V 3.01
Sequenzvergleiche	blastn
Suche nach Restriktionsschnittstellen	webcutter 2
Suche nach Transkriptionsfaktoren	MatInspector, TESS

E.1.5.2 Internetdienste

NCBI Dienste (National Center for Biotechnology Information):

Recherche von DNA-Sequenzen: ENTREZ cross-database search

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi?itool=toolbar>

Recherche von SNPs: NIH dbSNP

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

DNA-Sequenzvergleiche /-alignments: BLAST

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>

Literaturrecherche: PubMed

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

Recherche von genomischen DNA-Sequenzinformationen der MT1-MMP und SNPs:
Ensemble:

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene=ENSG00000157227

Suche nach Restriktionsschnittstellen:

Webcutter 2:

<http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html>

Suche nach potentiellen Transkriptionsfaktoren für eine Zielsequenz:

MatInspector:

<http://www.genomatix.de/cgi-bin/matinspector/matinspector.pl>

TESS:

<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>

E.2. Methoden

E.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Die verwendete Ratten Mesangium-Zelllinie MC72⁺ war eukaryotischer, adhärenter Natur. Die Mesangiumzellen (MZ) wurden bei 37°C, unter 10% CO₂, in 75cm² Flaschen kultiviert und ca. jeden dritten Tag passagiert. Sie wurden in RPMI M2 kultiviert (RPMI Medium incl. 1mM Natrium Pyruvat, 1% v/v Penicillin/Streptomycin, 15mM Hepes (= M1) und 10% v/v FCS).

E.2.2 Proteinextraktionen

E.2.2.1 Proteinextraktion aus Gesamtzelllysat

80% konfluente MZ einer 75cm² Kulturflasche wurden mit PBS w/o gewaschen, trypsinisiert und nach dem Abzentrifugieren in 100-300µl Protein Lysis Puffer (50mM Hepes (pH 7,5), 140mM NaCl, 2mM EDTA, 1%² NP-40 p.A., 10% Glycerol p.A.) für 10' im Wasserbad bei 100°C gekocht. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurde 10' bei RT und 13000rpm abzentrifugiert und für den Überstand eine Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe E.2.3) durchgeführt.

E.2.2.2 Kernproteinextraktion nach Dignam

12 182cm² Zellkulturflaschen mit konfluenten MZ wurden ein Mal mit PBS w/o gewaschen. Nach weiterer Zugabe von 15ml PBS w/o wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und im Falcon Tube 10' bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet, i.R. ca. 1000µl, wurde rasch in 5 VT hypotonem Puffer (10mM Hepes

² Soweit nicht anderweitig benannt, gelten %-Angaben als w/v und Medien, Puffer sowie Lösungen als wässrig.

(pH 7,9), 1,5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) resuspendiert und nochmals 5' bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden erneut in 2ml (bis maximal 3 VT des originalen Zellpelletvolumens) hypotonem Puffer resuspendiert. Dann sollten die Zellen 10' auf Eis anschwellen. Nachdem die Zellen im Dounce Homogenisator durch 10 Mal sanftes auf- und ab Bewegen lysiert wurden, wurde die Lyse im Mikroskop überprüft und es folgte ein Zentrifugationsschritt von 15' bei 4000rpm und 4°C. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde in ½ VT Niedrigsalz Puffer (20mM Hepes, 25% Glycerol, 1,5mM MgCl₂, 20mM KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT), i.R. 250µl, aufgenommen und auf 5 Aliquots in Eppendorf Cups verteilt. Tropfenweise wurde 1/3 VT Hochsalzpuffer (20mM Hepes (pH 7,9), 20% Glycerol, 1M KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) zugesetzt und vorsichtig gemischt.

Die Kerne wurden für 30' sanft bei 4°C geschüttelt und die DNA anschließend 30' bei 15000rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde gegen 500ml Dialysepuffer (20mM Hepes (pH 7,9), 20% Glycerol, 0,1M KCl, 0,2mM EDTA, 0,2mM PMSF, 0,5mM DTT) ün dialysiert. Hierzu wurde SERVAPOR Dialyseschlauch (6mm Durchmesser; 12–14kD Ausschluss Masse) verwendet. Anschließend wurden Feststoffbestandteile des Dialysats abzentrifugiert und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt (siehe E.2.3). Aliquots von 10-20µg Protein wurden in Flüssigstickstoff eingefroren und maximal ein Mal aufgetaut. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

E.2.2.3 Kernproteinextraktion nach Crabtree

Das von Gerald R. Crabtrees Arbeitsgruppe für NFAT Protein optimierte Protokoll zur Extraktion von Kernproteinen (<http://crablab.stanford.edu/>) wurde adaptiert und folgendermaßen durchgeführt:

Das gesamte Protokoll wurde auf Eis durchgeführt. Zwei große Zellkulturflaschen (182cm²) 80% konfluenten MC72+ Zellen wurden mit eiskaltem PBS w/o gewaschen, in jeweils 1ml Puffer A (25mM Hepes (pH 7,0), 25mM KCl, 100µM EDTA, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1:100 Proteinase-Inhibitor Mix M, 1mM Natrium-Orthovanadat) gut resuspendiert und in 800µl Portionen in Eppendorf Cups überführt. Nachdem die Zellen für 10' quellen konnten, wurde ½ VT (400µl) 1,5% NP-40 in Puffer A zugesetzt, auf- und abpipettiert und eine Minute auf Eis stehen gelassen. Die Zellyse wurde nach diesem Schritt unter dem Mikroskop überprüft. Die Nuclei wurden 30'' bei 10000rpm bei 4°C abzentrifugiert, das Pellet in 230µl Puffer C (50mM Hepes (pH 7,6), 50mM KCl, 100µM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF) resuspendiert und schließlich auf ein Endvolumen von 315µl gebracht. Nach Zusatz von 35µl 3M (NH₄)₂SO₄ wurde 30' im Kühlraum geschüttelt und das Nucleilysat schließlich bei 93 000rpm (ca. 355 000g) für 10' bei 4°C im TLA-110 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand (ca. 270µl) wurde tropfenweise in einem neuen Zentrifugenröhren mit 1 VT 3M (NH₄)₂SO₄ versetzt. Nach weiteren 10' Zentrifugation bei 47000rpm (ca. 89000g) bei 4°C setzte sich ein durchsichtiges Pellet ab. Der Überstand wurde sehr vorsichtig abgenommen, das Proteinpellet in Puffer C resuspendiert und mit AMICON YM-10 Säulen entsalzt. Hierzu wurde 40' bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert, mit 70µl Puffer C gewaschen und die Proteine nach weiteren 30' Zentrifugation mit 60µl Puffer C von der Säule eluiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je nach angestrebter Anwendung 10-100µg Aliquots in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Puffer B zur Präparation der cytosolischen Fraktion wurde nicht eingesetzt.

E.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration von Lösungen wurde mit dem BIORAD Dc Protein Assay in 96-Loch Platten ermittelt. Hierzu wurden 2µl Proteinlösung mit 25µl Reagens A und 200µl Reagens B gemischt, für 15' im Dunkeln stehen gelassen und im Berthold Mithras LB 940 photometrisch bestimmt. Für die Kalibrierkurve wurden Albuminlösungen von 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625 µg/µl im jeweiligen Puffer der Proteinprobe angesetzt und ebenso 2µl wie beschrieben vermessen.

E.2.4 Herstellung von DNA Konstrukten in *E.coli*

E.2.4.1 Luciferase Reportergergenkonstrukte

Für die Generierung von Promotorfragmenten des MT1-MMP Gens in ansteigender Länge wurden von genomischer DNA des Blutspenders BS 500 5µl mit 10µmol dNTPs, je 75µg 3'- und 5'-Primer (Tabelle E.1.6.1) und 0,4µl Polymerase im Expand High Fidelity PCR System ad 50µl eingesetzt. 5'-Primer enthielten jeweils eine Kpn I, 3'-Primer eine Bgl II Restriktionsschnittstelle für die nachfolgenden, gerichtete Klonierung in den pGL3 Vektor. Das Denaturieren der genomischen DNA erfolgte 5' bei 95°C. Auf jeweils 30 Zyklen PCR von 30'' bei 94°C, 30'' bei 56°C, 2' bei 72°C folgten 10' 72°C. Das PCR Produkt wurde je nach Länge im 1-2%igen Agarose Gel mit 1 x TBE Puffer (10,8g Tris, 5,5g Borsäure, 4ml 0,5M EDTA ad 1l) auf die korrekte Länge und Nebenprodukte überprüft.

E.2.4.1.1 Klonierung in pGEM-T Easy Vektor

0,5µl PCR Produkt wurde in 0,5µl pGEM-T Easy Vektor ad 5µl nach Herstellervorschrift ün bei 14°C ligiert. Die Reaktion wurde mit 45µl 1x TE Puffer (10mM Tris, pH7.5, 1mM EDTA) abgestoppt. Nach Hitzetransformation in *E.coli*

wurde der gesamte Ansatz auf X-Gal Platten (300ml LB Agar Medium + 30µl 1M IPTG + 300µl Ampicillin (100µg/µl), 480µl X-Gal (50mg/ml in Dimethylformamid)) ausgestrichen, üN bei 37°C inkubiert und am nächsten Morgen weiße Kolonien gepickt. Zur Kontrolle wurde eine Minipräparation mit NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit nach Hersteller Vorschrift durchgeführt, diese sequenziert und schließlich ein größere DNA Präparation angesetzt.

E.2.4.1.2 Klonierung in pGL3 Basic Vektor

Für Umklonierungen aus pGEM-T Easy Vektor wurde ein Midi Präp mit M&N Nucleobond PC100 Kit gemäß Hersteller Angaben durchgeführt. Das DNA Pellet wurde in 50µl Wasser aufgenommen. In der Regel wurde eine Ausbeute von ca. 50µg erreicht. 10µg Vektor DNA wurden mit je 10U Kpn I und Bgl II in 1,5x Tango Puffer ad 20µl 1h bei 37°C verdaut. Nach Kontrolle des Verdaus im 1-2%igen Agarosegel wurde die Insert Bande ausgeschnitten, mit NucleoSpin Extract II Kit oder Qiagen Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30µl Elutions Puffer aufgenommen. Die Konzentration wurde im Photometer bestimmt.

In einem molaren Verhältnis von 6:1 (Insert : Vektor) wurde die Ligation mit 1µl Ligase (10U) im T4 DNA Ligase System ad 10µl üN bei 14°C durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 90µl TE Puffer gestoppt und 5µl in E.coli transformiert. Zur Überprüfung der Ligationseffizienz wurde parallel eine Ligation ohne Insert angesetzt. Diese sollte deutlich weniger Kolonien ergeben. Nach Minipräparation mit NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kit wurden 16µl Vektor mit je 1µl 10U Kpn I und Bgl II und 1x Tango Puffer 1h bei 37°C verdaut und das Produkt im 1-2%igen Agarose Gel auf seine Länge überprüft. Zur weiteren Kontrolle wurden die restlichen 7,5µl Minipräparation wie in E.2.10.1 beschrieben sequenziert.

Von jedem positiven Klon mit korrektem Insert wurde eine Maxipräparation mit NucleoBond PC 500 nach Herstellerangaben angesetzt. Das DNA Pellet wurde in

100µl TE aufgenommen, wobei in der Regel eine Ausbeute von 300µg erreicht werden konnte.

E.2.4.1.3 Gerichteter Basenaustausch (Mutationskonstrukte)

Zum Einfügen von Punktmutationen in vorhandene Luciferase Konstrukte wurde der QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet. Abweichend vom Hersteller Protokoll wurden Sense- und Antisensestrang zunächst einzeln in PCRs amplifiziert (2' 95°C und 9 Zyklen 30'' 95°C, 1' 68°C, 7' 68°C). Nach Vereinigung beider Ansätze wurden weitere 14 Zyklen des genannten Programms gefahren und schließlich bei 4°C gekühlt.

E.2.4.2 Haplotypen Klonierung in pGEM-T Easy Vektor

Zur Klonierung von Haplotypen der genomischen DNA aus Nierenbiopsaten oder von Blutspendern wurde eine AB- oder AE-PCR durchgeführt (siehe E.2.10.2 DNA Sequenzierung im Hochdurchsatz) und das PCR Produkt wie in E.2.4.1.1 beschrieben in pGEM-T Easy Vektor kloniert. Von positiven Klonen wurde vor der Sequenzierung ein Restriktionsverdau mit 20U Apa I und 10U Pst I mit 1,5x Tango Puffer (Fermentas) durchgeführt, da es eine relativ hohe Rate an falsch positiven Klonen gab.

E.2.5 Hitzetransformation von *E.coli*

3-5µl Ligationsansatz wurden mit frisch auf Eis aufgetauten 30µl Subcloning Efficiency DH5α kompetente Zellen sanft gemischt, 30' auf Eis inkubiert, durch Hitzeschock 60'' bei 42°C transformiert und erneut 1' auf Eis abgekühlt.

Anschließend wurden 200µl SOC Medium zugegeben (SOB Medium mit Pellets gemäß Herstellerangabe angesetzt (2% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, 0,25% v/v 1M KCl, 1% v/v 1M MgCl₂ + 2% v/v 1M Glucose) und für 40-60' bei 37°C geschüttelt. Der gesamte Ansatz wurde auf vorgewärmten Agarplatten ausgestrichen und üN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden Kolonien gepickt.

E.2.6 Dotblot

Zur Identifizierung von positiven Klonen wurde bei Bedarf die Dotblot Methode angewendet. Als Sonde wurden 200ng/7µl des jeweilige Plasmid Insert verwendet. Diese wurden 10' bei 100°C im Wasserbad denaturiert, im Anschluss mit 3µl 10mM dNTPs, 4µl Nona Primern und 1µl Klenow DNA-Polymerase und 5µl [α -³²P]dCTP (50µCi) versetzt und 60' im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach Zusatz von 400µl TE Puffer wurde 10' bei 95°C denaturiert und kurz auf Eis abgekühlt. Für die Bakterienkulturen wurden 200µl/well LBamp Medium in einer 96-Loch Platte vorgelegt und darin je eine Kolonie pro Loch als üN-Kultur angeimpft. Nach Vorbereitung von Gel Blotting Papier und Hybond N⁺ Membran in der Dotblot Apparatur wurden je 50µl der Bakterienkultur auf die Apparatur pipettiert und durch 5' Absaugen auf die Membran übertragen. Die Bakterien auf der Membran wurden anschließend 10' in 40mM NaOH denaturiert, 10' in 6 x SSC (0,9M NaCl, 0,1M Natriumcitrat, mit HCl auf pH 7 eingestellt) + 0,5M Tris (pH ca. 7) neutralisiert und weitere 10' in 6 x SSC gewaschen. Die DNA wurde durch 2' Inkubation im Crosslinker auf der Membran fixiert und schließlich luftgetrocknet. Im Anschluss wurde der Dotblot 1h bei 65°C mit Hybridisierungspuffer (Rapid-hyb buffer, 10ml) prähybridisiert, 1h bei 65°C mit der Sonde hybridisiert (gesamter Sondenansatz dem schon vorliegenden Prähybridisierung Puffer zugesetzt) und in 0,1 x SSC, 1% SDS 1h bei 65°C gewaschen. Zur Detektion wurde der Blot 1h bis üN auf Röntgenfilm exponiert und dieser entwickelt. Von positiven Klonen wurde eine DNA Maxipräparation (100ml LBamp) angeimpft (siehe E.2.9.1).

E.2.7 Transfektion eukaryotischer Zellen

Für die Luciferase Tests wurden 24h vor der Transfektion 100000 Zellen in 6-Loch (6-well) Platten ausgesät, so dass eine Konfluenz von etwa 80% zum Zeitpunkt der Transfektion erreicht war. Pro Loch wurde ein 1,5ml Cup mit 2 μ l β -Gal Kontrollvektor (1 μ g/ μ l), 2 μ l Vektor (1 μ g/ μ l) angesetzt, 100 μ l PBS w/o zugegeben und 10' bei RT inkubiert. Gleich im Anschluss wurden 540 μ l des Transfektionsreagenzes Polyethylenimin (PEI; 50%ige Lösung mit 1N HCl auf pH 7,0 eingestellt) mit 5ml PBS w/o gemischt und bei RT inkubiert bis die erste Inkubationszeit abgelaufen war. Pro Cup wurden 100 μ l der Lösung zugesetzt und weitere 10' bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen mit 2ml PBS⁺ gewaschen und 2ml M1 zugegeben. Der gesamte Transfektionsansatz wurde auf die Zellen gegeben und nach 4h normaler Inkubation im Brutschrank mit 200 μ l FCS pro Loch abgestoppt und weiter im Brutschrank inkubiert.

E.2.8 Luciferase und β -Galaktosidase Assay

22-24h nach der Transfektion wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit 200 μ l/well Lyse Puffer (Puffer 1 + 1% Triton X-100, 1mM DTT; Puffer 1: 25mM Glycylglycin pH 7,8, 15mM MgSO₄, 4 mM EGTA) 10' geschüttelt. Für die Luciferasemessung wurden 100 μ l Lysat in Messröhrchen mit 350 μ l ATP-Lösung (Puffer 1 + 15 mM K₂HPO₄ (pH 7,8), 1mM DTT, 2mM ATP) versetzt und im Berthold Lumat LB 9501 gegen Leerwert (100 μ l Lyse Puffer + 350ml ATP Lösung) gemessen. Als Substrat wurden 100 μ l/Probe Luciferin Lösung (Puffer 1 + 2mM DTT, 0,4mM D-Luciferin) zugegeben.

Für die Normalisierung gegen einen internen Standard wurde eine β -Galaktosidase Messung mit High Sensitivity β -Galactosidase durchgeführt. Hierfür wurden je 20 μ l Lysat in 96-Loch Platten überführt, mit 100 μ l Substrat Lösung (Chlorphenol Rot- β -D-Galactopyranosid 300 μ g/ml in Puffer A) versetzt und 10-15' bei 37°C inkubiert, bis

sich eine deutliche Rotfärbung einstellte. Nach Zugabe von 100µl Stop Lösung (siehe Kit) wurde am Dynatech MR 5000 die Extinktion bei 550nm gegen Leerwert (Ansatz mit reinem Lyse Puffer) vermessen. Für die Abbildungen wurde der Quotient aus Luciferase und β -Galaktosidase als relative Luciferase Aktivität verwendet.

Die Messung der Luciferase Aktivität am Berthold Mithras LB 940 (ab 14.02.2007) erfolgte im 96-well Maßstab. Es wurden pro Probe 25µl Lysat mit 100µl ATP-Lösung versetzt und wie oben mit 25µl Luciferin Lösung gegen Leerwert gemessen. Die Messungen der β -Galaktosidase Aktivität blieben unverändert.

E.2.9 DNA Präparationen

E.2.9.1 Plasmid Präparationen

Die Präparation von Plasmiden wurde mit kommerziellen Kits nach Hersteller-vorschrift durchgeführt. Hierfür wurden Nucleo Spin Plasmid Quick Pure Kit und Nucleo Spin Plasmid (Minipräparation), Nucleobond PC 100 (Midipräparation) sowie 500 (Maxipräparation) eingesetzt.

E.2.9.2 Präparation von humaner, genomischer DNA

E.2.9.2.1 DNA Präparation aus Biopsien

Genomische DNA aus humanen Nierenbiopsien war aus verschiedenen Vorarbeiten bereits präpariert. Hierfür wurde von ausgewählten Paraffinblöcken mit eingebetteten Nierenbiopsie-Zylindern eine 30 µm dicke Scheibe abgeschnitten. Der Biopsie-Zylinder wurde mit Xylol aus der Paraffinscheibe herausgelöst, die genomische DNA mit Hilfe des DNeasy Blood & Tissue Kits aus dem Nierengewebe isoliert und in 2-3 Aliquots bei -20°C eingefroren. Vorher wurde mittels einer Kontroll-PCR die Qualität der gewonnenen DNA überprüft. Unterstützung bei der

Auswahl der Biopsien und ihre Bereitstellung erfolgte durch Prof. Dr. Helmchen, Nierenstiftung am UKE. Für alle Arbeiten mit humanem Gewebe lag eine Genehmigung der Ethikkommission des UKE vor.

E.2.9.2.2 DNA Präparation aus Blut

Alle Probanden, die Proben für die Kontrollgruppe bereitstellten, wurden mit einem Urinstix auf Nierengesundheit überprüft. Für die Gewinnung genomischer DNA aus Blut wurde 1ml EDTA-Blut eingesetzt, mit dem Nucleo Spin Blood Quick Pure Kit nach Herstellervorschrift aufgearbeitet und mit 200µl Elutions Puffer eluiert. Wegen der geringen Ausbeute wurde auf eine Konzentrationsbestimmung verzichtet und lediglich 1µl Eluat auf einem 0,8%igen Agarosegel kontrolliert. Die Präparation wurde in 2 Aliquots bei -20°C gelagert. Diese Arbeiten wurden ebenso in Vorarbeiten durchgeführt und entstanden in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Kühnl, Transfusionsmedizin (UKE), der den Zugang zu Proben von gesunden Blutspendern ermöglichte und Dr. Michael Kemper, Kinderklinik (UKE), welcher Blutproben von nierengesunden Kinderpatienten zur Verfügung stellte, um altersstratifizierte Kontrollen für Patienten unter 18 Jahren zu erhalten. Für Arbeiten mit humanen Blutproben lag eine Genehmigung der Ethikkommission des UKE vor.

E.2.10 DNA Sequenzierung

E.2.10.1 DNA Sequenzierung einzelner Proben

Zur Kontrolle von Luciferasekonstrukten, Mutagenese PCRs und zum Teil zur Bestimmung von Haplotypen im DNA Screening wurden Plasmid Minipräparationen durchgeführt. Davon wurden 7,5µl mit 1µl Big Dye v1.1, 75µg Primer (SP6 bzw. T7 Primer für pGEM-T Easy Vektor, RVprimer3 bzw. GLprimer2 für pGL3 Vektoren) und 3,5µl 5x Puffer ad 20µl als PCR (30'' 96°C, 15'' 58°C, 2' 60°C; 30 Zyklen)

angesetzt und das Produkt in bei -20°C gefällt (80 μl Aqua dest, 10 μl 3M NaAc (pH 5,2), 250 μl 100% EtOH). Anschließend wurde bei 4°C 10' 13000rpm zentrifugiert, 1 x mit 200 μl 70% EtOH gewaschen, erneut 5' bei 13000rpm zentrifugiert und bei RT trocknen gelassen. Die Analyse der Basenabfolge wurde durch den UKE Sequenzierservice mit einem 16-Kapillar Sequenzierer (ABI 3100 und 377) vorgenommen.

E.2.10.2 DNA Sequenzierung im Hochdurchsatz

Nach Optimierung des PCR Protokolls wurden von Biopsie-DNA 3 μl , von Blut-DNA 1 μl in einer AB- oder AE-PCR eingesetzt (0,4 μl dNTPs (10mM), 2,0 μl 10x SA Puffer (BD Advantage 2 PCR System), je 0,6 μl Primer MT1 A und MT1 B bzw. MT1 E (50ng/ μl = 7,6 μM), 0,4 μl (Biopsien) bzw. 0,2 μl (BS) BD Advantage 2 Polymerase ad 20 μl). Das Temperaturprogramm wurde einmalig 2' bei 95°C , 35 Zyklen 30'' bei 95°C , 30'' bei 61°C , 40'' bei 68°C und abschließend 1' bei 68°C gefahren. Zur Kontrolle wurden 1,5 μl PCR Produkt auf einem 1,5%igen Agarosegel überprüft. Der restliche PCR Ansatz wurde in 96-Loch Platten abgefüllt und bei RT zur Sequenzierung eingeschickt.

Die Sequenzierung von Proben aus dem DNA Screening erfolgte im Hochdurchsatzformat in 96-Loch Platten in Zusammenarbeit mit der Firma GATC Biotech (Konstanz). Dort wurde ein optimiertes Protokoll mit dem Primer MUN 38 und BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Kapillarelektrophorese erfolgte im ABI 3730 Sequenzierer.

E.2.11 Elektrophoretischer Mobilitäts Shift Assay (EMSA)

20 μg Sense und Antisense Oligonukleotide wurden für die Sondenherstellung ad 40 μl 1' bei $70-85^{\circ}\text{C}$ (je nach Schmelzpunkt der Oligonukleotide) im Wasserbad erwärmt

und darin üN abkühlen gelassen. Zur Kontrolle des Annealings wurde ein 3% NuSieve Agarosegel mit 10bp DNA Ladder gemacht. Die DNA Konzentration wurde im Photometer bestimmt. Für die radioaktive Markierung der Sonde wurden 250ng annealte Oligonukleotide mit 2µl Puffer A (T4 Kinase Kit), 1µl T4 Polynucleotid Kinase und 2,5µl [γ - ^{32}P]dATP (25 µCi) ad 20µl für 30' im 37°C Wasserbad inkubiert, 10' im 70°C Wasserbad und schließlich mit 30µl Aqua dest aufgefüllt. Eine G-50 Microspin Column wurde durch kurzes Schütteln und 1' Abzentrifugieren bei 3000rpm und RT vorbereitet. Nach Auftragen des Sondenansatzes wurde erneut 2' bei 3000rpm zentrifugiert und 1µl des Eluats in 3ml Szintillationsflüssigkeit im Scintillationszähler für 1' auf ^{32}P -Aktivität (β -Counter) vermessen. Die Sondenlösung wurde auf 100000 counts/µl mit Wasser eingestellt.

Für den Gellauf wurde ein 16 x 20cm Polyacrylamidgel (31,6mg/ml Glycerol, 1 x TBE, 4% Polyacrylamid, 0,075% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0,083% TEMED) unterstützt durch GelBond PAG Film hergestellt. 5-15µg Kernproteinextrakte aus Mesagiumzellen wurden mit 4µl 5 x Shift Puffer (18mM Hepes (pH 7,9), 200nM EDTA, 100nM EGTA, 40nM NaCl, 200nM DTT, 100nM PMSF), 2µl Poly dIdC (1µg/µl) ad 18µl angesetzt, 1µl Sonde zugegeben und 30' bei RT inkubiert. Proben wurden nach Zusatz von 1µl Loading Dye (50% Glycerol, 100mM EDTA, 0,05% Xylencyanol FF, 0,05% Bromphenolblau) auf das Gel (30' bei 200V vorgelaufen) aufgetragen und 30' bei 200V, ca. 2,5h bei 250V laufen gelassen. Das Gel wurde üN luftgetrocknet und anschließend für 24-48h auf Super RX Film exponiert.

E.2.12 Supershift EMSA

Zur Identifizierung von Bindungsproteinen, die im EMSA eine retardierte Bande ergeben, kann der EMSA modifiziert werden. Hierzu wurden dem üblichen Ansatz (E.2.11) nach der 30-minütigen Inkubation bei RT 2µl Antikörper gegen das gesuchte Protein (2µg/µl) zugesetzt und alles üN bei 4°C inkubiert. Gellauf und Detektion erfolgten danach wie beschrieben.

E.2.13 Statistik

E.2.13.1 Luciferase Assays

Die Angabe der Messwerte erfolgte als relative Luciferase Aktivität, d.h. als Quotient aus absoluter Luciferase Aktivität und β -Galaktosidase Aktivität (Interner Standard). Als statistische Größe wurde der arithmetische Mittelwert und dessen Standardabweichung (SD) verwendet. Statistische Signifikanz wurde bei paarweisen Vergleichen mit dem Student t-Test berechnet, bei Mehrfachvergleichen durch einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde bei $p < 0,05$ (*) als statistisch signifikant betrachtet.

E.2.13.2 DNA-Screening

Die Statistischen Auswertungen für das DNA-Screening wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Michael Bubenheim, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie, UKE, durchgeführt.

E.2.13.2.1 Berechnung der Macht des Screenings (Poweranalyse)

Für die Berechnung der Macht des DNA-Screenings wurde von einer eingangs begrenzten Anzahl an Blutspender Kontrollen von 510 ausgegangen. Probanden und Kontrollen wurden nach Alter und Geschlecht stratifiziert. Für den Fehler 1. Art wurde 0,05 angenommen und der χ^2 -Test auf Homogenität als Globaltest herangezogen. Da es sich um eine explorative Studie handelte und in Anbetracht der Begrenztheit der zu Verfügung stehenden Blutspender, wurde auch bei den Vergleichen der zehn verschiedenen Ergebnis Möglichkeiten lokal ein Fehler 1. Art von 0,05 vorgegeben. Die Macht des Screenings für verschiedene Risikoerhöhungen wurde dann berechnet, ausgehend von insgesamt 510 Blutspendern und zusammen 510 Patienten und den Ergebnissen einer Vorstudie, bei der 26 Blutspender, 10 Patienten mit MCGN und 26 Patienten mit FSGS hinsichtlich ihrer genetischen

Verteilung untersucht wurden. Bei Vorgabe einer Macht von 0,80 lag das kleinste in der Hauptstudie nachweisbare Odds Ratio bezüglich der FSGS bei 2,8, bei Vorgabe einer Macht von 0,50 bei 2,1. Mit Bezug zur MCGN lag bei Vorgabe einer Macht von 0,80 das kleinste in der Hauptstudie nachweisbare Odds Ratio bei 2,3, bei einer Macht von 0,5 bei 1,8. Als statistisch signifikant wurden Odds-Ratios in der Endauswertung betrachtet, deren 95%iges Konfidenzintervall die 1 ausschloss.

E.2.13.2.2 Berechnung des Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (aus der Populationsgenetik) stellt einen Zusammenhang zwischen der Allelfrequenz eines SNPs und der erwarteten Verteilung der Genotypen dar. Sind die Genotypen im Disäquilibrium, kann dies ein Hinweis für einen Selektionsdruck durch eines der Allele anzeigen. Für die Berechnung wurden die Häufigkeit der beiden SNP-Allele ausgezählt und daraus die Allelfrequenz als Quotient aus Häufigkeit und Anzahl der Gesamtallele berechnet. Danach wurde die erwartete Genotypenverteilung AA:Aa:aa mit $p^2:2pq:q^2$ aus der Gleichung $p^2+2pq+q^2 = 1$ errechnet, wobei für die Allelfrequenzen gilt: $p+q = 1$. Mit dem Pearson's χ^2 -Test wurde verglichen, ob signifikante Unterschiede zwischen der tatsächlich beobachteten Verteilung der Genotypen und der nach dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium errechneten vorliegen.

F - Ergebnisse

F.1. Identifizierung von cis-regulatorischen Elementen und funktionellen SNPs im MT1-MMP Promotor des Menschen

F.1.1 Datenbank Screening für SNPs und Transkriptionsfaktor Bindungsstellen

Zur Charakterisierung von Struktur und Funktion der humanen 5' Regulationsregion der Matrixmetalloproteinase MT1-MMP wurde zunächst geprüft, ob sich bekannte genomische SNP Daten mit potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren überschneiden. Hierzu wurden 1,3kb des Promotors in zwei verschiedenen Datenbanken auf SNPs abgefragt, die Ensemble Datenbank und NIH dbSNP. Dieser Abschnitt von 1,3kb entspricht absolut dem Bereich von 22374566 bis 22375867 auf Chromosom 14, q11-q12. Gemeinsam führen beide Datenbanken 9 SNP Einträge in diesem Bereich (Tabelle 1; Sequenz der 5' Regulationsregion im Anhang).

Relative Position 5' des Translationsstartes des MT1-MMP Gens	Absolute Position auf Chromosom 14	SNP ID	Genetische Variation
-271	22375596	rs 4441188	G/A
-364	22375503	rs 1003349	G/T
-378	22375489	rs 1004030	T/C
-385/386	22375482	rs 11408867	T/-
-526	22375341	rs10132595	A/G
-556	22375311	rs17880956	G/A
-723	22375143	rs17123036	G/A
-1103	22374763	rs17884825	C/T
-1197	22374669	rs17882351	T/C

Tabelle 1: Ergebnisse der Datenbank Abfragen aus Ensemble und NIH dbSNP bezüglich eines 1,3kb langen Abschnittes 5' des Translationsstartes des MT1-MMP Gens.

Parallel dazu wurde der genannte DNA-Abschnitt in der Datenbank TESS auf mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren geprüft und beide Recherchen

miteinander verglichen. Diese Abfrage ergab 315 rechnerisch vorausgesagte Bindungsstellen. Um relevante Beziehungen zwischen SNPs und potentiell funktionellen Bindungsstellen einzugrenzen, wurde eine Charakterisierung der 1,3kb des 5' Regulationsbereiches in Luciferase Assays angeschlossen.

F.1.2 Charakterisierung der Transkriptionsregulation des MT1-MMP Gens mittels Luciferase Assay

Fragmente unterschiedlicher Länge der 5' Regulationsregion des MT1-MMP Gens wurden in den promotorlosen Luciferasevektor pGL3 Basic kloniert, in Ratten Mesangiumzellen transfiziert und ihre Aktivität gemessen (Abbildung 3).

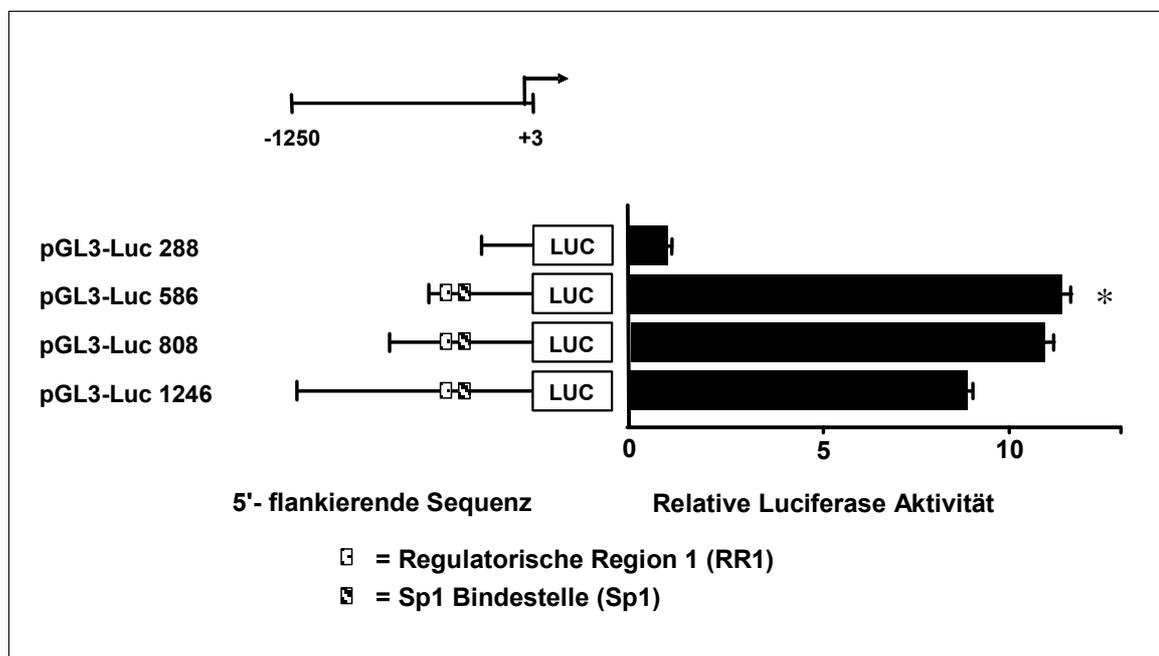


Abbildung 3: Relative Aktivität von Fragmenten des MT1-MMP Promotors unterschiedlicher Länge im Luciferase Assay. Die dargestellten Daten, als Mittelwert \pm SD, stehen stellvertretend für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Parallelproben ($n = 3$); * $p < 0,05$.

Grundlegende Promotoraktivität fand sich bis zu 288bp 5' des Translationsstarts, wobei zwischen -202bp und -288bp etwa eine Verdopplung der Aktivität zu verzeichnen war (ohne Abbildung). Mit dem Konstrukt pGL3-Luc 586 zeigte sich danach ein 12-facher Anstieg der Luciferase Aktivität im Vergleich zu Konstrukt pGL3-Luc 288. Somit liegen funktionell relevante Enhancer Elemente für den

Promotor zwischen Position -288 und -586, 5' des Translationsstartes, innerhalb eines Abschnitts von 298 Basenpaaren. In diesem Bereich der 5' Regulationsregion des humanen MT1-MMP Gens liegt eine Sp1 Bindungsstelle, welche von Lohi et al. in humanen Fibrosarcomzellen als regulatorisch bedeutsam beschrieben wurde (-101bp bis -92bp; Lohi et al. 2000). Sie wurde ebenso im murinen Promotor als funktionell nachgewiesen (-288bp bis -276bp; Alfonso-Jaume et al. 2004). Letztere Arbeit beschreibt darüber hinaus eine weitere „noncanonical“ Sp1 Bindungsstelle weiter 3' (-259bp bis -247bp) und eine NFAT Bindungsstelle (-392bp bis -312bp), die in der humanen 5' Regulationsregion stark konserviert ist und hier als Regulatorische Region 1 bezeichnet wurde. Der genannte 298bp lange DNA-Abschnitt enthielt die SNPs -271 G/A, -364 G/T und -378 T/C, welche als SNP Kandidaten mit potentiell funktioneller Bedeutung weiter untersucht wurden.

F.1.3 Einfluss der SNPs -378 T/C und -364 G/T auf die Transkriptionsregulation

Aufgrund der oben genannten SNPs -378 T/C und -364 G/T ergaben sich im Zusammenhang mit der RR1 die in Abbildung 4A beschriebenen Haplotypen. Diese trugen bei -378bp ein Cytosin (Mutante 1, M1), bei -364bp ein Thymin (Mutante 2, M2) und beide Mutationen in der Doppelmutter (Mutante 3, M3). Luciferase Experimente mit Konstrukt pGL3-Luc 586 mit den jeweiligen mutierten Varianten wiesen folgendes Ergebnis auf (Abbildung 4B): Konstrukt pGL3-Luc 344 zeigte, dass ein 5,5-facher Anstieg im Vergleich zu pGL3-Luc 288 allein durch die vorausgesagte Sp1 Stelle bedingt ist. Der RR1 Wildtyp (pGL3-Luc 586 Wt) hob die Luciferase Aktivität nochmals um den Faktor 2,2 zusätzlich zum Konstrukt pGL3-Luc 344 an. Konstrukt pGL3-Luc 586 M1 führte zu einer signifikanten Inhibition dieser Aktivität. Die Konstrukte pGL3-Luc 586 M2 und pGL3-Luc 586 M3 zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Signalstärke verglichen mit dem Wildtyp.

Im nächsten Schritt wurden Luciferase Konstrukte generiert, welche, unabhängig von den SNPs, durch Mutationen zu einem Verlust der Sp1 bzw. RR1 Bindungstellen führten (negativer Gelshift, ohne Abbildung).

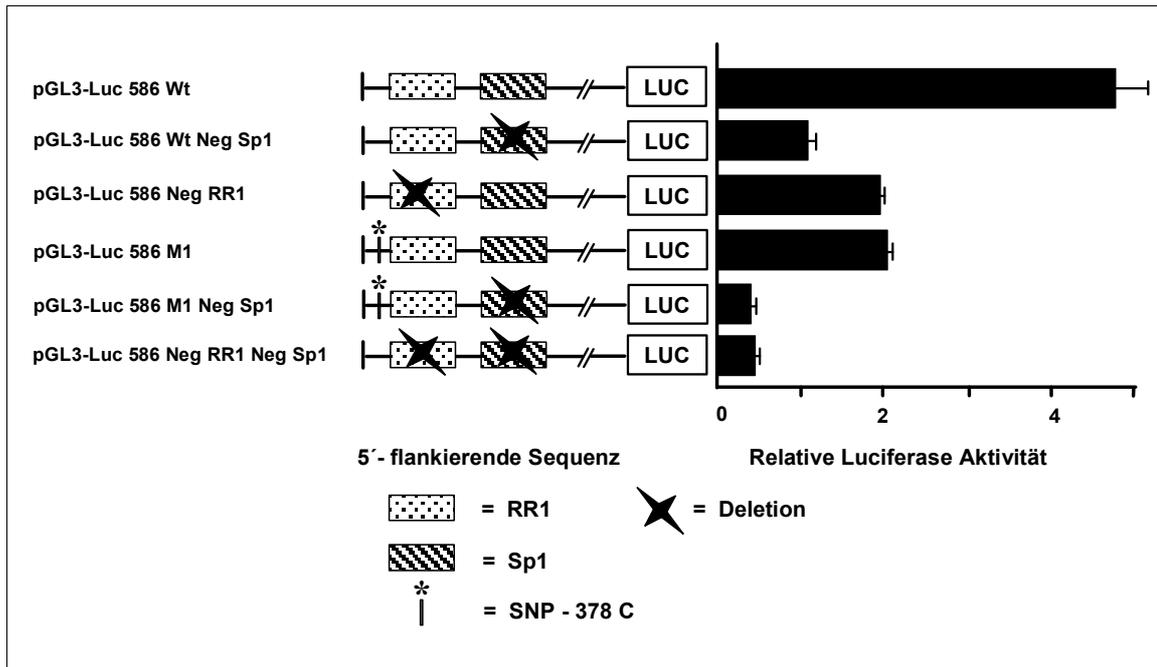


Abbildung 5: Luciferase Assay in Ratten Mesangiumzellen zur Untersuchung verschiedener Negativmutanten beider Enhancerbereiche. Die dargestellten Daten, als Mittelwert +/- SD, stehen stellvertretend für 3 unabhängige Experimente mit jeweils 3 Parallelproben (n = 3); * p < 0,05.

Abbildung 5 zeigt die Aktivität dieser Konstrukte im Luciferase Assay. Die Zerstörung der Sp1 Bindungsstelle (pGL3-Luc 586 Wt Neg Sp1) führte zu einer Reduktion der Luciferaseaktivität um etwa 75%, die der RR1 (pGL3-Luc 586 Neg RR1) um etwa 50%. Wurde mit Konstrukt pGL3-Luc 586 M1 die SNP Variante -378 C eingeführt, während beide Enhancer Bindungsstellen intakt blieben, glich die verbleibende Aktivität dem Konstrukt mit deletierter RR1 Stelle (pGL3-Luc 586 Neg RR1). Wurde zusätzlich die Sp1 Bindungsstelle mutiert (pGL3-Luc 586 M1 Neg Sp1), fiel die Signalstärke der Luciferase auf weniger als 10% der ursprünglichen Wildtyp Aktivität. Dieses Niveau entsprach dem eines Konstruktes, in dem beide Bindungsstellen deletiert waren (pGL3-Luc 586 Neg RR1 Neg Sp1).

F.1.4 EMSA der Bindungsstellen RR1 und Sp1

Der EMSA mit nukleären Proteinen von MZ (Abbildung 6) zeigte mit dem Wildtyp Oligonukleotid (Wt) eine deutlich retardierte Bande (langer Pfeil, Spur 2) und eine weniger prominente zweite retardierte Bande (kurzer Pfeil; Spur 2) verglichen mit dem freien Oligonukleotid ohne Protein (Spur 1). Mit Oligonukleotid M1, das SNP -378 C enthält, kam es zu einer starken Reduktion der Proteinbindung, die mit einer fast vollständigen Auslöschung der oberen Bande (kurzer Pfeil, Spur 4) und einer deutlichen Abschwächung der unteren Bande (langer Pfeil, Spur 4) einherging. SNP -364 T in M2 zeigte ein nahezu unverändertes Bindungsverhalten. M3 bewirkte eine Reduktion der Intensität der oberen Bande (kurzer Pfeil, Spur 8), während die untere nahezu unverändert gegenüber dem Wt blieb.

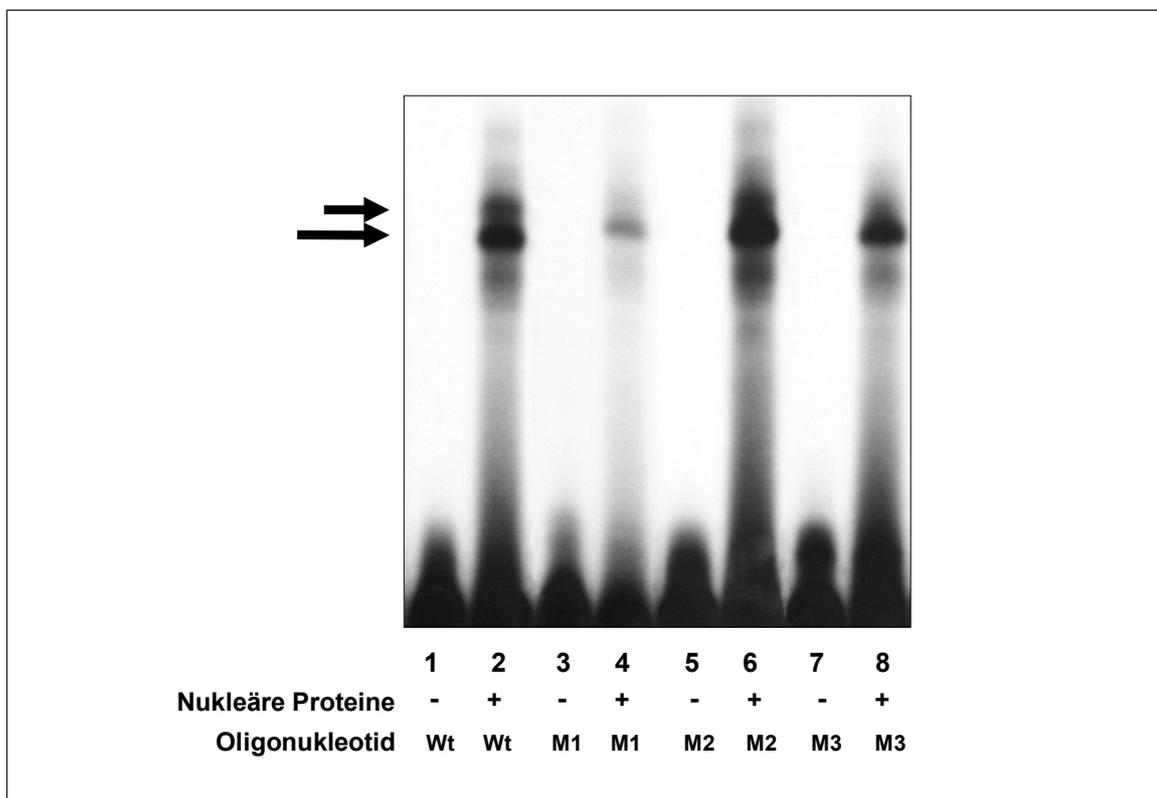


Abbildung 6: EMSA zum Vergleich der Bindungsfähigkeit von Oligonukleotid Sonden für nukleäre Proteine aus Ratten Mesangiumzellen unter Einfluss der SNP Mutanten (M1 bis M3) an die RR1.

Die Spezifität der Proteinbindung wurde durch Kompetitions-EMSA mit unmarkiertem Oligonukleotid überprüft. In Abbildung 7 ist zu sehen, dass eine Menge von 500ng an unmarkiertem Oligonukleotid ausreichte, um das Signal der Wildtyp Sonde für die RR1 komplett zu verdrängen (Spur 3). Die unspezifische Sonde in Spur 6 dagegen konnte das Signal nicht unterdrücken. Die gleiche Spezifität wurde bei den Mutanten beobachtet (ohne Abbildung).

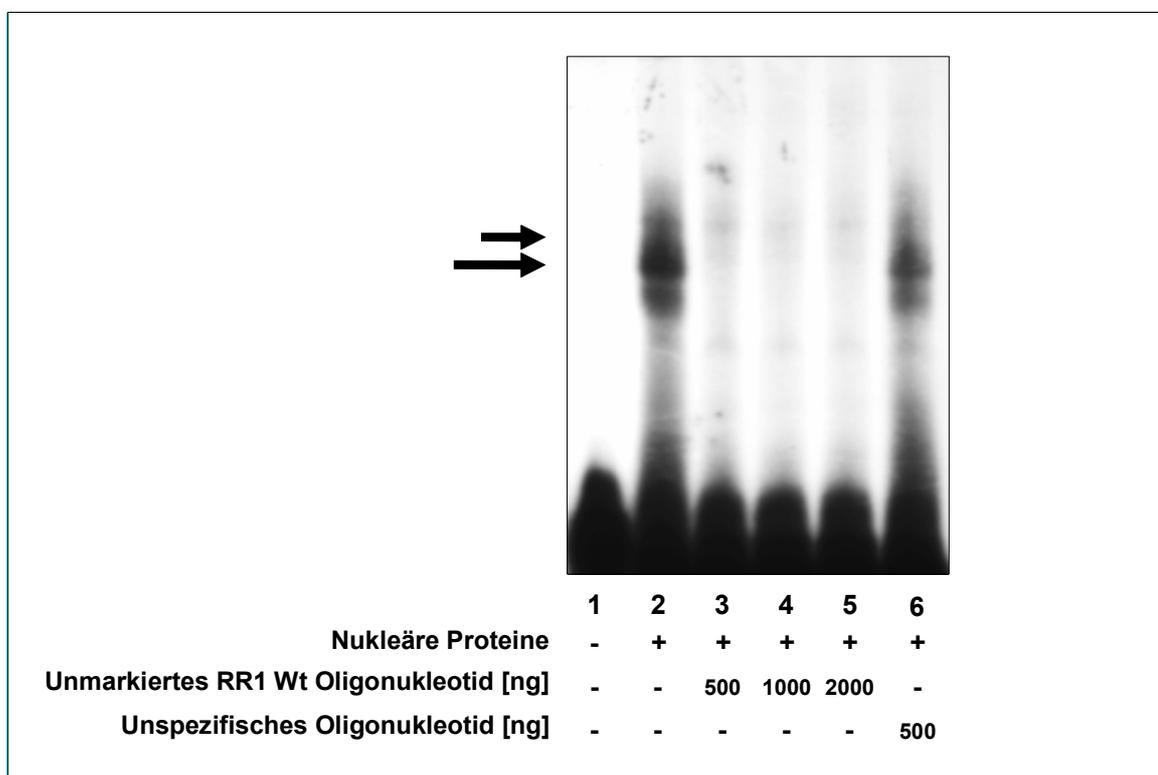


Abbildung 7: Spezifität des Bindungssignals der RR1 Wildtyp Sonde im EMSA mit nukleären Proteinen von MZ (Spur 2) durch Verdrängung mit unmarkiertem, spezifischem (Spuren 3-5) und unspezifischem Oligonukleotid (Spur 6).

Abbildung 8 zeigt, dass die Sp1 Bindungsstelle ebenfalls Kernprotein aus Mesangiumzellen bindet und dieses Signal spezifisch ist.

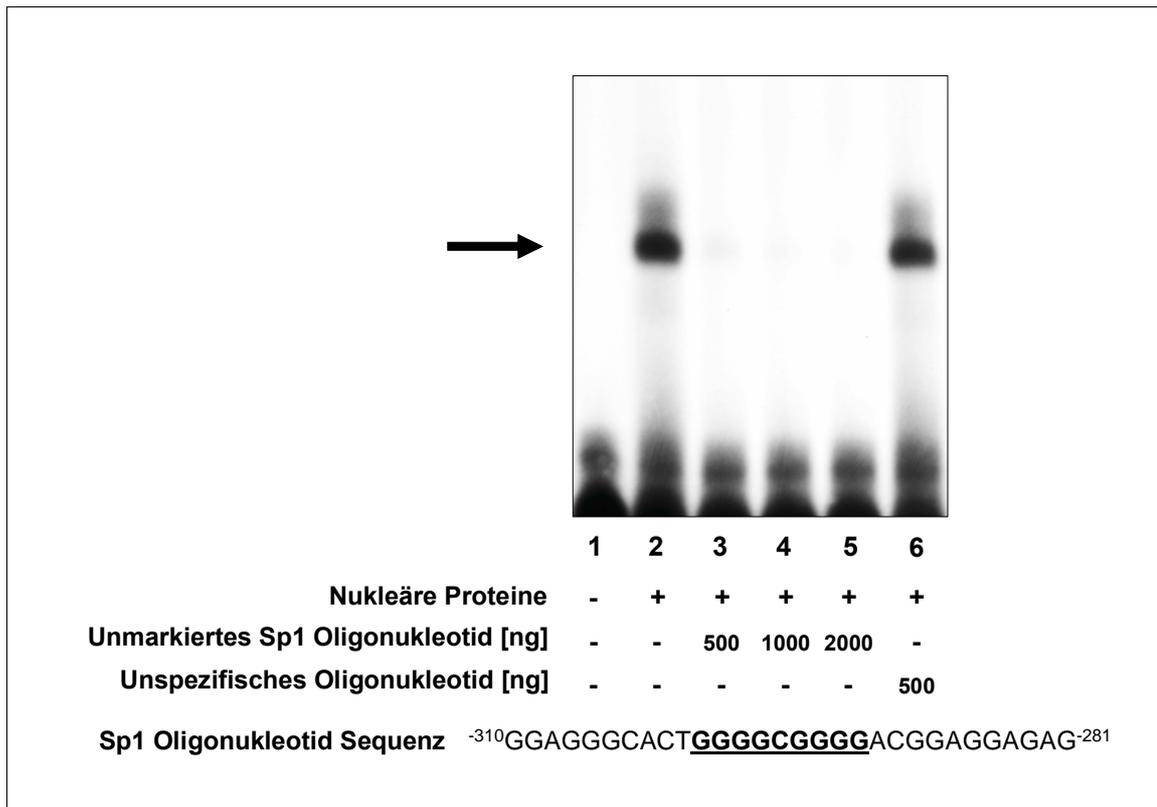


Abbildung 8: Spezifität des Bindungssignals der Sp1 Sonde im EMSA mit nukleären Proteinen von MZ (Spur 2) durch Verdrängung mit unmarkiertem, spezifischem (Spuren 3-5) und unspezifischem Oligonukleotid (Spur 6).

F.1.5 Nachweis von spezifischen Bindungsproteinen an die RR1

Als potentielle Bindungsfaktoren wurden für die RR1 per Computeranalyse unter Anderem identifiziert: Elf-1, E1AF/PEA3 und NFATc1. E1AF ist das humane Homolog des Maus Transkriptionsfaktors PEA3 (Higashino et al. 1993). Abbildung 9 zeigt eine Supershiftanalyse mit Antikörpern gegen diese drei Proteine. Dabei trat mit den Antikörpern gegen Elf-1 (Spur 4, Pfeil 4) und E1AF/PEA3 (Spur 5, Pfeil 3) ein Supershift auf, nicht jedoch mit Antikörpern gegen NFAT (Spur 3) oder ein unspezifisches Protein (p65 NFkappa B; Spur 6), für das keine DNA-Bindung in der

Datenbank TESS an der RR1 beschrieben wurde. Das Supershift Signal wies ebenso wie das Grundsignal (Spur 2) eine Doppelbande auf (Pfeile 1 und 2), was auf das Vorliegen von Proteinen in Proteinkomplexen hinweisen könnte.

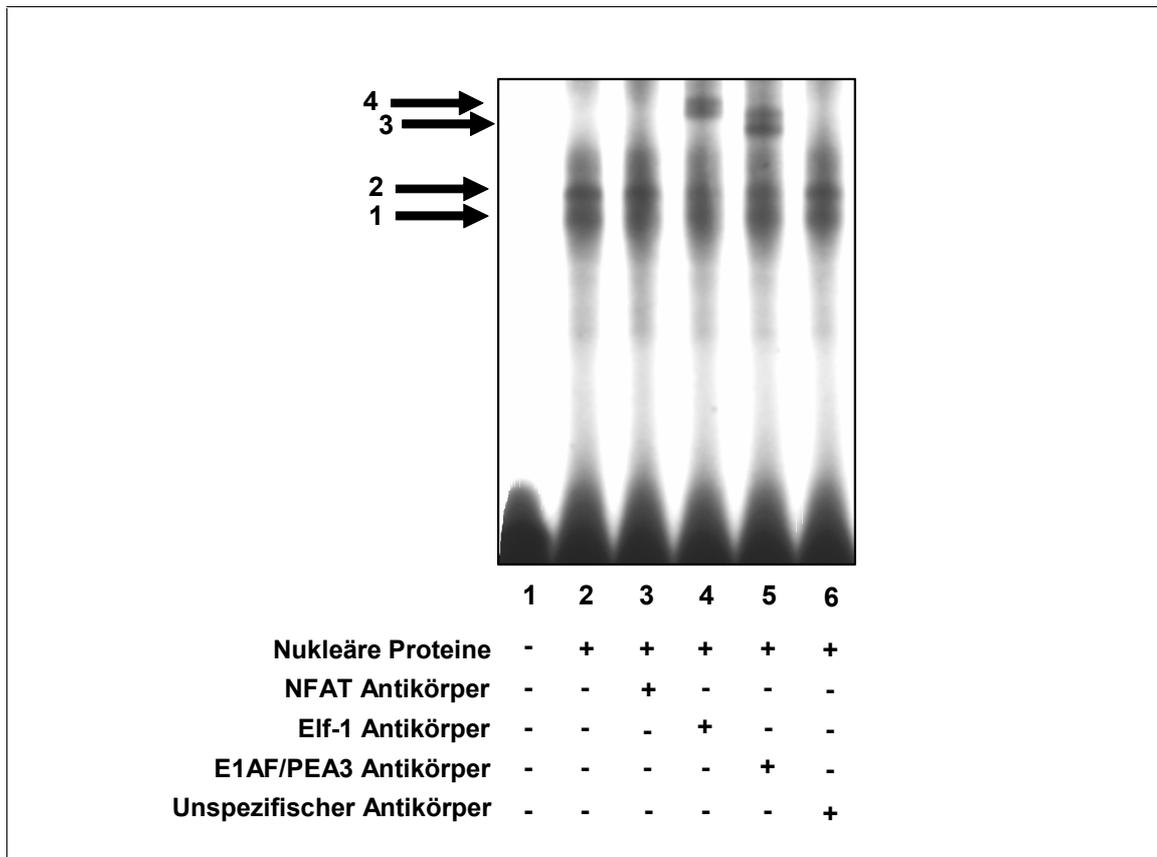


Abbildung 9: Supershift EMSA der RR1 mit Wildtyp Sonde und Antikörpern gegen die Transkriptionsfaktoren NFAT (K-18, Spur 3), Elf-1 (Spur 4), E1AF/PEA3 (Spur 5) und ein unspezifisches Protein, NFkappa B (Spur 6).

Wird im Supershift EMSA mit den gleichen Antikörpern eine M1 Sonde eingesetzt, beobachtet man ein Shift-Muster wie beim Wildtyp. Allerdings wird auch hier die Abschwächung der Bindung durch den SNP -378 C in der verminderten Signalstärke deutlich (ohne Abbildung). Gleiche Experimente mit den Mutanten M2 und M3 bestätigen diese Beobachtungen (ohne Abbildung), analog zum Basisversuch in Abbildung 6.

Eine Bindung des Transkriptionsfaktors NFATc1 an die RR1 konnte weder mit dem von Lovett et al. (Alfonso-Jaume et al. 2004) in Ratten MZ eingesetzten Antikörper 7A6 (ohne Abbildung), noch mit einem weiteren Antikörper, K-18 nachgewiesen werden (Abbildung 9, Spur 3).

F.2. DNA Screening von Patienten mit Minimal-Change-Glomerulonephritis und fokal-segmentaler Glomerulosklerose

F.2.1 Design des Patientenscreenings

Die DNA von Patienten mit MCGN und FSGS wurde auf ihre Diplotypen bezüglich der MT1-MMP SNPs -378 T/C und -364 G/T untersucht. Als Kontrollen wurde die DNA von gesunden Blutspendern und die DNA von Kindern, welche nephrologisch gesund waren, verwendet.

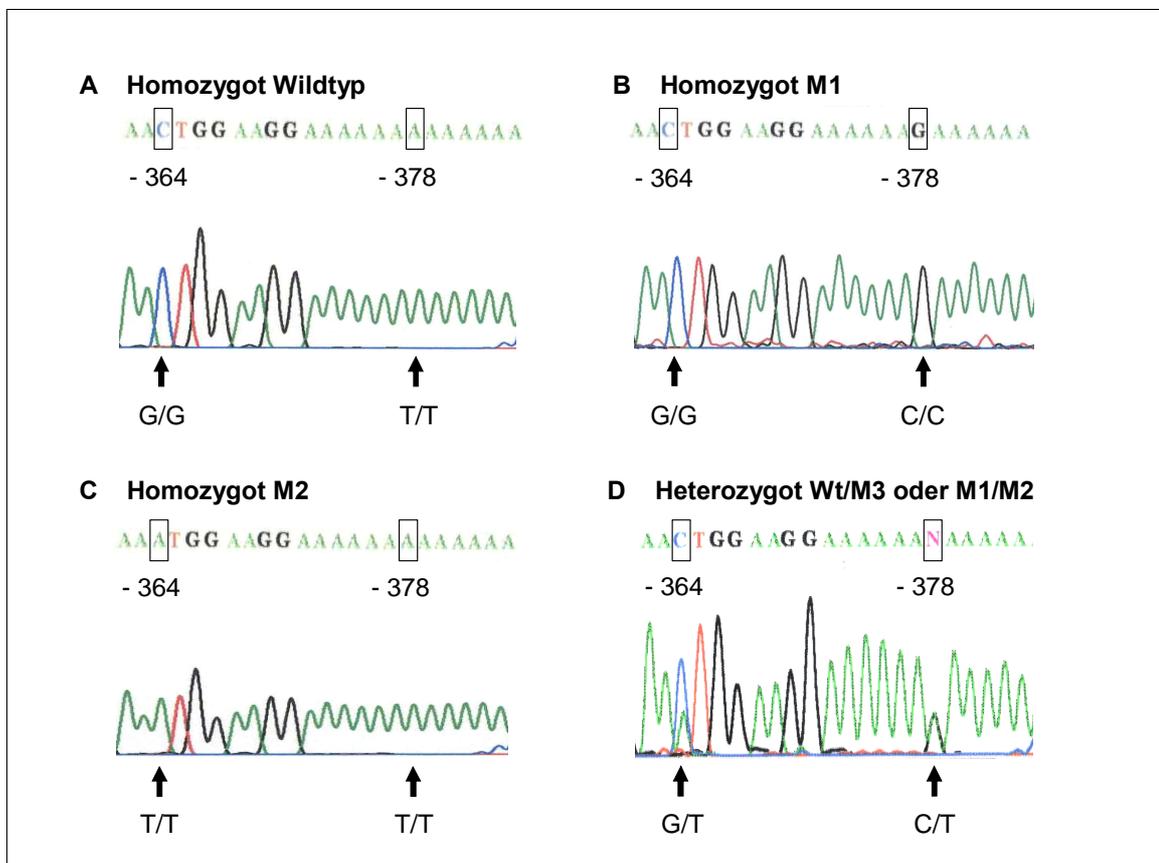


Abbildung 10: Beispiele verschiedener Sequenzierungsergebnisse (antisense): (A) homozygot Wildtyp, (B) homozygot M1, (C) homozygot M2 und (D) heterozygot Wt/M3 oder M1/M2 (uneindeutig). Unterhalb der Chromatogramme sind die Genotypen bzw. Diplotypen auf dem Sense-Strang beider Chromosome benannt.

Abbildung 10 zeigt typische Chromatogramme der antisense Sequenzierung verschiedener Diplotypen. War das Ergebnis uneindeutig, wie in 10D dargestellt,

wurde durch Klonierung und Sequenzierung eine Bestimmung der Haplotypen der beiden Chromosomenabschnitte durchgeführt, um den Diplotyp zu ermitteln.

Zunächst wurde eine Voruntersuchung mit 26 Blutspendern, 10 Patienten mit MCGN und 26 Patienten mit FSGS hinsichtlich der Verteilung ihrer Diplotypen durchgeführt (Tabelle 2). Basierend darauf wurde das Design für die Hauptuntersuchung angelegt. In die Patientengruppen wurden 189 MCGN Patienten zwischen 0 und 59 Jahren sowie 311 FSGS Patienten im Alter von 0-71 eingeschlossen. Diesen wurden 1:1, alters- und geschlechtsstratifiziert, 500 Kontrollen zugeordnet (Tabelle 3). Sowohl Patienten als auch Kontrollen waren kaukasischer Herkunft.

Kontrollen: n = 26				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	1	-	-	-
M1	7	10	-	-
M2	0	2	5	-
M3	0	1	0	0

MCGN Patienten: n = 10				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	7	-	-	-
M1	1	2	-	-
M2	1	3	3	-
M3	0	0	0	0

FSGS Patienten: n = 26				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	7	-	-	-
M1	3	5	-	-
M2	0	6	5	-
M3	0	0	0	0

Tabelle 2: Ergebnisse der Voruntersuchung zum DNA-Screening mit 26 Kontrollen, 10 MCGN und 26 FSGS Patienten.

MCGN									
Alter	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70+	Summe
männlich	8	11	18	34	21	18	0	0	110
weiblich	3	7	18	25	21	5	0	0	79
Probanden gesamt:									189
FSGS									
Alter	0-9	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70+	Summe
männlich	7	11	35	48	36	39	17	1	194
weiblich	4	9	18	27	22	22	15	0	117
Probanden gesamt:									311

Tabelle 3: Gruppenaufteilung von männlichen und weiblichen Patienten gemäß Erkrankung und Alter in der Hauptuntersuchung.

F.2.2 Genotypen- und Allelfrequenz der SNPs -378 T/C und -364 G/T und Hardy-Weinberg Verteilung

Zunächst wurde die Verteilung der Genotypen und Allele der MT1-MMP SNPs -378 T/C und -364 G/T in der Screening Population untersucht (Tabelle 4). Es konnten hier keine Unterschiede zwischen den Screening Gruppen festgestellt werden. Auf Allel Ebene betrachtet entsprechen -378 T und -364 G dem Wildtyp, da diese Allele in der Kontrollgruppe - wie auch im gesamten Kollektiv - am häufigsten auftraten (Allelfrequenz 0,557 bzw. 0,547). Die Allele für die Mutanten -378 C und -364 T traten mit einer Frequenz von minimal 0,432 bzw. 0,273 auf. Beide Punktmutationen kamen damit - im Verhältnis zur Grunddefinition eines SNPs, der in mindestens 1 % einer Population auftritt - sehr häufig vor.

In der Populationsgenetik stellt das Hardy-Weinberg Gleichgewicht einen Zusammenhang zwischen den Allelfrequenzen und der erwarteten Verteilung der Genotypen her. Die SNPs -378 T/C und -364 G/T befanden sich in der vorliegenden Population von 500 Kontrollpersonen, 311 FSGS und 189 MCGN Patienten im Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Dies konnte für die einzelnen Gruppen und damit auch für die Gesamtpopulation nachgewiesen werden.

Kontrollen gesamt

Genotyp	Anzahl	Genotypfrequenz	Allel	Allelfrequenz
-378	500		T C	0,557 0,443
TT	159	0,318		
TC	239	0,478		
CC	102	0,204		
-364	500		G T	0,666 0,334
GG	226	0,452		
GT	214	0,428		
TT	60	0,120		

MCGN Patienten

Genotyp	Anzahl	Genotypfrequenz	Allel	Allelfrequenz
-378	189		T C	0,524 0,476
TT	56	0,296		
TC	86	0,455		
CC	47	0,249		
-364	189		G T	0,698 0,302
GG	90	0,476		
GT	84	0,444		
TT	15	0,079		

FSGS Patienten

Genotyp	Anzahl	Genotypfrequenz	Allel	Allelfrequenz
-378	311		T C	0,560 0,432
TT	100	0,322		
TC	153	0,492		
CC	58	0,186		
-364	311		G T	0,727 0,273
GG	168	0,540		
GT	116	0,373		
TT	27	0,087		

Tabelle 4: Genotyp- und Allelfrequenzen der SNPs -378 T/C und -364 G/T in der MT1-MMP 5' Regulationsregion der Screening Teilnehmer.

F.2.3 Diplotypen Verteilung bei MCGN und FSGS Patienten

In Tabelle 5 sind die Screening Ergebnisse entsprechend der Diplotypen beider Patientengruppen denen der Kontrollen gegenüber gestellt. Wie in Tabelle 6 zu sehen konnte bei den MCGN Patienten für keinen der Diplotypen ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden ($\chi^2 = 8,56$; $p = 0,479$). Für die FSGS Patienten hingegen zeigten sich nach dem χ^2 -Test auf Homogenität statistisch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen ($\chi^2 = 17,06$; $p = 0,048$). Betrachtet man die Odds-Ratios, wiesen mehrere Diplotypen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Referenzgruppe der homozygoten Träger des Wildtyps (Wt/Wt) auf. Die Diplotypen Wt/M1, Wt/M2, M1/M1, M1/M2 und M2/M2 zeigten ein bis zu 70 % vermindertes Risiko für eine FSGS an. Die 95 % Konfidenzintervalle sind in Tabelle 7 dargestellt.

MCGN **Kontrollen:** n = 189

Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	12	-	-	-
M1	43	35	-	-
M2	20	45	26	-
M3	3	5	0	0

Patienten: n = 189

Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	8	-	-	-
M1	41	41	-	-
M2	33	44	15	-
M3	1	6	0	0

FSGS **Kontrollen:** n = 311

Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	16	-	-	-
M1	65	55	-	-
M2	54	82	31	-
M3	1	4	0	3

Patienten: n = 311

Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	38	-	-	-
M1	76	54	-	-
M2	38	74	24	-
M3	1	3	2	1

Tabelle 5: Verteilung der MT1-MMP Diplotypen bei MCGN und FSGS Patienten im Vergleich zu geschlechts- und altersstratifizierten Kontrollen.

MCGN				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	1,00	-	-	-
M1	1,43	1,76		
M2	2,48	1,47	0,87	
M3	0,50	1,80	n. def.	n. def.

FSGS				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	1,00	-	-	-
M1	0,49	0,41	-	-
M2	0,30	0,38	0,33	-
M3	0,42	0,32	n. def.	0,14

Tabelle 6: Odds Ratios für beide Patientengruppen im Vergleich zur Referenzgruppe der homozygoten Wildtyp Träger; statistisch signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind fett gedruckt.

MCGN				
$p = 0,479$				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	Referenzgruppe	-	-	-
M1	(0.53 ; 3.89)	(0.65 ; 4.79)		
M2	(0.86 ; 7.09)	(0.55 ; 3.93)	(0.29 ; 2.59)	
M3	(0.04 ; 5.70)	(0.41 ; 7.96)	n. def.	n. def.

FSGS				
$p = 0,048$				
Haplotyp 1 / Haplotyp 2	Wt	M1	M2	M3
Wt	Referenzgruppe	-	-	-
M1	(0.25 ; 0.96)	(0.21 ; 0.83)		
M2	(0.14 ; 0.61)	(0.20 ; 0.74)	(0.15 ; 0.72)	
M3	(0.02 ; 7.15)	(0.06 ; 1.57)	n. def.	(0.01 ; 1.45)

Tabelle 7: 95%ige Konfidenzintervalle für beide Patientengruppen; Intervalle der Ergebnisse mit statistisch signifikanten Unterschieden im Vergleich zu den Kontrollgruppen sind fett gedruckt.

G - Diskussion

Die Expression von Proteinen ist in eukaryotischen Organismen auf vielseitige Weise gesteuert. Selbst dort wo die Übereinstimmung an Genen 99 % beträgt, wie beim Vergleich von Maus und Mensch (Waterston et al. 2002), sind die Phänotypen sehr unterschiedlich. Auf Ebene der Transkription, also dem Vorgang des Ablesens von genetischer Information, finden die frühesten Regulationsmechanismen statt. Mit diesen kann ein Organismus steuern, in welcher Menge, in welchem zeitlichen Rahmen und in welchem Organ, ja sogar in welchen spezifischen Zellen die Bildung eines Genproduktes eingeleitet oder gestoppt bzw. hoch- oder runterreguliert werden soll.

Die Matrixmetalloproteinase MT1-MMP (MMP 14) ist ein wichtiges Enzym bei multiplen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, z. B. Wundheilung, Knochenentwicklung, Angiogenese, Entzündung, rheumatischer Arthritis, Arteriosklerose, Tumorinvasion und Metastasierung (Zucker et al. 2003). Sie spaltet wichtige Matrixbestandteile (Parks et al. 2004) und ist außerdem Hauptaktivator der MMP-2 (Kinoh et al. 1996; Ruangpanit et al. 2002; Holmbeck et al. 2004), die ihrerseits unter anderem bei Zellproliferation, Angiogenese, Arthritis, Wundheilung und Tumormetastasierung eine Rolle spielt (Crescimanno et al. 1996; Duffy et al. 2000; Wang et al. 2002). Im Tiermodell einer mesangioproliferativen GN findet eine Aktivierung von MT1-MMP und MMP-2 statt, wobei eine Hemmung der MMP-2 zur Minderung der Krankheitsausprägung führt (Hayashi et al. 1998; Steinmann-Niggli et al. 1998). Transkriptionelle Prozesse unterliegen im Krankheitsfall einer differenzierten Regulation. Um diese pathophysiologischen Veränderungen zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis erforderlich, welche Regulationsmechanismen ein Gen im gesunden Zustand beeinflussen. Die weitgehend konstitutive Enzymaktivierung der membranständigen MMPs (Pei and Weiss 1996) führt zu einem höheren Stellenwert früher stattfindender Regulationsmechanismen im Gesamtüberblick. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst 1,3kb der 5'

Regulationsregion des MT1-MMP Gens auf ihre Transkriptionsaktivität untersucht. Der in Mesangiumzellen regulatorisch relevante Bereich befindet sich innerhalb der 298 Basenpaare zwischen -288bp und -586bp 5' des Translationsstarts. In diesem Abschnitt wurden eine Sp1 Bindungsstelle und eine weitere regulatorische Region genauer untersucht. Beide zeigten im EMSA spezifische Bindung für Kernproteine. Die Sp1 Stelle wurde von Alfonso-Jaume et al. (Alfonso-Jaume et al. 2004) für das Maus Gen wie auch von Lohi et al. (Lohi et al. 2000) für das menschliche Gen in humanen Fibrosarcomzellen als funktionell nachgewiesen. Dieser Befund wurde durch die vorliegenden Daten aus Mesangiumzellen der Niere bestätigt und deutet darauf hin, dass es sich bei dieser Transkriptionsfaktor Bindungsstelle um ein allgemeines, cis-regulatorisches Element handelt, das organ- und zelltyp-unabhängig wirkt. Die für den 5' Regulationsbereich der Maus ebenso als funktionell nachgewiesene „noncanonical“ Sp1 Site (Alfonso-Jaume et al. 2004) ist zwar im humanen MT1-MMP Promotor stark konserviert, in Mesangiumzellen jedoch nicht funktionell wirksam.

Über die Regulatorische Region 1 liegen bisher mit Bezug zum humanen Promotor keine Daten zur funktionellen Aktivität in der Literatur vor. Im Maus Gen wurde für diesen stark konservierten Bereich die Bindung und Aktivität des Transkriptionsfaktors NFATc1 gezeigt (Alfonso-Jaume et al. 2004). Der Name NFAT wird in der Literatur uneinheitlich verwendet: Mal wird von einem Proteinkomplex NFAT (Nirula et al. 1997), mal von einem Transkriptionsfaktor NFAT (Flanagan et al. 1991) auch mit verschiedenen Untereinheiten (Kao et al. 1994), gesprochen. Der Proteinkomplex NFAT enthält unter anderem das Protein Elf-1 als Untereinheit, welches zum Beispiel die Fähigkeit besitzt, an die NFATc1 Stelle im 5' regulatorischen Bereich des Interleukin 2 (IL-2) Gens zu binden (Thompson et al. 1992), die ursprünglich zur Definition einer NFAT Consensus Sequenz geführt hat, oder auch an eine NFATc1 Stelle in der 5' Regulationsregion des Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Wang et al. 1994). Grundlegend wird Elf-1 als eigenständiges Protein, ebenso wie der Transkriptionsfaktor

E1AF/PEA3, der Familie der Ets Proteine zugeordnet, der auch Faktoren wie Ets-1 und -2, Erg-1 bis -3 und PU.1 angehören (Thompson et al. 1992; Laudet et al. 1999). Sowohl Elf-1 als auch E1AF/PEA3 besitzen die Fähigkeit, an eine Consensus Sequenz zu binden, die als Ets Bindungsstelle bezeichnet wird und die Basen A/TTCC enthält (Wasylyk et al. 1993), was dem Kernbereich der RR1 entspricht. Die in dieser Arbeit durchgeführten EMSA Experimente zeigen, dass sowohl Elf-1 als auch E1AF/PEA3 Protein an die RR1 des humanen MT1-MMP Promotors binden. Da die EMSA Untersuchungen und auch die Supershift Experimente mit beiden Antikörpern retardierte Doppelbanden aufwiesen, lässt sich vermuten, dass es sich bei diesen um Proteinkomplexe aus den beiden nachgewiesenen Transkriptionsfaktor Proteinen und gegebenenfalls auch weiteren, bisher nicht nachgewiesenen, Proteinen handelt. Eine Regulation durch einen solchen Multiproteinkomplex ist beispielsweise für das Protein Involucrin vorgeschlagen. Dort interagieren die Faktoren Fra-1, JunD, JunB, Sp1, and P/CAF sowie die p300 Histon Acetyltransferase an einer AP-1 Regulationsstelle in der distalen Regulationsregion des Gens (Crish and Eckert 2007). Daneben kann die Besetzung der RR1 auch durch unterschiedliche Affinitäten der einzelnen Bindungspartner an die gemeinsame cis-regulatorische Sequenz bestimmt sein. Für die in der Maus homologe Sp1 Bindungsstelle des MT1-MMP Promotors wurden unterschiedliche Bindungsaffinitäten von Egr-1, Sp-1 und Sp-3 beschrieben, so dass deren Besetzung und letztlich funktionelle Wirkung jeweils vom vorliegenden Spektrum möglicher Bindungspartner im Zellkern abhängig ist (Alfonso-Jaume et al. 2004).

Für die von der Datenbank TESS definierte NFAT Bindungsstelle in der RR1, die auch in der Maus eine Rolle zu spielen scheint (Alfonso-Jaume et al. 2004), konnte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung verschiedener Antikörper keine Bindung nachgewiesen werden. Coexpressions Versuche mit einem Expressionsvektor konnten ebenfalls keine funktionelle Wirkung von NFATc1 auf die Regulation des humanen MT1-MMP Gens nachweisen. NFAT wird Calcium abhängig reguliert. Es wird mit Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration durch Calcineurin

dephosphoryliert und somit kerngängig. Stimulationsexperimente mit dem Calcium Ionophor Ionomycin, Phorbol 12-Myristat 13-acetat (PMA), dem physiologischen Calcium Aktivator Endothelin-1 sowie dem Inhibitor Cyclosporin A, die für diese Arbeit durchgeführt wurden, konnten keine Aktivität von NFAT belegen. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass die Regulation des humanen MT1-MMP Promotors insgesamt Calcium unabhängig gesteuert ist (Lohi and Keski-Oja 1995). EMSA Experimente, die mit Calcium stimulierten Kernproteinextrakten und den RR1 Sonden durchgeführt wurden, zeigten keinen Unterschied zu den EMSAs mit unstimulierten Proteinen, so dass gemäß dieser Daten NFAT bei der Regulation des humanen MT1-MMP Gens im Gegensatz zur Maus keine Rolle zu spielen scheint.

Ein Grund dafür, dass der in dieser Arbeit nachgewiesene RR1 Bindungspartner E1AF/PEA3 in der Maus nicht als Bindungsfaktor gefunden wurde, könnte sein, dass dieser in Nierenzellen der Maus nicht exprimiert wird (Xin et al. 1992), beim Menschen aber in fötalen und erwachsenen Nieren nachgewiesen wurde (Ishida et al. 2006). Eine Regulation des MT1-MMP Gens durch den Faktor E1AF/PEA3 wurde bisher außerdem schon in murinen Fibrosarcomzellen (Habelhah et al. 1999), humanen Osteosarcomzellen (Izumiyama et al. 2005) und Ovarcarcinomzellen (Cowden Dahl et al. 2007) gezeigt, seine Bindungsstelle im regulatorischen Bereich des Gens jedoch nicht im Detail identifiziert. Die RR1 könnte somit das entsprechende cis-regulatorische Element darstellen, welches als Bindungsstelle für die E1AF/PEA3 Aktivität auch in diesen Zelltypen agiert. Darüber hinaus aktiviert E1AF/PEA3 die Genexpression der Matrixmetalloproteinasen MMP-1, -3 und -9 (Gutman and Wasylyk 1990; Higashino et al. 1995) und auch in den Regulationsregionen der Gene für MMP-10 bis -13 wurden PEA3 Bindungsstellen gefunden (Chakraborti et al. 2003). Somit scheint E1AF/PEA3 ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die MMP Superfamilie und insbesondere für die MT1-MMP zu sein. Ein weiterer Faktor der Ets-Familie, PU.1, besitzt in der Transkriptionsregulation von CD68 eine Silencerfunktion (O'Reilly et al. 2003), die in derselben Weise auch für den Promotor der MMP-2, dem Hauptsubstrat der MT1-

MMP, in Mesangiumzellen nachgewiesen werden konnte (Harendza et al. 2000). Für PU.1 konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der TESS Datenbank zwar mehrere Bindungsstellen nachgewiesen, eine Funktionalität für das MT1-MMP Gen jedoch nicht bestätigt werden. Die Daten in dieser Arbeit zeigten allerdings, dass auch der Transkriptionsfaktor Elf-1 an die RR1 der humanen MT1-MMP bindet und vermutlich zur Enhancerfunktion beiträgt. Eine solche Aktivität von Elf-1 wird in der Literatur neben den Genen für IL-2 (Thompson et al. 1992) und GM-CSF (Wang et al. 1994) ebenso für die Gene der T Zell Antigen Rezeptor ζ -Kette (TCR ζ), für CD4 und CD68 beschrieben (Wurster et al. 1994; Rellahan et al. 1998; Sarafova and Siu 1999; O'Reilly et al. 2003).

Ein zweiter wesentlicher Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich damit, SNPs und deren potentiellen Einfluss in der 5' Regulationsregion des MT1-MMP Gens zu untersuchen. Flankierend zur RR1 liegen die SNPs -378 T/C und -364 G/T, wobei für -378 T/C eine funktionelle Bedeutung gezeigt werden konnte. Letzterer spielt für die Wirkung der RR1 eine entscheidende Rolle: Liegt er als Thymin (Wildtyp) vor, erhält die Sequenz eine ausgeprägte Enhancerfunktion. Ist er mit einem Cytosin (Mutante) besetzt, wird deutlich weniger Protein gebunden und es kommt zu einer signifikanten Reduktion der Promotoraktivität. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der SNP -378 T/C die Fähigkeit besitzt, die Bindungs- und damit Aktivierungsfähigkeit von trans-regulatorischen Faktoren zu beeinträchtigen, welche an die RR1 binden, auch wenn er nicht direkt im Kernbindungsbereich dieser Region liegt. Aufgrund der Inhibition der transkriptionellen Aktivität des Promotors durch die mutierte Form -378 C auf etwa 25 % der Aktivität des Wildtyps fällt diesem Polymorphismus im nicht-codierenden Bereich des Gens somit eine maßgebliche Rolle in der Gesamtregulation der MT1-MMP zu. Die Rolle des SNPs -364 G/T ist hingegen weniger deutlich quantifizierbar und statistisch nicht signifikant. Die erhobenen Daten schließen jedoch eine Funktion des Allels -364 T nicht aus, für die Bindung zusätzlicher Faktoren im Komplex verantwortlich zu sein. Ebenso könnte durch dieses Allel auch die Effizienz

der Bindung von Transkriptionsfaktoren im Bereich der RR1 beeinflusst sein, insbesondere auch kombiniert mit dem Vorliegen des Allels -378 C.

Die beiden SNPs -378 T/C und -364 G/T wurden in einem genetischen Screening hinsichtlich ihres Vorkommens in einem Patientenkollektiv mit entzündlichen Nierenerkrankungen untersucht. Die Verteilung der zehn möglichen Diplotypen, die sich aus der Kombination beider Polymorphismen -378 T/C und -364 G/T im diploiden Genom des Menschen ergeben, wurde in zwei Patientengruppen mit MCGN (n = 189), FSGS (n = 311) und gleich starken Kontrollgruppen untersucht. Für die MCGN war mit keinem Diplotyp ein signifikant erhöhtes oder verringertes Risiko feststellbar. Es konnte jedoch ein statistisch signifikant verringertes Risiko für eine FSGS bei solchen Patienten nachgewiesen werden, welche die mutierten Formen der SNPs -378 C und -364 T in mindestens einer Kopie (M1 oder M2) enthielten. Für den selten auftretenden Haplotyp der Doppelmutante M3 konnten in keiner der Diplotyp Varianten signifikante Unterschiede zu den Kontrollen erkannt werden. Dies ist möglicherweise auf sein seltenes Auftreten und die dadurch bedingten geringen Fallzahlen zurückzuführen, worauf auch das sehr breit gestreute 95%ige Konfidenzintervall hindeutet.

Betrachtet man anstelle der Diplotypen das alleinige Auftreten der mutierten Varianten der SNPs -378 C und -364 T im DNA Screening, fällt auf, dass sie mit Allelfrequenzen von 0,443 und 0,334 schon in der Kontrollpopulation sehr häufig vorkommen. Beide SNPs befinden sich in den untersuchten Screening Gruppen im Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Die Verteilung in der Kontrollgruppe für den SNP -364 G/T gleicht der anderer Studien, welche in der NIH dbSNP Datenbank verzeichnet sind und mit drei europäischen Populationen durchgeführt wurden. Interessanterweise weisen fünf Studien mit asiatischen Populationen eine Verschiebung in den Allelfrequenzen von G nach T auf und zwei südlich der Sahara lebende afrikanische Populationen einen umgekehrten Trend. Bis auf eine sind dabei alle Populationen trotzdem im Hardy-Weinberg-Äquilibrium. In einer Studie, welche Personen ohne Beachtung der ethnischen Herkunft (global) eingeschlossen

hatte, dominiert der Trend bei -364 von G nach T (Allelfrequenzen G: 0,512, T: 0,488). Hinsichtlich des SNPs -378 T/C liegt in der NIH dbSNP Datenbank nur eine Vergleichsstudie vor, die mit einer globalen Population durchgeführt wurde (Allelfrequenz T: 0,753, C: 0,247). Diese weist wie die globale SNP -364 G/T Studie eine deutlich andere Verteilung im Vergleich zu der in dieser Arbeit untersuchten kaukasischen Population auf. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Gruppen konnten, ungeachtet der Unterschiede in der Verteilung der Diplotypen zwischen Kontrollen und FSGS Patienten, keine Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Allele festgestellt werden. Durch die vorliegenden *in vitro* Experimente wurde jedoch deutlich, dass allein die Betrachtung nach den Haplotypen funktionell und damit auch für die Patientenbetrachtung von Bedeutung ist.

Im Bezug zur klinischen Diagnostik könnte die identifizierte Risikoreduktion für Patienten mit FSGS, welche nicht den Wildtyp aufweisen, eine diagnostische Entscheidungshilfe bieten. Bisweilen wird bei Patienten in der Nierenbiopsie eine MCGN diagnostiziert und die Patienten werden daraufhin mit Steroiden therapiert. Bleibt das Ansprechen der Therapie mit einer Besserung der großen Proteinurie nach einigen Wochen aus, könnte es sich um einen sogenannten „sampling error“ bei der Biopsie handeln. Solche Patienten werden daher in der Regel einer erneuten zusätzlichen Nierenbiopsie zugeführt, in der dann häufig eine FSGS histologisch aufgefunden wird. Besteht bei Patienten ein erhöhtes Risiko für eine zweite Nierenbiopsie oder eine anderweitige Kontraindikation, könnte eine genetische Bestimmung der MT1-MMP Diplotypen erfolgen. Liegt ein homozygoter Wildtyp vor, so bestünde nach den hier beschriebenen Daten ein höheres Risiko, dass tatsächlich eine FSGS vorliegt. Diese Hypothese soll in weiteren Untersuchungen getestet werden, bei denen das Ansprechen bzw. Nicht-Ansprechen auf eine Steroidtherapie bei Patienten mit MCGN mit deren entsprechenden Diplotypen korreliert wird.

Das Auftreten des homozygoten Wildtyps geht auf molekularer Ebene mit einer ausgeprägten Enhancerfunktion auf den MT1-MMP Promotor einher. Die

Hochregulation der MT1-MMP könnte demnach für die Entstehung oder Ausprägung einer FSGS von Bedeutung sein. Mit einer erhöhten Aktivität der MT1-MMP ist ebenso ein Anstieg der MMP-2 Aktivität in Mesangiumzellen verbunden (Hayashi et al. 1998). Diese führt in Zellkultur Untersuchungen zur sogenannten epithelial-mesenchymalen Transformation (EMT) der Zellen, einer Veränderung zu einem proliferativen, entzündlichen Phänotyp (Turck et al. 1996; Cheng and Lovett 2003). Eine weiterführende, prospektive Patienten-Studie könnte hier die Datenlage genauer abklären und weitere Erkenntnisse dazu erbringen, ob hinsichtlich andauernder entzündlicher Veränderungen in den Glomeruli durch die oben genannten Prozesse die Bezeichnung der Erkrankung als FSSGN nicht doch ein adäquaterer Terminus wäre als FSGS, was lediglich den Endzustand der Sklerose beschreibt.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Funktion der beiden SNPs abschließend zu klären. Hierzu könnten auch Genomweite Assoziations (GWA) Studien beitragen, welche das Zusammenspiel einer Vielzahl von SNPs im Bezug zu einer Erkrankung erfassen können (Dove 2007). Es ist anzunehmen, dass die Glomerulonephritiden zu der Art von komplexen Erkrankungen gehören, welche über die Wechselwirkung vieler Gene, so genannter Prädispositions- oder Anfälligkeits Gene beeinflusst werden. Die Hypothese, dass solche Erkrankungen mit einem differenzierten Muster von DNA Sequenzvarianten zusammenhängen, im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen, welche von einzelnen definierten Mutationen dominiert werden, wie z. B. die cystische Fibrose, ist mittlerweile in der Wissenschaft weitgehend anerkannt (Mackay 2001; Peltonen and McKusick 2001; Toma et al. 2002). Einzelne Prädispositions Gene senden dem entsprechend nur ein geringes Signal in der Gesamtheit des Erkrankungsmusters aus (Gura 2001), so dass eine genetische Assoziations-Studie, welche die SNPs -378 T/C und -364 G/T mit einschließt, in Bezug auf die Definition eines umfassenderen Risikoprofils für das Vorliegen einer FSGS zukunftsweisend erscheint.

H - Literaturverzeichnis

- Ailenberg M, Silverman M (1996) Cellular activation of mesangial gelatinase A by cytochalasin D is accompanied by enhanced mRNA expression of both gelatinase A and its membrane-associated gelatinase A activator (MT-MMP). *Biochem J* 313 (Pt 3): 879-884.
- Alfonso-Jaume MA, Mahimkar R, Lovett DH (2004) Co-operative interactions between NFAT (nuclear factor of activated T cells) c1 and the zinc finger transcription factors Sp1/Sp3 and Egr-1 regulate MT1-MMP (membrane type 1 matrix metalloproteinase) transcription by glomerular mesangial cells *Biochem J* 380(Pt 3): 735-747.
- Bahring S, Aydin A, Luft FC (2003) The study of gene polymorphisms. How complex is complex genetic disease? *Methods Mol Med* 86: 221-235.
- Bauters C, Lamblin N, Ennezat PV, Mycinski C, Tricot O et al. (2007) A prospective evaluation of left ventricular remodeling after inaugural anterior myocardial infarction as a function of gene polymorphisms in the renin-angiotensin-aldosterone, adrenergic, and metalloproteinase systems. *Am Heart J* 153(4): 641-648.
- Bruijn JA, Hogendoorn PC, Hoedemaeker PJ, Fleuren GJ (1988) The extracellular matrix in pathology. *J Lab Clin Med* 111(2): 140-149.
- Buraczynska M, Jozwiak L, Ksiazek P, Borowicz E, Mierzicki P (2007) Interleukin-6 gene polymorphism and faster progression to end-stage renal failure in chronic glomerulonephritis. *Transl Res* 150(2): 101-105.
- Carome MA, Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Yang CW et al. (1994) Assessment of 72-kilodalton gelatinase and TIMP-1 gene expression in normal and sclerotic murine glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 5(6): 1391-1399.
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253(1-2): 269-285.
- Cheng S, Lovett DH (2003) Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Pathol* 162(6): 1937-1949.

- Cowden Dahl KD, Zeineldin R, Hudson LG (2007) PEA3 Is Necessary for Optimal Epidermal Growth Factor Receptor-Stimulated Matrix Metalloproteinase Expression and Invasion of Ovarian Tumor Cells. *Mol Cancer Res*. 5(5):413-421
- Crescimanno C, Foidart JM, Noel A, Polette M, Maquoi E et al. (1996) Cloning of choriocarcinoma cells shows that invasion correlates with expression and activation of gelatinase A. *Exp Cell Res* 227(2): 240-251.
- Crish JF, Eckert RL (2007) Synergistic Activation of Human Involucrin Gene Expression by Fra-1 and p300-Evidence for the Presence of a Multiprotein Complex. *J Invest Dermatol*. Sep 20 [Epub ahead of print]
- Dove A (2007) Life Science Technologies from Morgan to Microarrays: Gene Mapping Hits the Big Time. *Science* 318(5849): 473-478.
- Duffy MJ, Maguire TM, Hill A, McDermott E, O'Higgins N (2000) Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2(4): 252-257.
- Ebihara I, Suzuki S, Nakamura T, Fukui M, Yaguchi Y et al. (1993) Extracellular matrix component mRNA expression in glomeruli in experimental focal glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 3(7): 1387-1397.
- Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR (1991) Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A *Nature* 352(6338): 803-807.
- Floege J, Johnson RJ, Gordon K, Iida H, Pritzl P et al. (1991) Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis. *Kidney Int* 40(3): 477-488.
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* 449(7164): 851-861.
- Grabensee B (2002) Checkliste Nephrologie. Stuttgart: Thieme.
- Gura T (2001) Genetics. Can SNPs deliver on susceptibility genes? *Science* 293(5530): 593-595.
- Gutman A, Wasylyk B (1990) The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J* 9(7): 2241-2246.

- Haas TL, Stitelman D, Davis SJ, Apte SS, Madri JA (1999) Egr-1 mediates extracellular matrix-driven transcription of membrane type 1 matrix metalloproteinase in endothelium. *J Biol Chem* 274(32): 22679-22685.
- Habelhah H, Okada F, Kobayashi M, Nakai K, Choi S et al. (1999) Increased E1AF expression in mouse fibrosarcoma promotes metastasis through induction of MT1-MMP expression. *Oncogene* 18(9): 1771-1776.
- Harendza S, Lovett DH, Stahl RA (2000) The hematopoietic transcription factor PU.1 represses gelatinase A transcription in glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 275(26): 19552-19559.
- Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kuhn P et al. (2003) Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. *J Biol Chem* 278(23): 20490-20499.
- Hayashi K, Osada S, Shofuda K, Horikoshi S, Shirato I et al. (1998) Enhanced expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase in mesangial proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 9(12): 2262-2271.
- Higashino F, Yoshida K, Fujinaga Y, Kamio K, Fujinaga K (1993) Isolation of a cDNA encoding the adenovirus E1A enhancer binding protein: a new human member of the ets oncogene family. *Nucleic Acids Res* 21(3): 547-553.
- Higashino F, Yoshida K, Noumi T, Seiki M, Fujinaga K (1995) Ets-related protein E1A-F can activate three different matrix metalloproteinase gene promoters. *Oncogene* 10(7): 1461-1463.
- Holmbeck K, Bianco P, Yamada S, Birkedal-Hansen H (2004) MT1-MMP: a tethered collagenase *J Cell Physiol* 200(1): 11-19.
- Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M et al. (1999) MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 99(1): 81-92.
- Hughes S, Agbaje O, Bowen RL, Holliday DL, Shaw JA et al. (2007) Matrix Metalloproteinase Single-Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes Predict Breast Cancer Progression. *Clin Cancer Res* 13(22): 6673-6680.
- Ishida S, Higashino F, Aoyagi M, Takahashi A, Suzuki T et al. (2006) Genomic structure and promoter activity of the E1AF gene, a member of the ETS oncogene family. *Biochem Biophys Res Commun* 339(1): 325-330.

- Izumiyama Y, Ohiro Y, Higashino F, Yoshida K, Taguchi K et al. (2005) E1AF expression is closely correlated with malignant phenotype of tongue squamous cell carcinoma through activation of MT1-MMP gene promoters. *Oncol Rep* 13(4): 715-720.
- Kao PN, Chen L, Brock G, Ng J, Kenny J et al. (1994) Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem* 269(32): 20691-20699.
- Kinoh H, Sato H, Tsunozuka Y, Takino T, Kawashima A et al. (1996) MT-MMP, the cell surface activator of proMMP-2 (pro-gelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis. *J Cell Sci* 109 (Pt 5): 953-959.
- Kitamura A, Hasegawa G, Obayashi H, Kamiuchi K, Ishii M et al. (2002) Interleukin-6 polymorphism (-634C/G) in the promoter region and the progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Diabet Med* 19(12): 1000-1005.
- Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I (1988) The progression of renal disease. *N Engl J Med* 318(25): 1657-1666.
- Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M (1999) Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 18(6): 1351-1359.
- Lohi J, Keski-Oja J (1995) Calcium ionophores decrease pericellular gelatinolytic activity via inhibition of 92-kDa gelatinase expression and decrease of 72-kDa gelatinase activation *J Biol Chem* 270(29): 17602-17609.
- Lohi J, Lehti K, Valtanen H, Parks WC, Keski-Oja J (2000) Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene *Gene* 242(1-2): 75-86.
- Mackay TF (2001) Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* 2(1): 11-20.
- Marti HP, McNeil L, Davies M, Martin J, Lovett DH (1993) Homology cloning of rat 72 kDa type IV collagenase: cytokine and second-messenger inducibility in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 291 (Pt 2): 441-446.
- Mayer G, Boileau G, Bendayan M (2003) Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1763-1773.
- Nakamura T, Ebihara I, Osada S, Takahashi T, Yamamoto M et al. (1993) Gene expression of metalloproteinases and their inhibitor in renal tissue of New Zealand black/white F1 mice. *Clin Sci (Lond)* 85(3): 295-301.

- Nirula A, Moore DJ, Gaynor RB (1997) Constitutive binding of the transcription factor interleukin-2 (IL-2) enhancer binding factor to the IL-2 promoter. *J Biol Chem* 272(12): 7736-7745.
- O'Reilly D, Quinn CM, El-Shanawany T, Gordon S, Greaves DR (2003) Multiple Ets factors and interferon regulatory factor-4 modulate CD68 expression in a cell type-specific manner. *J Biol Chem* 278(24): 21909-21919.
- Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 4(8): 617-629.
- Pei D (1999a) Leukolysin/MMP25/MT6-MMP: a novel matrix metalloproteinase specifically expressed in the leukocyte lineage. *Cell Res* 9(4): 291-303.
- Pei D (1999b) Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* 274(13): 8925-8932.
- Pei D, Weiss SJ (1996) Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity. *J Biol Chem* 271(15): 9135-9140.
- Peltonen L, McKusick VA (2001) Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science* 291(5507): 1224-1229.
- Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE (2005) Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 24(6): 1043-1052.
- Puente XS, Pendas AM, Llano E, Velasco G, Lopez-Otin C (1996) Molecular cloning of a novel membrane-type matrix metalloproteinase from a human breast carcinoma. *Cancer Res* 56(5): 944-949.
- Rellahan BL, Jensen JP, Howcroft TK, Singer DS, Bonvini E et al. (1998) Elf-1 regulates basal expression from the T cell antigen receptor zeta-chain gene promoter. *J Immunol* 160(6): 2794-2801.
- Ruangpanit N, Price JT, Holmbeck K, Birkedal-Hansen H, Guenzler V et al. (2002) MT1-MMP-dependent and -independent regulation of gelatinase A activation in long-term, ascorbate-treated fibroblast cultures: regulation by fibrillar collagen. *Exp Cell Res* 272(2): 109-118.
- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF et al. (1998) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter

- creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 58(23): 5321-5325.
- Saleem MA, Ni L, Witherden I, Tryggvason K, Ruotsalainen V et al. (2002) Co-localization of nephrin, podocin, and the actin cytoskeleton: evidence for a role in podocyte foot process formation. *Am J Pathol* 161(4): 1459-1466.
- Sarafova S, Siu G (1999) A potential role for Elf-1 in CD4 promoter function. *J Biol Chem* 274(23): 16126-16134.
- Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A et al. (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 370(6484): 61-65.
- Sato T, Kondo T, Fujisawa T, Seiki M, Ito A (1999) Furin-independent pathway of membrane type 1-matrix metalloproteinase activation in rabbit dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 274(52): 37280-37284.
- Schafer L, Lorenz T, Daemrlich J, Heidland A, Schaefer RM (1995) Role of proteinases in renal hypertrophy and matrix accumulation. *Nephrol Dial Transplant* 10(6): 801-807.
- Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C et al. (2001) Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108(11): 1621-1629.
- Siegenthaler W, Blum HE (2006) *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Thieme.
- Smoyer WE, Mundel P (1998) Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome. *J Mol Med* 76(3-4): 172-183.
- Steinmann-Niggli K, Ziswiler R, Kung M, Marti HP (1998) Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates anti-Thy1.1 nephritis. *J Am Soc Nephrol* 9(3): 397-407.
- Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M (1995) Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270(39): 23013-23020.
- The HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437(7063): 1299-1320.

- Thompson CB, Wang CY, Ho IC, Bohjanen PR, Petryniak B et al. (1992) cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel Ets-related protein, Elf-1. *Mol Cell Biol* 12(3): 1043-1053.
- Toma DP, White KP, Hirsch J, Greenspan RJ (2002) Identification of genes involved in *Drosophila melanogaster* geotaxis, a complex behavioral trait. *Nat Genet* 31(4): 349-353.
- Tryggvason K (1999) Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10(11): 2440-2445.
- Turck J, Pollock AS, Lee LK, Marti HP, Lovett DH (1996) Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) regulates glomerular mesangial cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* 271(25): 15074-15083.
- Wang CY, Bassuk AG, Boise LH, Thompson CB, Bravo R et al. (1994) Activation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. *Mol Cell Biol* 14(2): 1153-1159.
- Wang W, Schulze CJ, Suarez-Pinzon WL, Dyck JR, Sawicki G et al. (2002) Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. *Circulation* 106(12): 1543-1549.
- Ward RV, Atkinson SJ, Reynolds JJ, Murphy G (1994) Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochem J* 304 (Pt 1): 263-269.
- Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211(1-2): 7-18.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF et al. (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420(6915): 520-562.
- Will H, Hinzmann B (1995) cDNA sequence and mRNA tissue distribution of a novel human matrix metalloproteinase with a potential transmembrane segment. *Eur J Biochem* 231(3): 602-608.
- Wurster AL, Siu G, Leiden JM, Hedrick SM (1994) Elf-1 binds to a critical element in a second CD4 enhancer. *Mol Cell Biol* 14(10): 6452-6463.

- Xin JH, Cowie A, Lachance P, Hassell JA (1992) Molecular cloning and characterization of PEA3, a new member of the Ets oncogene family that is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Genes Dev* 6(3): 481-496.
- Yoon HJ, Shin JH, Yang SH, Chae DW, Kim H et al. (2003) Association of the CD14 gene -159C polymorphism with progression of IgA nephropathy. *J Med Genet* 40(2): 104-108.
- Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X (2001) A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter enhances lung cancer susceptibility. *Cancer Res* 61(21): 7825-7829.
- Zucker S, Pei D, Cao J, Lopez-Otin C (2003) Membrane type-matrix metalloproteinases (MT-MMP). *Curr Top Dev Biol* 54: 1-74.

I - Anhang

Humaner MT1-MMP Promotor

Referenz: >ref|NT_026437.11|Hs14_26604:4290000-4306000, Homo sapiens chromosome 14 genomic contig, Nummerierung rückwärts ab Translationsstart.

Zeichencodierung:

Vier potentielle Transkriptionsstartsites Translationsstart (atg)

Sp1 Bindungsstelle .noncanonical Sp1 Bindungsstelle RR1 SNPs

```
-1300 cctcctctatccttcctttgctttcttctcccttcctcctcgcactacctctgtcctc
-1240 tctcactggccaaatgcaattcttggatcttagatcttgcctgatagctagttttctgtc
-1180 tcccacacttttctgcttctgttgtgcttcttttccagacctgtctagttcccactca
-1120 tetgtctccctttctcagggtcagctttatcctgccctctcccttcctacataacctca
-1060 ccttttgttctgagtcagtaagtcctaaaggagattataactctttaagaattgcctc
-1000 ctttttcagtgtagaggtggaactaaacccagagtcaccaactccaatcccttctttta
-940 caataatttcacccaacttgatttgccttccccagatcccacggccttgtacccttttc
-880 ctcccagcgagttccaattaaagggtgcagccacattacaaatgacaataaaggaatcacc
-820 tttgtctttctacaaagggtggagccacagatccggatgggttgtgggggtttgttgttg
-760 tagttgggttatagtttgatttttagcagcagagggagggacatagacagttgtctac
-700 agggcccagaagataaacccctattagtaaactggccttctccctctgcaggtctcatg
-640 ggcatggaagaagaccccaccaccatcccacactctgagctcctcgttgcccctagccac
-580 atagccccaataattcccaccctgaggtgagacaaatgctgaataccagaggaatcaag
-520 cactcagaatatgcttatagggacaaagtctccacatcccgtcccctggatccccta
-460 cagccccctgctgtccatcgcggcctcaacccctgcagatggcagcctgcaccacaaaaa
-400 ggcaacttagaggtgtttttttttttttccctccagttcttgggttghtaatggattcag
-340 gctaaaacaaccacgtccccaaccaggaaaggagggcactggggcggggacggaggagag
-280 gctgtgggagaaggagggaccagaggagagagcgagagagggaaccagaccccagttcg
-220 ccgactaagcagaagaaagatcaaaaaccgaaaaagaggagaagagcaaacaggcacttt
-160 gaggaacaatcccctttaactccaagccgacagcgggtctaggaattcaagttcagtgct
-100 accgaagacaaaggcgcgccgagggagtgccgggtgcgaccccagggcgtgggcccggccg
-40 cggagcccacactgcccggctgaccgggtggtctcggaccatgctcccgcccacagacc
+21 ctcccgttgtctcctgctccccctgctcacgctcggcaccgcgctcgctcctcctcgctc
+81 ggcccaaagcagcagcttcagccccgaagtaagtgagcttcccggcccttcccg
```

J - Dank

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen Menschen in meinem Umfeld, die mich in den letzten drei Jahren unterstützt, aufgemuntert, konstruktiv kritisiert und zum Lachen gebracht haben. Alle haben so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Hervorheben möchte ich dabei einige persönlich.

Meine Doktormutter PD Dr. Sigrid Harendza ist mit unermüdlichem Engagement, Offenheit und Herz dabei gewesen. Ich habe mich von ihr in bester Weise betreut gefühlt.

Professor Dr. Rolf A.K. Stahl hat die Arbeit in seiner Klinik möglich gemacht und stets gefördert.

Bettina Steinbach hat mich im Labor unterstützt und war mir eine hilfsbereite, erfahrene Kollegin mit großem Wissensschatz für die Praxis.

Allen Kollegen aus dem Labor danke ich für die schöne Zeit und den Spaß, den wir gemeinsam hatten.

Mein tiefer Dank richtet sich an meinen Partner und meine Familie, deren Unterstützung mich immer und allgegenwärtig begleitet.

Danke!