

Yu Liang

Dr. med.

Zebrafish Models of Human Kidney Disease

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Franz Schaefer

ZUSAMMENFASSUNG

Der Zebrafisch (*Danio rerio*) ist ein einfaches, in vielerlei Hinsicht ideales Wirbeltiermodell zum Studieren der Nierenentwicklung und -funktion aufgrund folgender Eigenschaften: Die Tiere haben im Embryonalstadium einen durchsichtigen Körper, haben viele Nachkommen und beenden die Nephrogenese innerhalb von vier Tagen. Am wichtigsten ist die Tatsache, dass die beiden Pronephrone des Zebrafisches den menschlichen Nephronen strukturell und funktionell sehr ähnlich sind. Für die vorliegende Arbeit habe ich daher das Zebrafisch- Modell genutzt, um verschiedene Kandidatengene für humane Nierenerkrankungen zu untersuchen.

Das idiopathische nephrotische Syndrom ist die häufigste glomeruläre Erkrankung bei Kindern. Die Erkrankung wird durch Funktionsstörungen der Podozyten, Epithelzellen an den glomerulären Kapillaren, die die Filtrationsbarriere bilden, hervorgerufen. 10-15% der Fälle sind steroid-resistent (SRNS) und in bis zu 30% dieser Patienten finden sich Mutationen in Podozyten-spezifischen Genen, die zu einem hereditären, global pharmakoresistenten Krankheitsverlauf führen. Eines der identifizierten Gene ist die Proteintyrosinphosphatase Typ-O (PTPro), eine Rezeptor-Tyrosin-Phosphatase auf der apikalen Podozyten-Zelloberfläche. Ihre genaue Rolle beim SRNS ist jedoch noch unklar. Durch in situ Hybridisierung konnten wir erstmals die Expression von PTPro im Zebrafisch-Glomerulus 2,5 und 3,5 Tage nach Fertilisierung (dpf) zeigen. Die vorbeschriebene Expression dieses Gens im Gehirn konnten wir bestätigen. Mittels Morpholino-vermitteltem Gen-Silencing haben wir PTPro-Knockdown- Zebrafisch-Modelle generiert. Zwei PTPro-spezifische Knockdown-Morpholinos (MO) wurden untersucht. *PTPRO*^{-/-} MO verhindert die mRNA-Translation, während das PTPro-Splice- Morpholino (sMO)

mutierte mRNA produziert, die eine Deletion in Exon 19 verursacht, was zu einem vorzeitigen Stop-Kodon vergleichbar mit der in einer der betroffenen Familien identifizierten Splice-Mutation führt. Beide MO-Gruppen zeigten einen Phänotyp mit generalisierten Ödemen und Krümmung der Körperachse. Die histologische Analyse zeigte sowohl in sMO als auch in *PTPRO*^{-/-} MO zystische Erweiterungen der Tubuli. Nieren von sMO- Embryonen hatten außerdem vergrößerte glomeruläre Kapillarschleifen mit lichtmikroskopisch Dichte-verminderten glomerulären Zellen. In der Elektronenmikroskopie zeigte sich in beiden Morpholino-Nieren eine Auflösung der Podozyten-Fussfortsätze, während sMO-Morphant- Nieren zusätzliche Veränderungen an den Endothelzellen aufwiesen.

Des Weiteren untersuchten wir die Rolle von PTPro in der Nieren-Morphogenese durch Injizieren von sMO in Zebrafische der transgenen Linie *Tg(wt1b:EGFP)*, die fluoreszierendes WR1-Protein in der sich entwickelnden Niere exprimieren. In 2dpf und 3dpf Embryonen fanden wir in sMO-Morphants Nieren-Deformationen mit zystisch dilatierten proximalen prorenalen Tubuli und einem erweiterten prorenalen Tubulus-Winkel.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden Zebrafisch-Modelle verwendet, um die Nieren-Phänotypen von vier Kandidatengenen, die in einer genomweiten Assoziationsstudie betreffs CKD-Progression bei Kindern identifiziert wurden, zu untersuchen: *IGFBP3*, *TNS3*, *SQRDL* und *SEMA6D*. Wir kreierten jeweils zwei spezifische Morpholinos und injizierten diese in Ein-Zell-Stadium-Zebrafischembryos, um spezifische Knockdown-Modelle zu erhalten. In den *IGFBP3*-, *SQRDL*- und *SEMA6D*-Morphants zeigte sich kein Phänotyp. Ein *TNS3*-Morpholino induzierte allerdings Embryonen mit ausgeprägten Ödemen und verkrümmter Körperachse. Im bisher ersten *in situ*-Hybridisierungs-Experiment für *TNS3*-Expression im Zebrafisch konnten wir *TNS3* 12 Stunden bis 3 Tage nach Befruchtung in vielen Geweben nachweisen. Am Tag 3 wurde *TNS3* eindeutig im Gehirn, im Verdauungssystem, im Auge und den Glomeruli nachgewiesen. Studien in *Tg(wt1b:EGFP)*-Embryonen zeigten erhebliche Veränderungen der Nierenentwicklung in *TNS3*-Morphants. Am Tag 2 und 3 nach der Befruchtung zeigte sich die Fusion der beiden prorenalen

Glomeruli deutlich verzögert und der Tubuluswinkel war vergrößert. Darüber hinaus kam es zu milder zystischer Dilatation der prorenalen Tubuli. Somit weist diese erste in vivo-Studie im Zebrafisch-Modell darauf hin, dass *TNS3* sowohl für die allgemeine Embryonalentwicklung als auch die Morphogenese der Nieren erforderlich ist. Es bedarf weiterer Studien, um die Rolle von *TNS3* in der Nierenentwicklung detaillierter zu beleuchten.

Zusammenfassend zeigt dieses Projekt, dass sich der Zebrafisch als adäquates Screening-Instrument für die funktionelle Analyse von Kandidatengen für humane Erkrankungen der Nieren eignet.

Yu Liang

Dr. med.

Zebrafish Models of Human Kidney Disease

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Franz Schaefer

Summary

Zebrafish (*Danio rerio*) is an ideal lower vertebrate animal model to study kidney development and function due to several properties: the animals have a translucent body at embryonic stage, generate lots of offspring and complete nephrogenesis within four days. Most importantly, the zebrafish pronephros is structurally and functionally highly similar to human kidney nephrons. In this thesis, I utilized the zebrafish model to study several genes putatively related to human kidney disease.

Idiopathic nephrotic syndrome, a disorder caused by functional defects of the podocytes, the epithelial cells lining the glomerular capillaries that form the filtration barrier, is the most common glomerular disease in children. 10-15% of the cases are steroid-resistant (SRNS), and in up to 30% of these patients mutations in genes expressed in podocytes are considered to cause hereditary, multidrug resistant disease. One of the genes identified is protein tyrosine phosphatase type-O (*PTPRO*), a receptor tyrosine phosphatase present on the apical podocyte cell surface. However, its precise role in SRNS is still unclear. By in situ hybridization we demonstrated for the first time expression of *PTPRO* in zebrafish glomeruli at 2.5 and 3.5 days post-fertilization, and additionally confirmed expression of the gene in zebrafish brain. Hence, we generated *Ptpro* knock down zebrafish models by morpholino-mediated gene silencing. We investigated two knockdown morpholinos (MO) specific for the *PTPRO* gene. *PTPRO*^{-/-} MO blocks mRNA translation, whereas a *PTPRO* splice morpholino (sMO) produces mutant mRNA causing a deletion in exon 19 and introducing a premature stop codon similar to the splice mutation found in a SRNS family. Both MO groups demonstrated a phenotype with generalized edema and curvature of the body axis. Histological analysis showed cystic enlargement of tubule

lumen in both sMO and PTPRO^{-/-} MO. Kidneys of sMO embryos also exhibited enlarged glomerular capillary loops with less dense glomerular cells by light microscopy. Electron microscopy revealed podocyte foot process effacement in both PTPRO^{-/-} and sMO kidneys. sMO morphant kidneys showed additional normalities of endothelial cells. We further investigated the role of PTPRO in kidney morphogenesis by injecting sMO into fish of the transgenic line *Tg(wt1b:EGFP)*, which express fluorescent protein throughout the developing kidney. In 2dpf and 3dpf embryos, we found kidney deformation in sMO morphants with cystically dilated proximal pronephric tubule and an enlarged pronephric tubule angle.

In the second part of this thesis, zebrafish models were used to identify renal phenotypes for four candidate genes found in a genome-wide association study investigating CKD progression in children: IGFBP3, TNS3, SQRDL and SEMA6D. We designed two specific morpholinos for each and injected them into one-cell stage zebrafish embryo to induce the gene specific knock down model. No phenotype was apparent in the IGFBP3, SQRDL and SEMA6D morphants, while one TNS3 morpholino induced embryos with marked edema and curvature. In the first *in situ* hybridization experiment conducted for TNS3 expression in zebrafish, we found TNS3 in many tissues from 12 hours to 3 days post-fertilization. At 3 days, TNS3 was detected clearly in brain, the digestive system, the eye and the glomerulus. Studies in *Tg(wt1b:EGFP)* embryos showed major alterations of kidney development in TNS3 morphants. At two and three days post-fertilization fusion of the two pronephric glomeruli was significantly delayed and the tubular angle enlarged. In addition, there was mild cystic dilatation of the pronephric tubules. Hence, this first *in vivo* study in the zebrafish model indicated that TNS3, encoding for the Tensin-3 protein, is required for general embryonic development as well as for kidney morphogenesis. Further studies will be required to elucidate the role of TNS3 in kidney development in more detail.

In conclusion, this project demonstrates that the zebrafish can serve as an appropriate screening tool for functional analysis of candidate genes related to human kidney disease.