

Identifizierung und Charakterisierung neuer
Interaktionspartner von Fibrocystin, dem
Protein der autosomal rezessiven
polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD)

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH
Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Master of Science

Andreas Venghaus

aus Schwerte

Berichter: Prof. Dr. med Carsten Bergmann
Universitätsprofessor Prof. Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.8.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhalt

1. Zusammenfassung	5
1. Summary	7
2. Einleitung	9
2.1. Ziliopathien	9
2.2. Primäre Zilien	11
2.3. Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD).....	13
2.3.1. Das Gen <i>PKHD1</i>	14
2.3.2. Polyductin/Fibrocystin.....	15
2.4. Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1).....	17
2.4.1. WD-Repeats als Interaktionsdomäne für Gerüstproteine	18
2.4.2. RACK1 und seine Rolle in Signalwegen der Zelle	20
2.5. ADAM12, eine Metalloprotease.....	21
2.6. Calcium als ein wichtiger second messenger der primären Zilien.....	22
3. Material und Methoden	27
3.1. Verwendete Geräte und Materialien.....	27
3.1.1. Verwendete Geräte.....	27
3.1.2. Verwendete Materialien	30
3.2. Zellkultur.....	41
3.2.1. Passagieren von Zellen	41
3.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	42
3.2.3. Transfektion von eukaryontischen Zelllinien	42
3.2.4. Gewinnung von Primärzellen aus der Niere	44
3.2.5. Isolierung der Epithelzellen aus der Primärzellsuspension mit Hilfe von Magnetic activated cell sorting (MACS)	45
3.2.6. Anlegen einer Primärzellkultur aus Epithelzellen	45
3.3. Molekulargenetische Methoden	47
3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion	47
3.3.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	48
3.3.3. Sequenzierung von PCR-Produkten oder rekombinanten Plasmiden.....	48
3.3.4. Klonierung	49
3.3.5. Restriktionsverdau	50

3.3.6	Ligation	51
3.3.7	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	51
3.3.8	Anlegen von Glycerolstocks	52
3.3.9	Anlegen von Übernachtskulturen und.....	52
	Plasmid-Isolation	52
3.3.10	cDNA Synthese aus humaner Nieren-RNA	53
3.3.11	Mutagenese	53
3.4	Proteinchemische Methoden.....	54
3.4.1	Coimmunopräzipitation (Co-IP) mit dem.....	54
	μ-MACS System	54
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
3.4.3	Western-Blot.....	57
3.4.4	Immunologischer Nachweis der Proteine	57
3.4.5	Immunfluoreszenz (IF).....	59
3.4.6	IF-Mikroskopie	61
4.	Ergebnisse	64
4.1.	Etablierung der Methode zur Gewinnung von Primärzellen aus Nierengewebe von ARPKD-Patienten.....	64
4.2	Ergebnisse der direkten Interaktion zwischen RACK1 und Konstrukten des Fibrocystin-Proteins.....	70
4.2.1	Negativkontroll-Blot für das μ-MACS-System	70
4.2.2	Co-Immunopräzipitation von RACK1 und des	71
	C-terminalen Fibrocystin-Konstrukt.....	71
4.2.3	Immunfluoreszenz Studien in IMCD-Zellen mit RACK1 und dem C- terminalen Konstrukt des Fibrocystin-Proteins	74
4.2.4	Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation mit RACK1 und dem Fibrocystin-IZ-His-Konstrukt	78
4.2.5	Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation der Deletionsmutanten von RACK1 mit dem Fibrocystin-C-Term-Konstrukt	81
4.2.6	Nachweis der Interaktion zwischen Fibrocystin-C-Term-His- Konstrukt und ADAM12	85
4.2.7	Etablierung einer Immunfluoreszenz-Aufnahme mit vier Farben ..	88

5. Diskussion.....	90
5.1. Etablierung der Methode zur Isolierung von.....	90
Nierenepithelzellen als Primärzellkultur.....	90
5.2 RACK1 und Fibrocystin als direkte Interaktionspartner.....	93
5.3 RACK1-Patientenkollektiv	99
5.4 Ectodomain-Shedding von Fibrocystin und die mögliche Rolle von RACK1 und ADAM12	99
5.5 Ca ²⁺ -Signaling in Verbindung mit RACK1 und Fibrocystin	102
5.6 Die Interaktion zwischen FPC und RACK1 und der mögliche Einfluss auf die planere Zellpolarität.....	104
5.7 RACK1 und der C-Terminus von FPC in der extrazellulären Matrix- Regulation	105
5.8 Ausblick.....	107
Literaturverzeichnis	108
Abkürzungsverzeichnis	115

1. Zusammenfassung

Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) ist eine monogen vererbte genetische Erkrankung des Kindesalters mit einer Inzidenz von 1:20.000. Sie wird verursacht durch Mutationen im *PKHD1*-Gen. Die phänotypische Ausprägung besteht hauptsächlich aus klein-zystischen Nieren, kongenitaler hepatischer Fibrose, respiratorischer Insuffizienz und einer portalen Hypertension. Das Gen *PKHD1* hat einen der längsten offenen Leserahmen im menschlichen Genom von 66 Exons. Das mit einer Größe von 4074 Aminosäuren (AS) entstehende Genprodukt Fibrocystin/Polyductin (FPC) ist im Vergleich zu den meisten anderen Proteinen im Organismus sehr groß. Bekannt ist, dass es ein Transmembranprotein ist, das eine sehr große N-terminale-Domäne ausprägt, eine Membrandomäne enthält und zusätzlich einen sehr kleinen C-terminalen Teil. Die höchste Expression von FPC besteht in der Leber und Pankreas sowie in der Niere, hier vor allem in den kortikalen Sammelrohrzellen. Pathologische Veränderungen an den primären Zilien sind als ätiologischer Faktor der ARPKD identifiziert. Somit gehört die ARPKD zu den Ziliopathien.

In der Niere besitzt die primäre Zilie vor allem die Funktion als Mechanosensor, sie kann aber auch als Chemo- und Osmosensor fungieren. Der genaue Pathomechanismus der ARPKD ist nicht geklärt, daher sollten in dieser Dissertation weitere Interaktionspartner identifiziert werden, die mit FPC interagieren. Des Weiteren sollte eine Methode etabliert werden um Primärzellen von ARPKD-betroffenen-Nierenepithelzellen zu gewinnen und sie als Kultur anzulegen.

In dieser Dissertation konnte RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) als Interaktionspartner identifiziert werden. Als Gerüstprotein (β -Propeller-Protein, bestehend aus 7 WD40-Domänen) ist es an vielen Signalwegen beteiligt, vor allem an Signalwegen der Entwicklung, Zellmigration und Zellproliferation. Als weiterer Interaktionspartner von FPC konnte ADAM12 identifiziert werden. ADAM12 ist eine Zink- abhängige membranständige Metalloprotease.

Um Primärzellen von Nierenepithelzellen aus dem Organverbund zu gewinnen, erwies sich die Behandlung mit Kollagenase B und Trypsin als effizienteste Methode.

Zur Trennung und Aufreinigung der Zellsuspension (bestehend aus Nierenepithelzellen und Fibroblasten) konnte die Mini-MACS Methode mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD40 für Fibroblasten (Firma Miltenyi) erfolgreich eingesetzt werden.

Es ist bekannt, dass FPC durch ein Ectodomain-Shedding des N-terminalen Teils einen Notch-ähnlichen Signalweg einleitet. Dabei wird der N-terminale Teil abgespalten, dieser bindet wiederum an den bestehenden Rest von FPC und aktiviert eine Intramembranproteolyse. Als Ergebnis wird der C-terminale Teil von FPC abgespalten und ins Cytosol abgegeben. Als möglicherweise verantwortliche Protease für die Abspaltung des N-terminalen Teils von FPC konnte ADAM12 identifiziert werden. RACK1 sorgt möglicherweise für die korrekte Positionierung beider Proteine.

1. Summary

Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) is a monogenetic hereditary disease during the childhood with an incidence of 1:20.000. It is caused by mutations in the gene *PKHD1*. Phenotypically it is characterized in mainly small-cystic kidneys, congenital hepatic fibrosis, portal hypertension and respiratory insufficiency.

The gene *PKHD1* has one of the longest open reading frames in the human genome and consists of 66 exons. The gene-product fibrocystin (FPC) has a size of 4074 amino acids and it is a very big protein in comparison to other proteins of the human organism. It is known that FPC contains a transmembrane domain, a very big N-terminal domain and a very small C-terminal domain. The highest expression of FPC exists in kidney, liver and pancreas. Especially, it is detectable in the cortical collecting duct cells of the kidney.

Pathologic variations at the primary cilia have been identified as the aetiological factor of ARPKD. This is the reason why ARPKD is a member of the ciliopathies. In the kidney the primary cilia is working as a mechano-, chemo- and osmosensor. The exact pathomechanism of ARPKD has not yet been identified. The aim of this dissertation was therefore to identify further interaction partners of FPC. Furthermore, a method should be established to obtain primary cells of kidney epithel cells which are affected by ARPKD in order to establish cell lines of these primary cells.

In this dissertation RACK1 (Receptor for Activated C Kinase 1) could be identified as an interaction partner of FPC. Because of the seven WD40 repeats (formed a β -propeller structure) it is involved in many signaling pathways like MAPK-kinase, cell migration pathways and cell proliferation pathways. ADAM12 is another interaction partner of FPC. ADAM12 is a zinc depending membrane anchored metalloprotease.

Treating the kidney epithel cells with collagenase B and trypsin has been shown as the most efficient method to gain primary cells from kidney epithel cells. For separation and isolation of the cell suspension (fibroblast and kidney epithel cells) the supported Mini-MACS-System (company Miltenyi) were used.

For the specific separation of the two types of cells it is possible to use the surface antigen CD40.

It is known that FPC starts a Notch-similar pathway by an ectodomain shedding of its N-terminal part. By this mechanism the N-terminal part is separated and binds to the rest of the FPC again and within it activates an intramembrane proteolysis. As a consequence the C-terminal part is separated and translocated to the nucleus and cytosol. ADAM12 is identified as the probable protease which is responsible for the separation of the N-terminal part from FPC. Probably RACK1 is responsible for the correct transport and position of the two proteins during that process.

2. Einleitung

Die paarig angelegten Nieren sind das wichtigste Organ zur Erhaltung der Homöostase. Sie sind verantwortlich für den Wasser- und Salzhaushalt des Körpers und damit für den osmotischen Druck. Außerdem regeln sie zusammen mit der Lunge den Säure-Base-Haushalt des Körpers. Erkrankungen der Niere, einige davon gehören zur Gruppe der „Ziliopathien“, führen schon früh in der Entwicklung zu schweren phänotypischen Ausprägungen wie z.B. einem Oligohydramnion (Fruchtwassermangel), Lungenhypoplasie, renaler Hypertonie, Nierensteine oder dem urämischem Syndrom. Eine häufig schon neonatal auftretende Erkrankung ist die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD), die obligat mit einer kongenitalen hepatischen Fibrose einhergeht. Die ARPKD ist eine monogene Erkrankung, die durch Mutationen des *PKHD1*-Gens verursacht wird. Das Proteinprodukt ist Polyductin/Fibrocystin (FPC), dessen Funktion in den Nierenepithelzellen des Sammelrohrs und den Gallengängen nicht eindeutig geklärt ist.

2.1. Ziliopathien

Primäre Zilien werden durch verschiedene Zellen des Menschen während der Polarisation der Zelle ausgeprägt. Die primäre Zilie ist in den letzten 15 Jahren vermehrt in den Focus der internationalen Wissenschaft getreten insbesondere als Ursache für viele genetisch bedingte Erkrankungen wie ARPKD und der autosomal-dominant-polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD). Gemeinsam mit weiteren Nierenerkrankungen (z.B. Meckel-Gruber-Syndrom und Nephronophthise) werden diese Erkrankungen unter dem Namen Ziliopathien zusammengefasst [1, 2]. Eines der Hauptsymptome der ARPKD und anderen Ziliopathien sind Nierenzysten. Der Pathomechanismus, der der Bildung von Nierenzysten zu Grunde liegt, war bis vor 10 Jahren weitgehend unbekannt, aber durch die weiterführende Forschung ist die primäre Zilie als ätiologischer Faktor identifiziert worden [3].

Die primäre Zilie fungiert als Mechano- und Chemosensor, womit die Zystenbildung zusammen hängt. Sie empfängt chemische Signale in Form von Liganden oder wird durch den Urinfluss mechanisch beeinflusst.

Seltener registriert die primäre Zilie Veränderungen in der Osmolarität. Des Weiteren sind fast alle Zystenproteine in der primären Zilie, dem Basalkörper

und dem Zentrosom lokalisiert [4, 5]. Die phänotypische Ausprägung bei den Ziliopathien ist sehr breit gefächert und reicht von Nierenzysten über Gehirnanomalien und Skelettanomalien. Der Grund ist, dass primäre Zilien fast ubiquitär von allen polarisierenden Zellen ausgebildet wird (Abbildung 1).

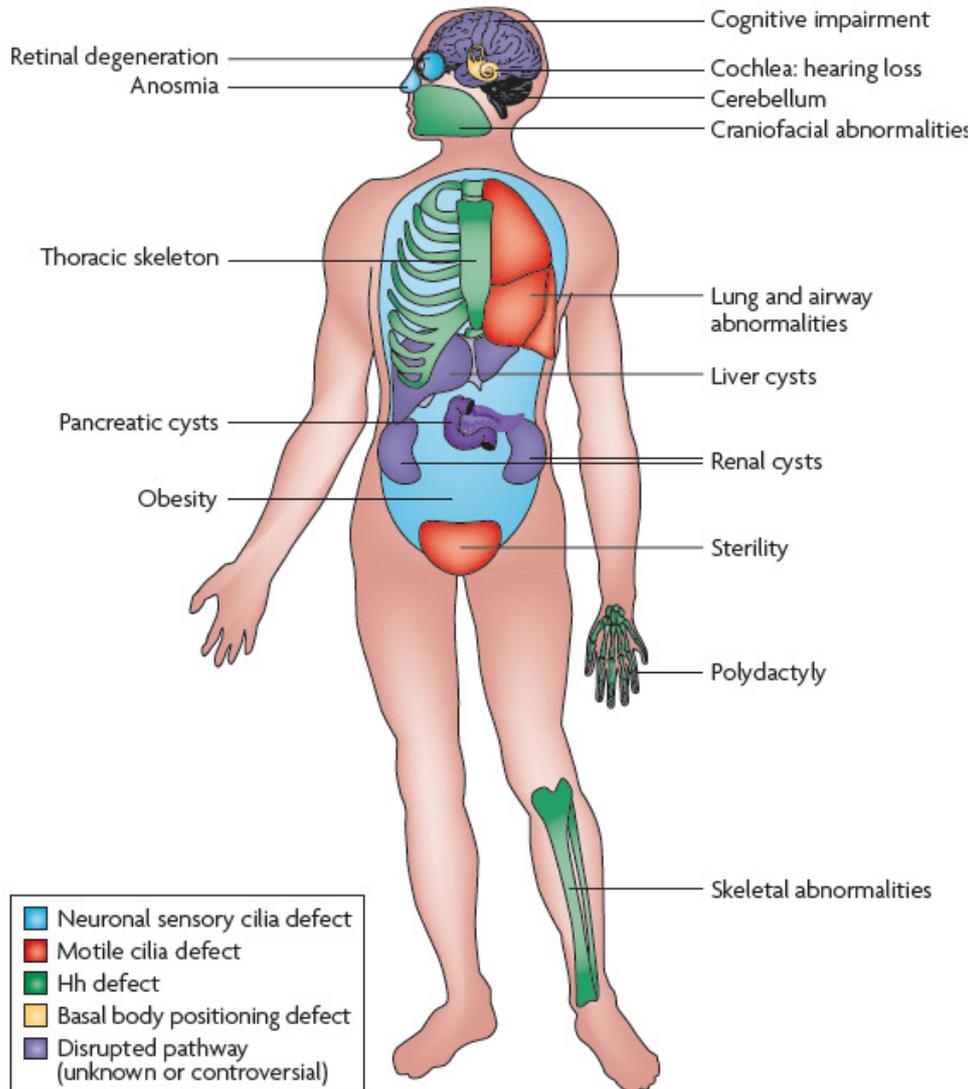


Abbildung 1 **Übersicht aller von Ziliopathien betroffenen Organe** entnommen aus [6]

Die ADPKD und ARPKD sind genetisch und phänotypisch kaum heterogen im Gegensatz zu den syndromalen Ziliopathien wie Nephronophthise, Meckel-Gruber-Syndrom, Joubert-Syndrom und Bardet-Biedl-Syndrom (siehe Abbildung 2).

Hier können Mutationen in mehreren Genen gleichartige phänotypische Ausprägung verursachen [7].

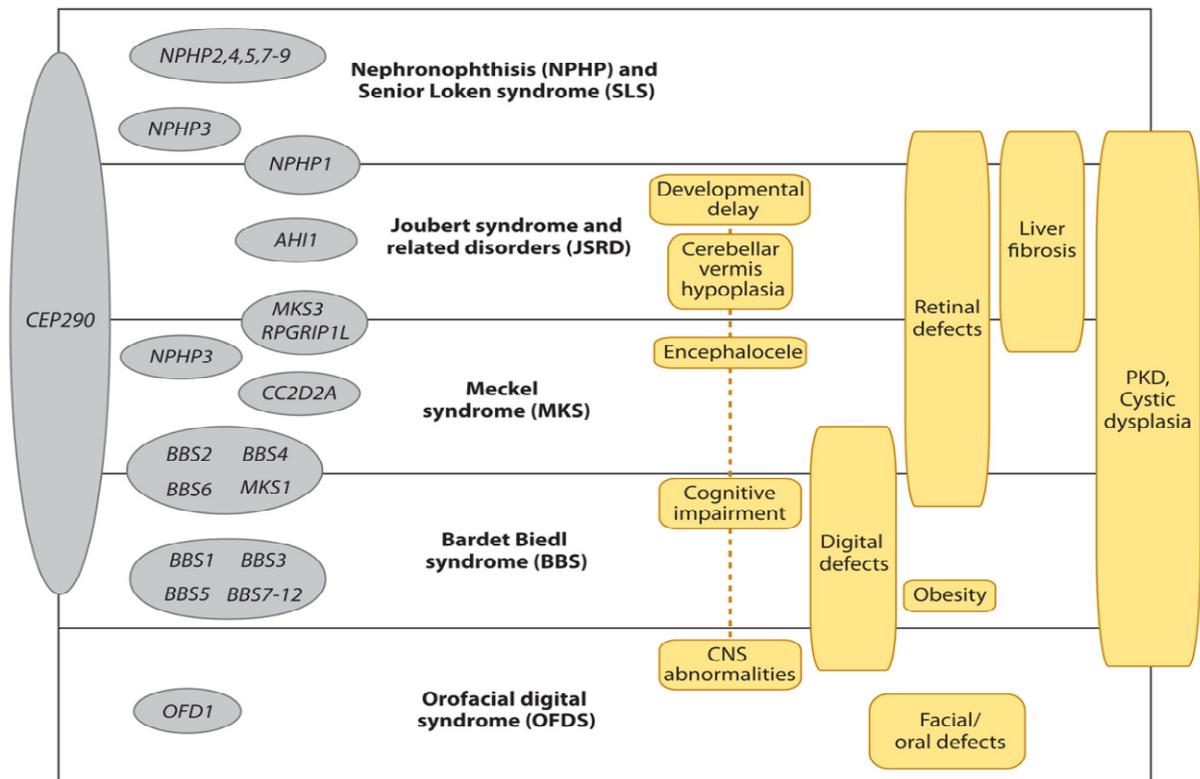


Abbildung 2 Die häufigsten syndromalen Ziliopathien mit den assoziierten Genen; entnommen aus [7]

Wie oben dargelegt, führen Defekte in Aufbau und Funktion primärer Zilien zu unterschiedlichen Symptomen. Es stellt sich die Frage, warum Patienten mit gleichartigen Mutationen nicht ähnliche Symptome zeigen [1, 8]. Der Grund liegt möglicherweise in der Funktion der Zilie, die als Mechano- Chemo und Osmosensor dienen kann. Es kommt darauf an, in welchem Organ/Gewebekontext der Verlust eines Zilienproteins steht. Auch haben manche Zilienproteine in anderen Strukturen der Zelle noch weitere elementare Funktionen, die dann zum Phänotyp beitragen [8].

2.2 Primäre Zilien

Entdeckt wurde die primäre Zilie 1898, doch erst seit ca. 15 Jahren ist sie in den Focus der zellbiologischen Forschung gerückt. Die primäre Zilie ist ein Organell, dessen Struktur einer Antenne ähnlich ist. Sie entsteht am apikalen

Ende von Wachstums-arretierten oder -differenzierten Zellen und ist nicht motil [9]. Dieses Stadium entspricht der Interphase einer Zelle in der Mitose (G0/G1 im Mitose-Zyklus). Das Axonem einer primären Zilie besteht aus Mikrotubuli. Diese Mikrotubuli sind in der primären Zilie in einer 9 + 0 Architektur angeordnet (Abbildung 3) [9-11]. Sie besteht aus einem Basalkörper, der wiederum aus dem Mutter-Centriol gebildet wird. Zwischen dem Basalkörper und der eigentlichen primären Zilie gibt es noch eine „Zilientasche“, die wahrscheinlich den Proteintransport in die Zilie reguliert (Abbildung 3) [9, 10, 12].

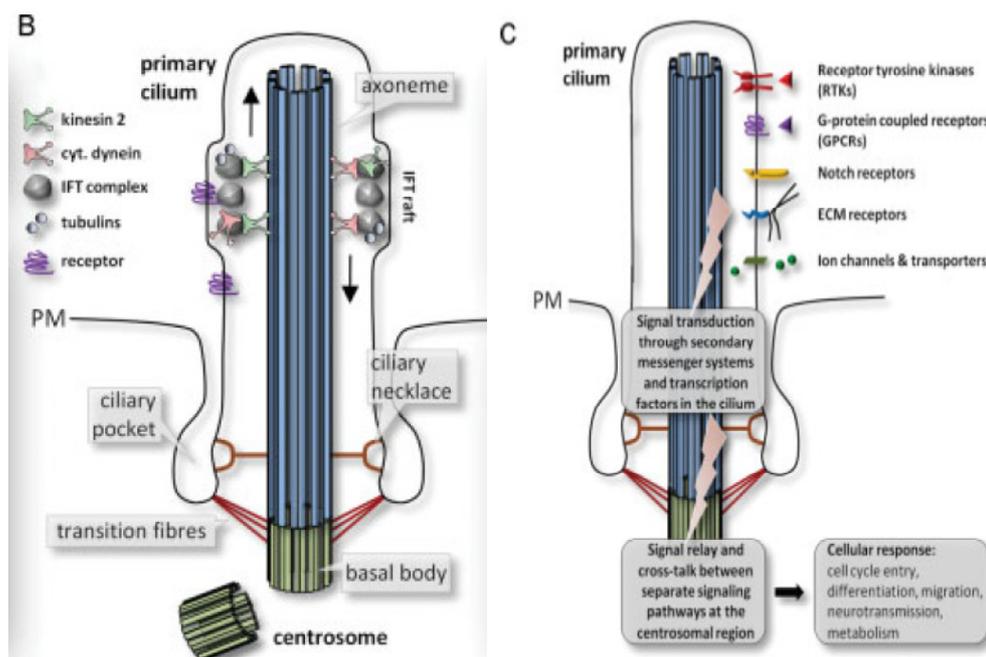


Abbildung 3 **Übersicht über Aufbau und Signalstrukturen primärer Zilien;**

B) Schematische Darstellung des IFT-Transports, dem Axonem und wichtigen Regulationsebenen an der Zilie wie der Zilientasche (ciliary pocket usw. C) Beispiele von Rezeptoren die an der Ziliemembran zu finden sind *entnommen und verändert aus [10]*

Für die Zelle reguliert die primäre Zilie wichtige Signalwege, die in der Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Zellmigration, Zellproliferation, Gewebehomöostase und Embryonalentwicklung eine Rolle spielen.

Dafür besitzt sie eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptoren, wie zum Beispiel: Receptortyrosinkinase (RTK), G-Protein gekoppelte Rezeptoren,

Notch-Rezeptoren, Rezeptoren für Extrazelluläre Matrix Proteine, Transient-Rezeptor-Potential-Ionenkanäle und verschiedene weitere Transporterproteine [9, 10, 13, 14].

Innerhalb einer primären Zilie kann keine *de novo* Proteinsynthese stattfinden, daher muss die Proteinausstattung der Zilie anders gewährleistet werden. Hierfür gibt es ein Transportsystem, bestehend aus zwei Proteinkomplexen, das so genannte Intraflagellar Transport System (IFT). Der Transport zur Spitze der primären Zilie (anterograder Transport) wird durch den Komplex B gewährleistet, der als Motorproteine die Kinesine nutzt. Von der Spitze der Zilie hin zum Cytoplasma (retrograder Transport) fungiert der Komplex A, bestehend aus Dyneinen, als Motorprotein [9, 15]. Mehrere Domänen und Motive des IFT haben eine Ähnlichkeit mit den *Clathrin coated Pits* und COP-II-Proteinen, die im Cytoplasma den Vesikulartransport regulieren und steuern. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Mechanismen an der Zilienbasis existieren. IFT spielt dementsprechend eine wichtige Rolle im Aufbau der primären Zilie und bei der Regulation der Signalwege der Zilie [9].

Mit Hilfe der spezifischen Ausstattung mit Rezeptoren, Ionenkanälen und Transportproteinen kann die primäre Zilie extrazelluläre Signale verarbeiten und deren intrazelluläre Antwort steuern. Ein Funktionsverlust durch Mutationen in einem Zilienprotein verursachen in diesem diffizilen System die Funktionseinschränkungen und die daraus resultierenden Ziliopathien. Einige wichtige Signalwege sind z.B. der Hh-Signalweg, der kanonische und nicht-kanonische Wnt-Signalweg, Notch-Signalweg, Signalkaskaden über RTK und die Regulation über die extrazelluläre Matrix [9].

2.3 Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)

Die ARPKD kommt mit einer Inzidenz von 1:20:000 in Mitteleuropa vor. Die Heterozygotenfrequenz wird mit 1:70 angegeben. Damit gehört sie zu den häufigsten genetischen Nephropathien im Kindesalter [16-18]. Klinische Charakteristika sind zystisch vergrößerte echogene Nieren, Leberveränderungen, besonders die kongenitale hepatische Fibrose, einschließlich Hepatomegalie und erweiterten Gallengängen. Die

Leberveränderungen führen auch zu einer erhöhten Echogenität. Portale Hypertension, resultierend aus der hepatischen Fibrose, ist ein weiteres Merkmal der ARPKD.

Aufgrund eines Fruchtwassermangels kommt es zu der typischen Potter-Fazies. Schätzungsweise 30% der Betroffenen sterben bereits neonatal, primär an einer respiratorischen Insuffizienz [19, 20].

2.3.1 Das Gen *PKHD1*

Im Jahr 2002 konnte das Gen [Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1 (*PKHD1*)] für die ARPKD identifiziert werden [21, 22]. Das Gen *PKHD1* liegt auf Chromosom 6p12 und ist mit einer genomischen Größe von 470 kb eines der bisher größten bekannten Gene. Es besteht aus 86 möglichen kodierenden, teils alternativen Exons, wobei der längste offene Leserahmen (ORF) 66 Exons aufweist [20, 23, 24]. Neben dem längsten offenen Leserahmen und dem Haupttranskript gibt es noch weitere Transkripte, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden. Die höchste Expression von *PKHD1* findet sich in der fetalen wie adulten Niere, sowie in Leber und Pankreas. In niedriger Expressionsrate findet man *PKHD1* auch in Lunge, Hoden, glatter Muskulatur und in der Luftröhre [22-24]. Der *PKHD1*-Promotor wird durch den Transkriptionsfaktor HNF1 β reguliert, was erklärt, dass Mutationen im *HNF1 β* -Gen teils sehr ähnliche Phänotypen wie die ARPKD zeigen.

Bei der ARPKD existiert nur eine eingeschränkte Phänotyp-Genotyp-Korrelation. Häufig versterben die betroffenen Nachkommen perinatal, wenn sie zwei trunkierende Mutationen tragen. Bei moderaten phänotypischen Ausprägungen ist meist die Kombination Missense- und Nonsense-Mutation oder zwei Missense-Mutationen vorhanden [25].

Schwere Verläufe der ARPKD mit zwei Missense-Mutationen sind selten, kommen aber vereinzelt vor. Das Vorkommen von Mutationen im Gen *PKHD1* liegt bei 40% Nonsense-Mutationen und 60% Missense-Mutationen. Auffällig bei *PKHD1* ist, dass es eine so genannte Hotspot Mutation T36M gibt, diese befindet sich im Exon 3.

Eine Akkumulation von Mutationen in bestimmten Exons oder Proteindomänen von *PKHD1* ist nicht zu beobachten. Man spricht davon, dass die betroffenen

Familien von „privaten“ Mutationen betroffen sind. Trotz der fehlenden Genotyp-Phänotyp-Korrelation und Akkumulation konnte ein Algorithmus entwickelt werden, bei dem bis zu 80% aller bisher bekannten Mutationen identifiziert werden [26]. Die Detektionsrate schwankt sehr in den vorhandenen Studien, doch im Mittel liegt sie bei ca. 80-85%. Sie ist sehr abhängig vom histopathologischen Befund, der damit einhergehenden Diagnose und der angewandten Testmethode [19, 24].

2.3.2 Polyductin/Fibrocytin

Der längste ORF des Gens *PKHD1* codiert für das Protein Polyductin/Fibrocytin. Onuchic et al. haben 2002 zeitgleich mit Ward et al. die Identifizierung des Locus *PKHD1* und des codierten Proteins veröffentlicht [21,22]. Onuchic et al. nannte das Protein Polyductin und Ward et al. Fibrocytin. In der Literatur hat sich die Bezeichnung Fibrocytin (FPC) durchgesetzt.

FPC ist ein neuartiges Zelloberflächenprotein mit einer Größe von 4074 AS, dies entspricht in etwa 447 kDa im nicht glykolysierten Zustand [21-23]. Der extrazelluläre N-terminale Teil des Proteins umfasst mit 3860 AS fast 95% des Proteins, gefolgt von einer Typ-I-Transmembrandomäne und einem kleinen cytoplasmatischen Teil. Der riesige N-terminale Teil enthält viele Homologien zu bekannten Proteinmotiven, wie die IPT-Domäne (Immunoglobuline-like fold shared by **P**lexin **T**ranscriptionfactors), in der Literatur auch als TIG-Domän zu finden. Diese Proteindomäne findet sich häufig bei intrazellulären Transkriptionfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren und besitzt eine DNA-Bindungseigenschaft [22, 23]. Des weiteren besitzt der N-terminale Teil von FPC noch TMEM2 und DKFZ-Homologien sowie mehrere PbH1-Repeats (**P**arallel **b**eta-**H**elix 1), die häufig in Enzymen der Polysaccharid-Hydrolyse vorkommen (Abbildung 4) [22, 23]). Als eine besondere Domäne gilt die PA14-Domäne. Sie kommt eigentlich nur bei bakteriellen β -Glykosidasen und Glykotransferasen sowie Proteasen vor.

In Säugetieren ist FPC mit dem Faktor Psi zusammen das einzige Protein, das diese Domäne ausbildet. Die PA14 Domäne hat wahrscheinlich eine Bindungsfunktion (Abbildung 4) [27].

Diese Proteinmotive legen den Verdacht nahe, dass FPC als integrales Membranprotein Rezeptorfunktion ausübt und Signalwege beeinflusst, die die Gentranskription regulieren.

FPC ist weiterhin am N-terminalen Teil vielfach glykosyliert. Ein Signalpeptid sorgt für die endoplasmatische Verteilung in der Zelle. Der cytoplasmatische Teil von FPC enthält vier mögliche Phosphorylierungs-Stellen [21, 22].

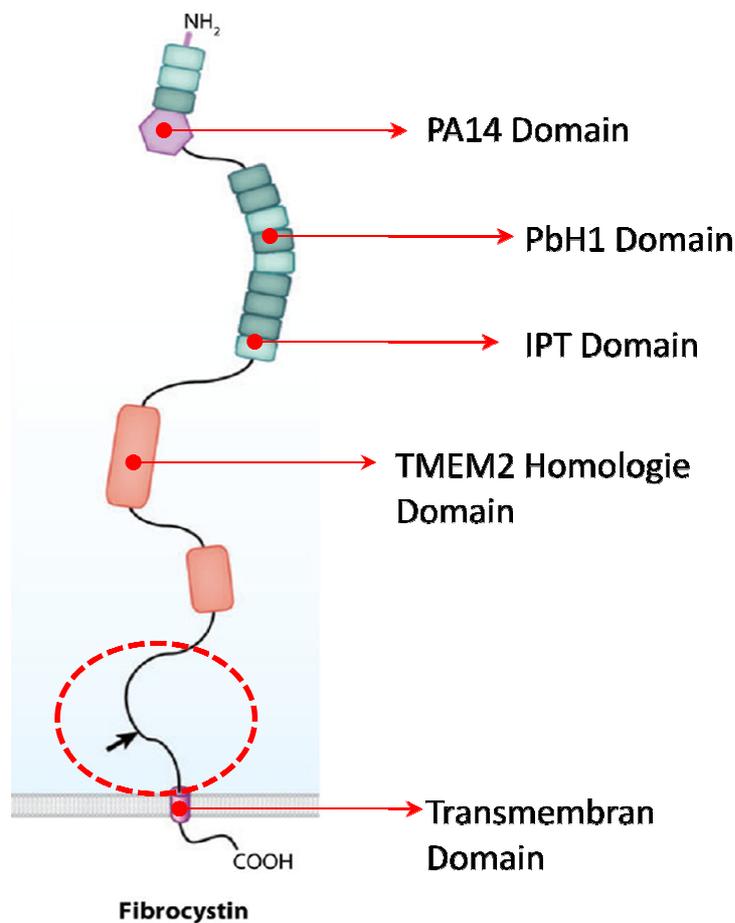


Abbildung 4 Aufbau des Proteins Fibrocystin.

Zu sehen sind alle wichtigen Proteindomänen; der rote gestrichelte Kreis zeigt den Bereich der Ectodomain-Spaltung an; *entnommen und verändert aus [7]*

In der Embryogenese wird FPC in den Abkömmlingen der Epithelzellen, insbesondere während der Nieren- und Leberentwicklung gefunden. In der entwickelten Niere und Leber findet sich FPC in den Epithelzellen der Sammelrohre, dem distalen Teil des Tubulussystems und der Henle-Schleife. In der Leber ist die Expression von FPC in den Cholangiozyten der hepatischen Gallengänge am höchsten [23].

In der Zelle befindet sich FPC hauptsächlich an und in der Membran von primären Zilien, am apikalen Ende der Zelle und den Zentrosomen [5, 28]. Der kleine C-terminale Teil von FPC verfügt über eine Signalsequenz, die das Protein in die primäre Zilie transportiert [29].

FPC ist an mitotischen Spindeln lokalisiert und reguliert ihre Bipolarität [30]. In der primären Zilie unterläuft FPC einem Notch-like-Processing, wobei die extrazelluläre Ectodomäne von FPC abgespalten wird. Der cytoplasmatische Teil wird durch regulierte Intramembranproteolyse freigesetzt und wandert daraufhin in den Kern [31, 32]. Durch die indirekte Interaktion über Kif3A mit PKD2, einen Ca^{2+} -Kanal, und der Mechanoregulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist bekannt, dass FPC im Ca^{2+} -Signalling eine entscheidende Rolle spielt [33-37]. Interessanterweise ist nachgewiesen, dass FPC in Exosomen-ähnlichen Vesikeln im Urin zu finden ist. Diese Vesikel binden bevorzugt an primären Zilien [38].

Es ist bis dato nicht eindeutig geklärt, ob Fibrocystin nun in der Zelle als Rezeptor, als Ligand oder als beides fungiert. Auch sind noch viele Fragen offen, u.a. welche Signalwege durch FPC reguliert werden und durch welche komplexen Prozesse in der Zelle eine ARPKD entsteht. Daher ist es von hohem Interesse zu wissen, welche Interaktionspartner FPC hat und inwiefern diese in Prozesse wie Zellproliferation, Zystenentstehung und Zellmigration eingreifen.

2.4 Receptor for Activated C Kinase 1 (RACK1)

Der Name des Proteins ist auf die erste identifizierte Interaktion zurückzuführen, der aktivierten Form der Proteinkinase C [39]. RACK1 gehört zu der WD-Repeat-Proteinfamilie, die als namensgebende Struktur ein Tryptophan-Asparagin-Dipeptid am Ende des Repeats besitzen. Es ist 36 kDa groß und bildet eine sogenannte β -Propeller Struktur aus, die aus sieben WD-Repeats gebildet wird (Abbildung 5). RACK1 wird von dem Gen *GNB2L1* (5q35.3) kodiert, das mit 8 Exons und einem ORF von 1142 bp ein recht kleines Gen ist [39, 40]. Das Gen codiert für ein Protein mit 317 As. Als Gerüstprotein ist es an vielen Signalwegen beteiligt, vor allem an Signalwegen der Entwicklung, Zellmigration und Zellproliferation. Es ist ubiquitär in allen somatischen Zellen

exprimiert. In der Zelle ist es hauptsächlich im Cytosol, im Endoplasmatischen Retikulum, im Nucleus und an der Plasmamembran lokalisiert.

2.4.1 WD-Repeats als Interaktionsdomäne für Gerüstproteine

Die Konsensussequenz einer WD-Repeat Proteindomäne hat eine ungefähre Größe von 44-60 Aminosäuren. Am C-terminalen Bereich der Domäne findet man das namensgebende Dipeptid WD (Tryptophan-Asparagin). Am N-terminalen Anfang beginnt die Domäne häufig mit dem Dipeptid GH (Glycin-Histidin) [40, 41]. Interessanterweise ist eigentlich nur der Tryptophan-Rest hoch konserviert. Der Histidin-Rest kann durch ähnliche Aminosäuren ersetzt werden, ebenso der Glycin-Rest am Anfang. Auch der Asparagin-Rest kann durch strukturell ähnliche Aminosäuren wie z.B. Glutamin ersetzt werden. Zurzeit sind mehr als 100 Proteine bekannt, die als einzige Proteindomäne WD-Repeats aufweisen und somit auch die charakteristische β -Propeller-Struktur bilden. In fast allen bekannten Signalwegen der Zelle sind WD-Repeat-Proteine beteiligt. Dies zeigt, dass sie eine hohe Vielfalt aufweisen [40].

WD-Repeat-Proteine spielen meist als Gerüstprotein eine wichtige Rolle, da sie durch die β -Propeller-Struktur mehrere Proteine gleichzeitig an sich binden können.

Durch diese Eigenschaft werden die involvierten Proteine eines Signalweges in räumliche Nähe gebracht und können dann miteinander interagieren.

WD-Repeat-Proteine zeigen keinerlei enzymatische Aktivität, können aber durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden [40, 41].

Aufgrund der speziellen Funktion als „Komplexbildner“ von Signalproteinen ist es nicht verwunderlich, dass WD-Repeat-Proteine eine bedeutende Rolle in der Pathobiochemie verschiedener Erkrankungen spielen.

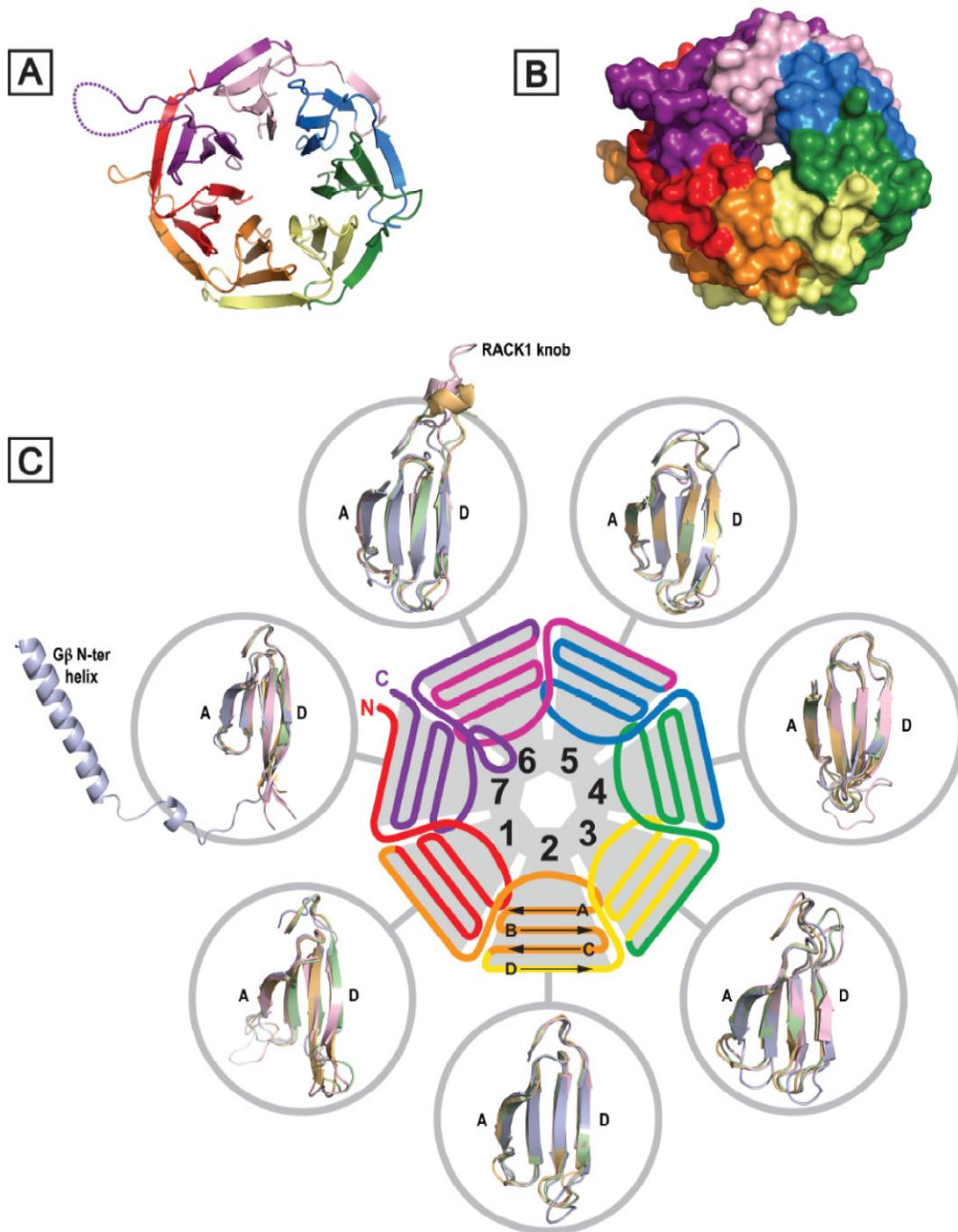


Abbildung 5 Struktur des 7-teiligen β -Propellers von RACK1

A,B) Zwei unterschiedliche Darstellungen der Kristallstruktur des β -propellers von RACK1

C) schematische Darstellung der RACK1 Organisationsstruktur

Gut zu erkennen sind die potenziellen Dockingstelle von RACK1; Durch die β -Propeller-Struktur zeigen die WD-Repeats nach außen, wo mögliche Bindungspartner binden können *Entnommen aus [40]*

2.4.2 RACK1 und seine Rolle in Signalwegen der Zelle

RACK1 ist wie erwähnt an vielen unterschiedlichen Signalwegen beteiligt. Durch die Bindung an die aktive Proteinkinase C (PKC) wird die aktive Form der PKC stabilisiert. Auf diese Weise können die Substrate der PKC an RACK1 binden und die aktive PKC phosphoryliert die gebundenen Substrate. PKC seinerseits ist ebenfalls an vielen Signalwegen beteiligt. Als ein Beispiel sei hier der „Cross-Talk“ zwischen PKC und dem MAPK-Signalweg genannt [40, 42].

RACK1 ist zudem im cAMP/PKA-Signalweg involviert. Hier bindet RACK1 die Phosphodiesterase PDE4D5 [43]. Dies ist eine bestimmte Isoform der Phosphodiesterasen, die für die Hydrolyse von cAMP zuständig sind.

Durch diese Funktion spielt RACK1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellpolarität. RACK1 bringt die Focal Adhesion Kinase (FAK), ein wichtiges Enzym der extrazellulären Matrix, in räumliche Nähe mit PDE4D5 [40, 43]. Aber RACK1 hat nicht nur aktivierende Funktion, sondern kann auch durch seine Bindung Proteine inhibieren. So wird zum Beispiel die Src-Kinase in einem inaktiven Zustand gehalten, während sie an RACK1 gebunden ist. Dadurch hat RACK1 einen stabilisierenden Einfluss auf das Zellwachstum [44, 45]. Durch die räumliche Nähe von RACK1 an der Plasmamembran reguliert das Protein auch viele Transmembranrezeptoren wie den β -Integrin-Rezeptor, den Androgenrezeptor und viele Ionenkanäle [40, 42, 43]. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Regulation der RTKs durch RACK1. Hervorzuheben ist hier der IGF-IR-Rezeptor, der durch RACK1 mit β 1-Integrin zusammengeführt wird und so adhäsionsabhängig die Zellmigration fördert.

Des Weiteren werden durch diese Interaktion Proteine der Apoptose-Signalwege der MAPK-Kinase-Signalwege und verschiedene PKC Isoformen rekrutiert [40]. RACK1 interagiert mit Vangl2, das einen dominant-negativen Effekt auf die Gastrulation während der frühen Embryonalentwicklung hat. Der Effekt entsteht durch den Einfluss auf die planare Zellpolarität [46]. Auch die Interaktion mit der Tyrosin-Protein-Kinase-like 7 (PTK-7) ist eine wichtige Voraussetzung für die Schließung des Neuralrohrs [47].

2.5 ADAM12, eine Metalloprotease

ADAM12 gehört zur ADAM-Proteinfamilie (**a disintegrin and metalloprotease**), die zurzeit 23 ADAM-Proteine umfasst.

ADAM12 existiert in 2 Spleißvarianten, ADAM12-L und ADAM12-S. ADAM12-L besitzt eine Transmembrandomäne, eine extrazelluläre Metalloprotease Domäne, eine Disintegrin-Cystein-reiche Domäne und einen kurzen cytoplasmatischen Teil [48]. ADAM12-S ist um den cytoplasmatischen Teil und die Transmembran-Domäne verkürzt und wird von der Zelle sekretiert (siehe Abbildung 6). Die Protease-Aktivität ist zinkabhängig. Die Metalloprotease-Domäne hat die Eigenschaft, von Transmembranproteinen die extrazelluläre Domäne zu spalten (Ectodomain-shedding). Durch die Disintegrin-Cystein-reiche Domäne kann ADAM12 aber auch als extrazellulärer Bindungspartner fungieren. ADAM12 ist an Zell-Zellkontakten beteiligt und kann die β 1-Integrin Kaskade aktivieren. Dabei wird die Fokale Adhensions-Kinase unter Einbeziehung der PKC rekrutiert. Des Weiteren kann ADAM12 den Aufbau und die Signalwege der extrazellulären Matrix beeinflussen. ADAM 12 ist nicht ubiquitär exprimiert, wird aber zum Teil in hepatischen Sternzellen und in Nierenepithelzellen exprimiert.

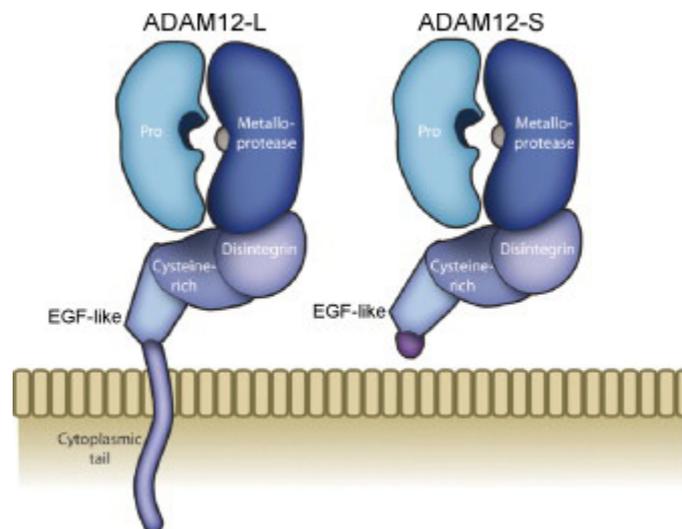


Abbildung 6 Schematischer Aufbau der ADAM12-Metalloprotease

Zu sehen sind die zwei Proteinvarianten von ADAM12 entnommen aus [48]

2.6 Calcium als ein wichtiger second messenger der primären Zilien

Die dominante polyzystische Nierenerkrankung wird durch Mutationen der beiden Gene *PKD1* und *PKD2* verursacht. *PKD1* codiert für das Protein Polycystin-1 (PC1) und *PKD2* für Polycystin-2 (PC2). PC1 scheint als Rezeptor zu dienen und hat auch eine Funktion als Regulator der Genexpression durch Transport des cytoplasmatischen Teils in den Kern. Die Funktion des Proteins PC2 ist weitgehend geklärt. Es handelt sich um einen mechanosensitiven Ca^{2+} -Kanal [7]. Diese beiden Proteine liegen als sogenannter Zystenprotein-Komplex mit FPC vor, wobei FPC über das Adapterprotein Kif3A mit PC2 interagiert [37, 49]. PC2 interagiert aber auch direkt über die cytoplasmatische Region von FPC mit diesen [36]. Der Komplex ist hauptsächlich in der primären Zilie lokalisiert und reguliert hier den Ca^{2+} -Einstrom in die Nierenepithelzelle, abhängig vom Urinfluss [34]. Eine ähnliche Funktion ist in den Gallengangsepithelzellen der Leber zu finden. Der Anstieg von Ca^{2+} im Cytosol aktiviert/inhibiert viele Signalwege der Zellproliferation und der Zellpolarität. Als Beispiel seien die Wnt-Signalwege und cAMP-Signalwege genannt. Der Wnt-Signalweg kann in zwei Signalwege unterteilt werden, die beide durch Ca^{2+} reguliert werden.

- 1.) β -catenin-abhängiger kanonischer Signalweg
- 2.) β -catenin-unabhängiger nicht-kanonischer Signalweg

Wahrscheinlich führt die stark erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zu einer Inaktivierung des β -catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs und zu einer Aktivierung des anderen Wnt-Signalwegs. Das führt in der Nierenepithelzelle zu einer niedrigen Zellproliferation und einer klaren Zellpolarität. Inversin ist als „Zwischenschalter“ eingebaut. Eine Störung in diesem System verursacht durch einen falsch-regulierten Calcium-Einstrom führt zu einem zystischen Nierenphänotyp (Abbildung 6) [49].

Ein weiterer wichtiger Regulator der Zellproliferation ist cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat). In Geweben von Tiermodellen der ARPKD konnte eine erhöhte cAMP-Konzentration nachgewiesen werden [50].

cAMP aktiviert den MAP-Kinase Signalweg, genauer den ERK-Signalweg, der in der Zellproliferation eine relevante Funktion hat. Hohe Calciumkonzentrationen aktivieren die Phosphodiesterasen, die cAMP hydrolysieren. Niedrige Calcium-Konzentrationen führen somit zu einer erhöhten cAMP-Konzentration und dadurch zu einer verstärkten Aktivierung des ERK-Signalwegs und einer gesteigerten Zellproliferation (Abbildung 7) [23, 49, 50].

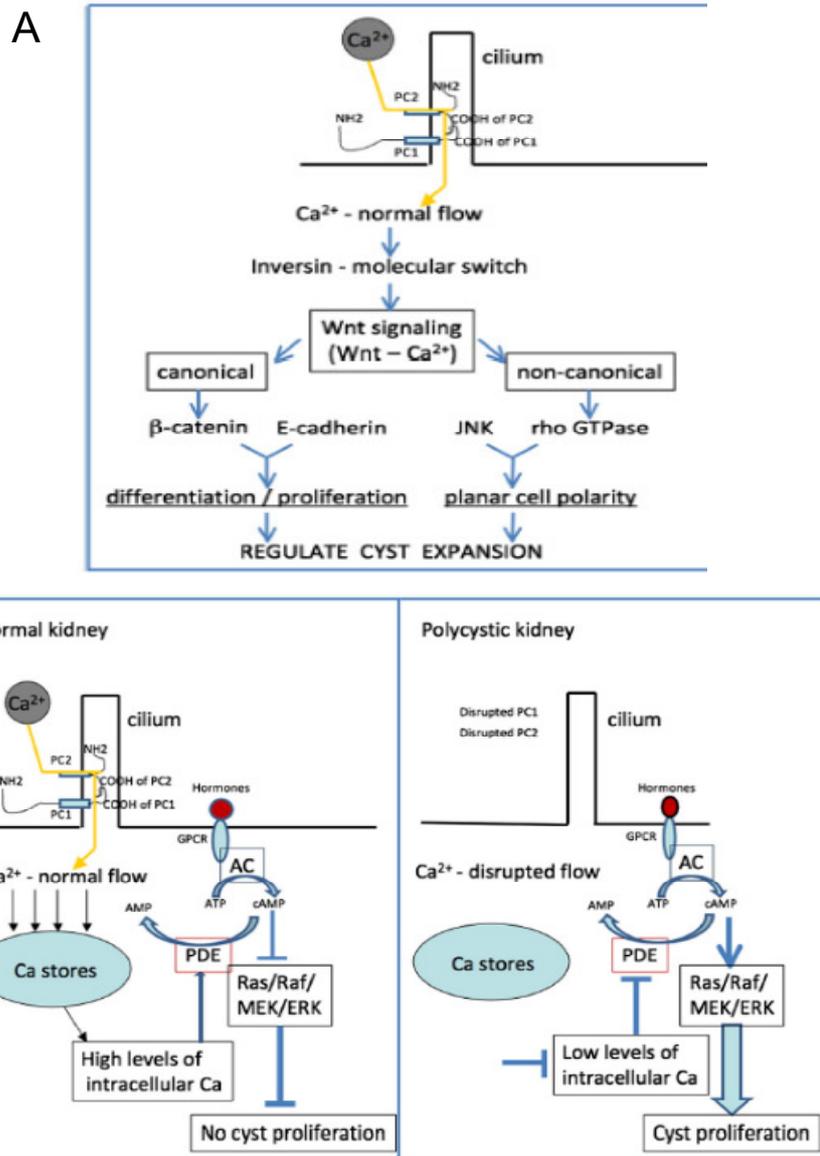


Abbildung 7 Übersicht über Calcium regulierten Signalwege

A) Calcium regulierte Zellproliferation über den Wnt-Signalweg

B) cAMP Aktivierung des ERK-Signalwegs;

Entnommen aus [49]

2.6 Planare Zellpolarität und ARPKD

Epithelzellen weisen zwei wichtige Ebenen der Zellpolarität auf, die durch Signalwege und deren Proteinnetzwerke reguliert werden. Das ist zum einen die apikale/basolaterale Ebene, die bildlich die Höhe der Zelle reguliert. Die zweite Ebene ist die proximale/distale Ebene, die die seitliche Polarität darstellt [51, 52]. Diese Ebene wird planare Zellpolarität (Planar Cell Polarity PCP) genannt. Aber auch die gerichtete Zellteilung in der Mitose muss reguliert werden, auch diese Prozesse werden in die Regulation der PCP eingeschlossen. Vor allem die Tubulusformation der Nieren ist mit der orientierten Zellteilung und PCP assoziiert [4]. Wichtige Signalwege der PCP sind der nicht-kanonische Signalweg und der TGF β -Signalweg. In der PCP hat das Protein Vangl2, ein Transmembranprotein, eine bedeutende Rolle bei der Initiierung des PCP-Signalweges.

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass FPC im Regulationsprozess der PCP eine wichtige Funktion hat. Besonders in der Regulation der gerichteten Zellteilung wird eine wichtige Funktion von FPC vermutet.

ARPKD ist charakterisiert durch eine enorme Steigerung des Tubulus-Durchmessers und der dadurch entstehenden Zystenentwicklung [53].

Im Zusammenspiel mit HNF1 β , einem Transkriptionsfaktor für *PKHD1*, wird deutlich, dass eine verminderte *PKHD1*-Expression die PCP-Prozesse stört. Mutationen im *PKHD1-Gen* sind mit Verlust bzw. Reduktion der orientierten Zellteilung assoziiert [54]. Auch RACK1 ist im Prozess der planaren Zellpolarität durch die Interaktion mit Vangl2 involviert. RACK1 ist dort für die korrekte Lokalisation von Vangl2 in der Plasmamembran zuständig. Des Weiteren interagiert RACK1 mit PTK7, einem Transmembranprotein mit extrazellulären Immunglobulin-Domänen. In *Xenopus* konnte gezeigt werden, dass PTK7 eine elementare Bedeutung für die Schließung des Neuralrohrs besitzt. Durch die Interaktion mit PTK7 kann somit auch für RACK1 eine wichtige Funktion bei der Schließung des Neuralrohrs postuliert werden.

2.6 Extrazelluläre Matrix-Kommunikation und ARPKD

Fokale Adhäsionskomplexe sind hochkomplexe Strukturen an der Plasmamembran, die eine bidirektionale Kommunikation zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix (ECM) herstellen. Sie verbinden die extrazellulären Filamente mit dem Zytoskelett in der Zelle.

Durch diese Verbindung ist eine Regulation von Signalwegen durch Mechanotransduktion möglich [55].

Um die Integrin-Rezeptorfamilie akkumulieren viele verschiedene Proteine, die als fokale Adhäsionskomplexe gelten, u.a. c-Src, Paxillin, Talin, Tensin und die Fokale Adhäsions Kinase (FAK).

PC1 formt mit β 1-Integrin-Rezeptoren und den oben genannten Proteinen der fokalen Adhäsion einen Komplex in renalen Epithelzellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Knockout der Proteine c-Src, Paxillin, FAK und PC1 zu einer stark reduzierten Zellmigration führten, die ihre Grundlage in der stärkeren Adhäsion an die ECM hat [56, 57]. Zellmigration ist in der embryonalen Entwicklung der Organe essentiell. Auch die Entwicklung und die Differenzierung der Nephrone sind stark mit der Zellmigration assoziiert.

Durch Überlappung der Phänotypen von ADPKD und ARPKD ist eine Beteiligung der gestörten ECM Kommunikation bei der ARPKD möglich. Die Fibrose bei der PKD ist charakterisiert durch frühe Veränderungen der Zellpolarität und Morphologie der Epithelzellen und eine defekte Interaktion zwischen Fibroblasten und Epithelzellen. ECM-Proteine akkumulieren zwischen den Zellen und es kommt zu einer starken Vermehrung des Bindegewebes [58].

2.7 Zielsetzung

FPC ist ein sehr komplexes Protein, das aufgrund seiner Größe und Struktur unterschiedliche Funktionen haben kann. Dabei ist derzeit unklar, welche Funktion FPC in der Zelle genau ausübt. In dieser Dissertation sollte eine neue Proteininteraktion zwischen FPC und zwei weiteren Proteinen untersucht werden. RACK1 wurde vor Beginn der Promotion in einem Yeast-Two-Hybrid System als ein möglicher Interaktionspartner identifiziert.

Zur näheren Charakterisierung wurden bekannte Methoden für Proteininteraktionsstudien verwendet, wie Koimmunopräzipitation und Immunfluoreszenz. Um die *in vivo* Situation besser darzustellen, sollten Primärzellen als Modell eingesetzt werden, und eine Methode zur Isolierung und Etablierung von Primärzellen aus ARPKD-Patientenmaterial etabliert werden. Aufgrund der Größe des Proteins wurde der Fokus auf den C-terminalen Teil des Proteins FPC gelegt. Durch die Identifizierung neuer Interaktionspartner sind neue Erkenntnisse zur Zellbiologie und zum Pathomechanismus der ARPKD zu erwarten.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

3.1.1 Verwendete Geräte

Autoklav	HV-85 (HD-Tek, Süßen, D)
Blotkammer	Biometra Fastblot B34 (Biometra, Göttingen, D)
Brutschränke	Heraeus HeraCell 150 CO ₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D) HeraHybrid 6 100C (Kendro, Langensebold, D)
Entwicklungsmaschine	Optimax Röntgenfilm-Entwicklungsmaschine (Protec medical systems, Oberstenfeld, D)
Elektrophoresekammern	Serva Gelkammer DM100 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D) (Für DNA) Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, München, D) (Für Protein)
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer.Z1 mit HXP Beleuchtungseinheit und Powersupply 231 und Dekonvolutionssoftware (Zeiss, Göttingen, D)
Geldokumentation	Imaging-System Gel Doc 2000 (Bio-Rad, München, D)
Gelgieß-Einrichtungen	Mini-PROTEAN Casting Stand and frames (Bio-Rad, München, D)
Gel-Träger	Short plates and Spacer Plates With 1.0 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, München, D)

Gel-Kämme	22-Zahn-Kämme (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D) Mini-PROTEAN Comb, 9-well and 10-well (Bio-Rad, München, D)
Heizblock	Dry-Block DB3D (Techne, Wertheim, D)
Netzteile	Elektrophoresis Power Supply PS 304 (Gibco BRL, Groningen, NL) Whatmann Biometra Model PS304 Power Supply (Biometra, Göppingen, D)
Magnetrührer	Ikamag RCT basic (IKA Labortechnik, Staufen, D)
Mikrowelle	Bosch, München, D
pH-Meter	Bench Meter pH 211 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, D)
Photometer	Bio Photometer (Eppendorf, Köln, D)
Pipetten	Pipette P10, P20, P100, P200, P1000 (Gilson, Villiers-le-Bel, F)
Schüttler	Kreis-Schüttler GFL 3015 (GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, D) KS-15 mit Inkubationshaube TH 15 (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D) Laboshake RO 500 mit Thermoshake (C. Gerhardt GmbH, Königswinter, D) Thermomixer 5437 (Eppendorf AG, Hamburg, D) Horizontalschüttler HS 250 (IKA Labortechnik, Staufen, D) Biometra OV2 Überkopfschüttler (Biometra, Göppingen, D)

Sterilarbeitsbänke	HeraSafe HS12 (Kendro Laboratory Products, Hanau, D)
	HeraSafe KS12 (Thermo Electron, Langenselbold, D)
Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
	ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (4Capillary) (Applied Biosystems, Darmstadt, D)
Sequenzierzubehör	(Applied Biosystems, Darmstadt, D)
Thermocycler	Thermocycler PTC 100, MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf, D)
	Thermocycler PTC 200 DNA Engine, MJ Research (Biozym, Hess. Oldendorf, D)
	Biometra Personal Cycler (Biometra, Göttingen, D)
	Thermo Hybaid Px2 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)
Waagen	BP 2100 (Sartorius AG, Göttingen, D)
	BP 615 (Sartorius AG, Göttingen, D)
Wasserbäder	GFL 1086 (GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, D)
	Lauda Ecoline Refrigerating Circulators RE-200 (Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D)
Zentrifugen	Centrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg, D)
	Heraeus Fresco 17 (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)

Heraeus Megafuge 1.0R (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D)

Heraeus Christ Varifuge K (Heraeus Christ GmbH, Osterode, D)

3.1.2 Verwendete Materialien

3.1.2.1 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) synthetisiert. Oligonucleotide, die in Klonierungsversuchen eingesetzt wurden, wurden per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) aufgereinigt, um die Anzahl falsch-positiver Klone zu reduzieren.

Folgende Oligonukleotide wurden in dieser Arbeit verwendet:

PKHD1_R3931H_F	actgtggtgggagaagatatgcacatgaaggctatgctgggcaag
PKHD1_R3931H_R	ctgcccagcatgacctcatgtgcatacttctcccaccacagt
CTermL19F	ctcgaggccacatgactgcctggctgatct
CTermL19R	ggatcctccctgatcccagttgctc
IZHISF	gcgcagaattcgccacatgctggctctgagctgtctggt
IZHISR	gcgcactcgagcagttgctcctgaatag
RACK1IFF	gcgcaaagcttgccacatgactgagcagatgacccttc
RACK1IFR	gcgcatctagactaagcgtaatctggaacatcgtagggtagcgtgtgc caatggtc
RACK WD40 3-5 F	agcgcaaagcttgccacatgctctgggatctcacaacgggca
RACK WD40 3-5 R	gcgcatctagactaagcgtaatctggaacatcgtagggtaggcacac agccagtagcggta

Rack1 WD40 5-7 F	agcgcaaagcttgccaccatgtggaacctggctaactgcaagc
RACK1del52F	agggatgagaccaacggaattccacagcgt
RACK1del52R	acgctgtggaattccgttggtctcatccct
RACK1del57F	tatggaattccacaggctctgcggggtcac
RACK1del57R	gtgaccccgagagcctgtggaattccata
RACK1del127F	tctggatctcgagataccatcaagctatgg
RACK1del127R	ccatagcttgatggtatctcgagatccaga
RACK1del235_236F	ctagatggtggggacaacgccctgtgcttc
RACK1del235_236R	gaagcacagggcggtgtccccaccatctag
RACK1del260F	agcatcaagatctggtagagggaaagatc
RACK1del260R	gatctttccctctaaccagatcttgatgct
ADAM12-LfullF	gcgcagtcgaccccagcagcgcgcccgtgccgtgtcc
ADAM12-LfullR	tgcgctcgagcttaatataggcggtgtgggtggat

Tabelle 1: Eingesetzte Oligonucleotide für Klonierung und Sequenzierung

3.1.2.2 Verwendete Vektoren

Zur Klonierung von Proteinen, die mit GFP getaggt sind, wurde der pEGFP-C1 (Clontech) Vektor verwendet (Abbildung 8). Das C1 bedeutet, dass das Tag an das C-terminale Ende gebunden wurde. Proteine mit einem His-Tag wurden in den pcDNA6/V5/HIS Vektor (Invitrogen) kloniert (Abbildung 9). Das RACK1-Protein als Insert wurde mit einem HA-Tag in den pRc/CMV (Invitrogen) Vektor kloniert (Abbildung 10). Zu guter Letzt wurde für das ADAM12 in den pCMV/myc Vektor von Clontech kloniert (Abbildung 11).

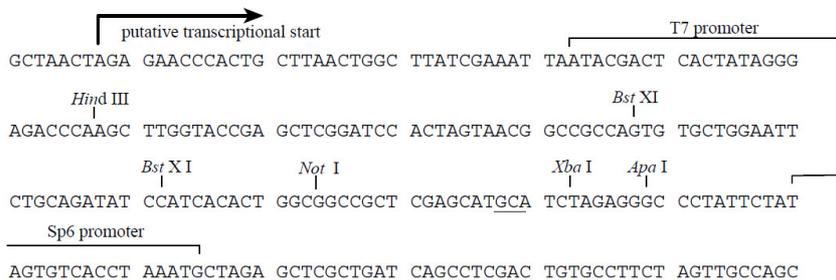
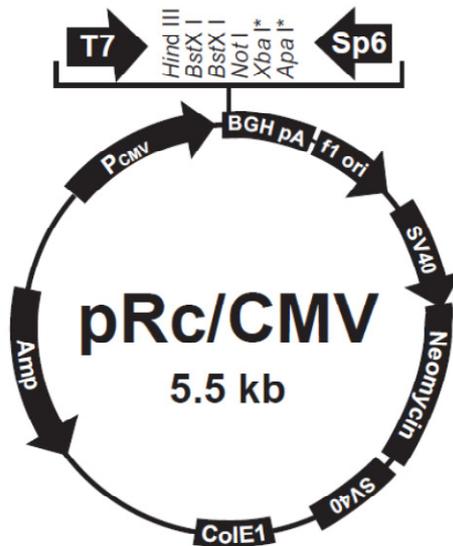


Abbildung 10 Vektorkarte pRc/CMV mit MCS

Selektionsmarker ist Ampicillin mit CMV-promotor und SV40 Ori. High Copy Plasmid von Invitrogen. *Abbildung entnommen aus der beiliegenden Informationsbroschüre*

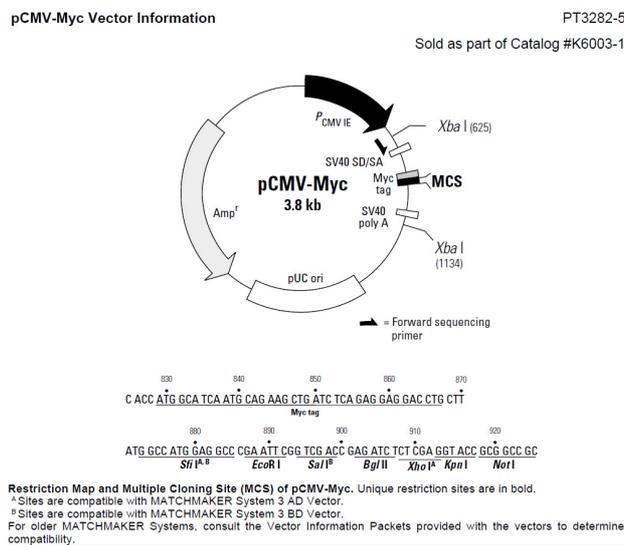


Abbildung 11 Vektorkarte pCMV-Myc mit MCS

Selektionsmarker ist Ampicillin. SV40 ori mit CMV-Promotor. High-Copy-Plasmid von Clontech. *Abbildung entnommen aus der beiliegenden Informationsbroschüre*

3.1.2.3 Eingesetzte Antikörper

Antikörper	Spezies	Firma	Methode
RACK1	mouse	BD Bioscience	IF
ADAM12	rabbit	Abcam	Co-Ip, IF, WB
Calnexin	rabbit	Abcam	IF
E-Cadherin	rat	Abcam	IF
anti-HA	mouse, rabbit, goat	Bethyl und Abcam	IF
anti-His	mouse, rabbit, goat	Bethyl und Abcam	IF
anti-c-myc	goat mouse	Roche, Abcam und Bethyl	IF
anti-HA gekoppelt mit HRP	goat	Miltenyi	WB
anti-His gekoppelt mit HRP	goat	Miltenyi	WB
anti-HA Nanobeads		Miltenyi	CO-IP
anti-His Nanobeads		Miltenyi	CO-IP
Anti-EpCAM-Nanobeads	human	Miltenyi	Primärzellen
Anti-CD40-Nanobeads	human	Miltenyi	Primärzellen
Protein-A Nanobeads		Miltenyi	CO-IP

Tabelle 2: Eingesetzte Antikörper in dieser Dissertation

Antikörper	Spezies	Antigen	Firma	Methode
AlexaFluor 488 IgG (H+L)	goat	mouse	Invitrogen	IF
AlexaFluor 488 IgG (H+L)	donkey	mouse	Invitrogen	IF
AlexaFluor 488 IgG (H+L)	donkey	rabbit	Invitrogen	IF
AlexaFluor 488 IgG (H+L)	donkey	goat	Invitrogen	IF
AlexaFluor 555 IgG (H+L)	goat	mouse	Invitrogen	IF
AlexaFluor 555 IgG (H+L)	goat	rabbit	Invitrogen	IF
AlexaFluor 555 IgG (H+L)	donkey	mouse	Invitrogen	IF
AlexaFluor 555 IgG (H+L)	donkey	rabbit	Invitrogen	IF

AlexaFluor 555 IgG (H+L)	donkey	goat	Invitrogen	IF
AlexaFluor 647 IgG (H+L)	donkey	mouse	Invitrogen	IF
AlexaFluor 647 IgG (H+L)	donkey	rabbit	Invitrogen	IF
AlexaFluor 647 IgG (H+L)	donkey	goat	Invitrogen	IF

Tabelle 3: Eingesetzte sekundär-Antikörper für die Immunfluoreszenz (IF)

3.1.2.4 Medien für die Bakterienkultur

- LB-Medium, Pulver nach Lennox (AppliChem GmbH, Darmstadt, D)
- SOC Broth (Fluka Chemie GmbH, Deisenhofen, D)
- LB-Agar (AppliChem GmbH, Darmstadt, D)

Stamm	Genotyp	Hersteller
JM109	e14–(McrA–) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (rK–mK+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]	Promega, D
One Shot TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80 lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen, USA

Tabelle 4: Eingesetzte Bakterienstämme für die Klonierung

3.1.2.5 Medien für die Zellkultur

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X) (High Glucose) (Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Gibco Opti-MEM I Reduced Serum Media (1X) (Invitrogen, Karlsruhe, D)
- Renal Epithelial Cell Media 2 Ready for use (PromoCell, Heidelberg D)

Final supplement concentrations (after addition to the medium)	Renal Epithelial Cell Growth Medium	Renal Epithelial Cell Growth Medium 2
▪ Fetal Calf Serum	—	0.05 ml / ml
▪ Epidermal Growth Factor (recombinant human)	10 ng / ml	10 ng / ml
▪ Insulin (recombinant human)	5 µg / ml	5 µg / ml
▪ Epinephrine	—	0.5 µg / ml
▪ Hydrocortisone	36 ng / ml	36 ng / ml
▪ Transferrin, holo (human)	5 µg / ml	5 µg / ml
▪ Triiodo-L-thyronine	4 pg / ml	4 pg / ml

Abbildung 12 **Zusammensetzung des Renal Epithelial Cell Media 2**
Ready for use von PromoCell *Abbildung entnommen aus der*
beiliegenden Informationsbroschüre

- 10x PBS (Life Technologies Karlsruhe D)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Life Technologies Karlsruhe D)
- 0,05 % Trypsin (Life Technologies Karlsruhe D)
- Lipofectamin Low Tox (Life Technologies Karlsruhe D)
- Roti Fect + Rotifect Plus(Carl Roth Karlsruhe D)
- Collagenase B (Sigma Aldrich St. Gallen Schweiz)

Bezeichnung	Zelltyp	Herkunft
COS7	Epithelzellen aus der Niere der grünen Meerkatze	Institut für Biochemie; RWTH Aachen
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, epithelien- und fibroblastenartig	Institut für Biochemie; RWTH Aachen
mIMCD-3	Epithelzellen der murinen renalen Sammelrohre	AG Omran, Kinderklinik Freiburg
MDCK II	Epithelzellen aus der Hundeniere	Institut für Biochemie; RWTH Aachen

Tabelle 5: Eingesetzte Zelllinien in dieser Arbeit

3.1.2.6 Reagenzien, Reaktionskits und Enzyme

- Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene San Diego USA)
- DNA-Aufreinigungskit: QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, D)
- DNA-Ligase: T4 DNA Ligase (Promega, Mannheim, D)

- Desoxyribonukleosidtriphosphate:
 - 100 mM dATP, 100 mM dTTP,
 - 100 mM dCTP, 100 mM dGTP
 - (Invitrogen, Karlsruhe, D)

- Gelextraktionskit:
 - QIAquick Gel Extraction Kit
 - (Qiagen, Hilden, D)

- Immunfluoreszenz-Reagenzien:
 - Mowiol 4-88 (Carl Roth, Karlsruhe, D)
 - DAPI (Merck, Darmstadt, D)
 - DABCO (Merck Darmstadt)

- Längenstandards:
 - GeneRuler 1kb DNA ladder
 - (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
 - PageRuler Prestained Protein ladder
 - (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
 - Western Blot Marker Biotinyliert
 - (Cell signaling Life Technologies Karlsruhe)

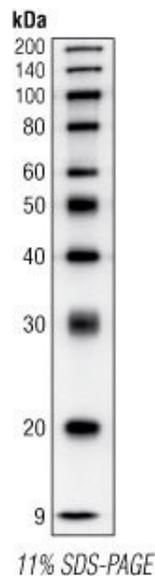


Abbildung 13 **Laufmuster des biotinylierten Western-Blot Markers**

Abbildung entnommen aus der beiliegenden Informationsbroschüre der Firma Cell signaling Life Technologies

- Phosphatase: Alkaline Phosphatase (Shrimp)
(Roche, Mannheim, D)

- Plasmidisolationskit: GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas,
St. Leon-Rot, D)
HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, D)
HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, D)

- Polymerasen: *Taq* DNA-Polymerase rekombinant
(Invitrogen, Karlsruhe, D)
AccuPrime *Taq* DNA Polymerase High Fidelity
(Invitrogen, Karlsruhe, D)

- Protease-Inhibitor-Mix: Protease Inhibitor Cocktail Tablets
(Roche, Mannheim, D)

- Restriktionsendonukleasen:
EcoRI (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
HindIII (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
NotI (Fermentas, St. Leon-Rot, D)
XhoI (Fermentas, St. Leon-Rot, D)

- Sequenzier- Kit BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit
(Applied Biosystems, Darmstadt, D)
- Agarose (Carl Roth Karlsruhe)
- Mini-MACS Zellisolierungskit (Miltenyi Bergisch Gladbach)
- μ MACS Proteinisolierungskit getagged (Miltenyi Bergisch Gladbach)

3.1.2.7 Lösungen und Puffer für die PCR und Gelelektrophorese

➤ dNTP-Lösung	Reagenzien	finale Konzentration
	100 mM dATP	1,25 mM
	100 mM dTTP	1,25 mM
	100 mM dCTP	1,25 mM
	100 mM dGTP	1,25 mM
➤ 2x Agarose-Ladepuffer	Reagenzien	finale Konzentration
	TBE	1x
	Ficoll 400	20 %
	Bromphenol-Blau	0,1 %
➤ 6x Agarose-Ladepuffer	6x DNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Rot, D)	
➤ Puffer	UltraPure 10X TBE Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, D)	
	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (10X) (Invitrogen, Karlsruhe, D)	

3.1.2.8 Medien für SDS-Page und Westen-Blot

➤ Sammelgel-Puffer (4x)	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	0,5 M, pH 8,8
	SDS	0,4 %
➤ Trenngel-Puffer (8x)	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	3 M, pH 6,8
	SDS	0,8 %
➤ Laemmli-Puffer (2x)	Reagenzien	finale Konzentration

	TrisHCl	126 mM, pH 6
	Glycerol	20 %
	SDS	4 %
	Bromphenol-Blau	0,02 %
	B-Mercaptoethanol	4 %
➤ Waschpuffer (PBS-T)	Reagenzien	finale Konzentration
	PBS	1x
	Tween 20	0,05 %
➤ Anodenpuffer I	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	300 mM, pH 10,4
	Methanol	20 %
➤ Anodenpuffer II	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	25 mM, pH 10,4
	Methanol	20 %
➤ Kathodenpuffer	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	25 mM, pH 9,4
	Methanol	20 %
	e-Aminocaprinsäure	40 mM
➤ Laufpuffer	Reagenzien	finale Konzentration
	Tris	0,25 M
	Glycin	1,92 M
	SDS	1 %
➤ Blockierungspuffer	Reagnezien	finale Konzentration
	PBS-T	1x
	Magermilchpulver	5 %
➤ Ponceau S Lösung (10X)	Reagenzien	finale Konzentration
	Ponceau S	2 %

Trichloressigsäure 30 %

Sulfosalicylsäure 30 %

- Lösung A
 - Reagenzien finale Konzentration
 - TrisHCl 0,1 M, pH 8,6
 - Luminol 1,25 M

- Lösung B
 - Reagenzien finale Konzentration
 - p-Coumarinsäure 6,7 mM in DMSO

- Chemilumineszenzlösung (entspricht der ECL-Lösung von Pierce)
 - 1 ml Lösung A
 - 100 µl Lösung B
 - 0,3 µl H₂O₂

3.2 Zellkultur

3.2.1 Passagieren von Zellen

In der Zellkultur gibt es zwei unterschiedliche Methoden, um immortalisierte eukaryontische Zellen in Kultur zu halten.

1. **Adhäsionskultur:** Hierbei bilden die Zellen feste Zellkontakte mit dem beschichteten Boden der Zellkulturschale aus. Meist sind die Böden der Kulturschalen mit Fibronectin beschichtet. Diese Art der Kultur ist die häufigste in der Zellkultur
2. **Flüssigkultur:** Hierbei schwimmen die Zellen frei im Medium. Zellen, die als Flüssigkultur gehalten werden, haben keine Möglichkeit aufgrund ihrer Membranausstattung zu adhären.

Alle in dieser Dissertation verwendeten Zelllinien sind Adhäsionskulturen. Adhäsionskulturen müssen bei einer Konfluenz von ca. 90-95 % passagiert werden, d.h. sie müssen dann auf neue Kulturschalen verteilt werden. Ziel ist, eine Kontakthemmung zu vermeiden, und dass sich die Zellen polarisieren und damit zellbiologisch verändern.

Hierzu werden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 5 min mit 0,05 % Trypsin behandelt. Trypsin zerstört enzymatisch die Zellkontakte mit dem Kulturboden und löst die Zellen somit ab. Je nach Zelllinie werden die Zellen 1:10 bis zu 1:50 verdünnt in neue Kulturschalen überführt.

Als Zellkulturmedium für alle hier verwendeten immortalisierten Zelllinien wurde DMEM mit GLUTA-Max und 10 % FCS eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eine konfluente Kulturschale kann als Reserve eingefroren werden. Pro Platte können vier CryoTubes mit Zellen gefüllt werden. Dazu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin abgelöst.

Da Trypsin langfristig schädlich für die Zellen ist, wurde es durch einen Zentrifugationsschritt entfernt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon überführt und bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Medium neu resuspendiert. Eingefroren wurden die Zellen mit 5 % DMSO und 10 % FCS. Um sie langsam einzufrieren, wurden sie erst bei -80 °C eingefroren und dann in Flüssigstickstoff bei -198 °C aufbewahrt.

Sollten Zellen aufgetaut werden, wurde das Cryo-Tube aus dem Flüssigstickstoff entnommen und schnell mit der Hand aufgetaut, anschließend in 50 ml Falcon mit Medium gegeben und zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wurde ein Cryo-Tube pro Platte angesetzt.

3.2.3 Transfektion von eukaryontischen Zelllinien

Um in Zelllinien das rekombinante Protein zu exprimieren, muss es mit Hilfe eines eukaryontischen Vektors in die Zellen eingeschleust werden (siehe 3.3.4 Klonierung) (Transfektion). Hierfür gibt es mehrere Methoden.

In dieser Arbeit wurde die Lipofektion eingesetzt. Dabei wird der insert-haltige Vektor mit Liposomen umhüllt. Bei Liposomen handelt es sich um kugelförmige Lipiddoppelschichten, die sich in Wasser wie eine Plasmamembran anordnen, so dass das hydrophile Ende außen und das hydrophobe Ende innen orientiert

sind (Abbildung 14). Sie können bei der Entstehung ihrer kugelförmigen Struktur die DNA einschließen und diese endozytotisch in die Zelle einbringen. Es wurde eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 100 mm verwendet. Bei dieser Größe beträgt die eingesetzte Menge an DNA 10 µg .

Dazu wurden 600 µl serumfreies Medium (Optimem™) die DNA und 15 µl Roti-Fect™ gemischt und 30-60 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % transfiziert, vorher gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Der Transfektionsansatz wurde hinzugegeben und mindestens 6-8 Stunden inkubiert. Sollte für die Immunfluoreszenz (siehe 3.4.5) transfiziert werden, wurde statt Roti-Fect Lipofectamine™ verwendet, da Lipofectamine weniger toxisch als Roti-Fect ist. Für Co-Transfektionen wurde je 6 µg pro Vektor eingesetzt.

Beide Ansätze wurden gemischt und dann 60 min inkubiert. Sollten Primärzellen transfiziert werden, wurde Roti-Fect Plus verwendet, das besonders für Primärzellen geeignet ist.

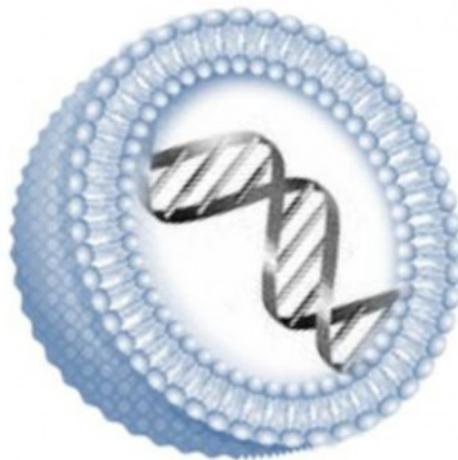


Abbildung 14 **Schematische Darstellung eines Liposoms mit eingelagerter DNA**

Zu sehen ist die Lipiddoppelschicht die einer Plasmamembran ähnelt (*entnommen aus <http://globalmedicaldiscovery.com>*)

3.2.4 Gewinnung von Primärzellen aus der Niere

Primärzellkulturen wurden aus frischem Gewebe gewonnen. Sie sind nicht immortalisiert und damit nur begrenzt passagierbar, meist bis zu Passage fünf. Sie müssen zwar anders behandelt werden als übliche Zelllinien, sie spiegeln aber die *in vivo* Situation besser wider, weil sie nicht biochemisch verändert wurden und aus dem Organverbund stammen.

Ziel war es eine Primärzellkultur von ARPKD-Patienten anzulegen. Voraussetzung dafür war die Entnahme frischen Materials bei Obduktion.

Zur Stabilisierung der physiologischen Umgebung wurde die Probe nach Entnahme in 1x PBS oder 0,9 % NaCl-Lösung transportiert. Bei Abortmaterial wurde das gesamte Material, bei obduzierten Betroffenen ein Querschnitt der Nierenmedulla eingesandt. Zur Etablierung der Methode wurde zunächst mit Nieren von Schweinen gearbeitet, die aus der Tierexperimentellen Abteilung des Universitätsklinikums Aachen stammten.

Zielzellen für die Primärzellkultur sind die Epithelzellen in der Nierenmedulla. Dafür wurde die Niere im Querschnitt aufgeschnitten und ein kleines Stück der Nierenmedulla in ein 50 ml Falcon überführt. Bei ARPKD-Patienten wurde das Stück Niere ebenfalls im Querschnitt aufgeschnitten um ein ca. 1 cm³ großes Stück aus der Nierenmedulla herauszuschneiden. Das übriggebliebene Material wurde für spätere RNA-Isolierung eingefroren.

Das Gewebestück wurde durch mehrmaliges Waschen mit 1x PBS von Blut und Fremdmaterial gereinigt und dann mit einer Kollagenase B Lösung (Konzentration 2 mg/ml) bei 37 °C 30 min inkubiert. Dieser Schritt diente dem Auflösen des umgebenden Bindegewebes und der Lockerung des Gewebes. Um einzelne Zellen aus dem Gewebe zu lösen, wurde das Gewebestück 10 min mit 0,05 % Trypsinlösung behandelt. Nach Ende der enzymatischen Behandlung wurde das Gewebestück aus der Lösung entfernt und die Zellsuspension mit 10 ml DMEM-Medium aufgefüllt.

3.2.5 Isolierung der Epithelzellen aus der Primärzellsuspension mit Hilfe von Magnetic activated cell sorting (MACS)

Nach der enzymatischen Behandlung besteht die Zellsuspension zunächst aus unterschiedlichen Arten von Nierenzellen. Die häufigsten Zellen sind Fibroblasten des Bindegewebes, die auch in der Kultur am schnellsten wachsen würden, daher muss eine Mischkultur auf jeden Fall vermieden werden. Aus diesem Grund ist es von elementarer Bedeutung, spezifisch nur die Epithelzellen in Suspension zu haben, wenn eine Kultur angelegt wird.

Die Zellsuspension wurde bei 1200 rpm zentrifugiert und das Pellet mit dem MACS-Puffer aufgenommen. Nun wurde nach Anleitung des Mini MACS™ Zellisolierungskit (Miltenyi) verfahren. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Das Zellpellet wurde mit dem MACS-Puffer resuspendiert, dann wurde ein spezifischer Antikörper hinzugegeben. Er ist gegen ein Oberflächenantigen (CD40) gerichtet, das nur von Fibroblasten exprimiert wird. Dieser Antikörper ist zusätzlich mit einem magnetischen Nanopartikel markiert. Wird die Zellsuspension auf eine Säule mit eisenhaltigem Material pipettiert und ein Magnetfeld angelegt, werden die Zellen, an denen der Antikörper gebunden ist, in der Säule gehalten. Die anderen Zellen laufen durch. Bei dieser Art handelt es sich um eine negative Isolierung d.h. die Zielzellen laufen durch die Säule.

Als Vergleich wurde auch eine positive Isolierung verwendet, es wurde also mit einem spezifischen Antikörper gegen Epithelzelloberflächenantigene gearbeitet. (Abbildung 15). Der dafür eingesetzte Antikörper war anti-EpCAM. EpCAM ist ein Zelladhäsionsprotein, das als Epithelzellmarker eingesetzt werden kann.

3.2.6 Anlegen einer Primärzellkultur aus Epithelzellen

Die Menge an Zellen, die gewonnen werden, ist pro Gewebestück niedrig. Daher wurden 6 Proben pro Niere eines Schweins entfernt und angesetzt.

Die Zellsuspension nach der MACS-Isolierung wurde auf eine 6-well-Platte mit Medium gegeben. Hierbei handelt es sich um ein Spezialmedium für Epithelzell-Primärzellen.

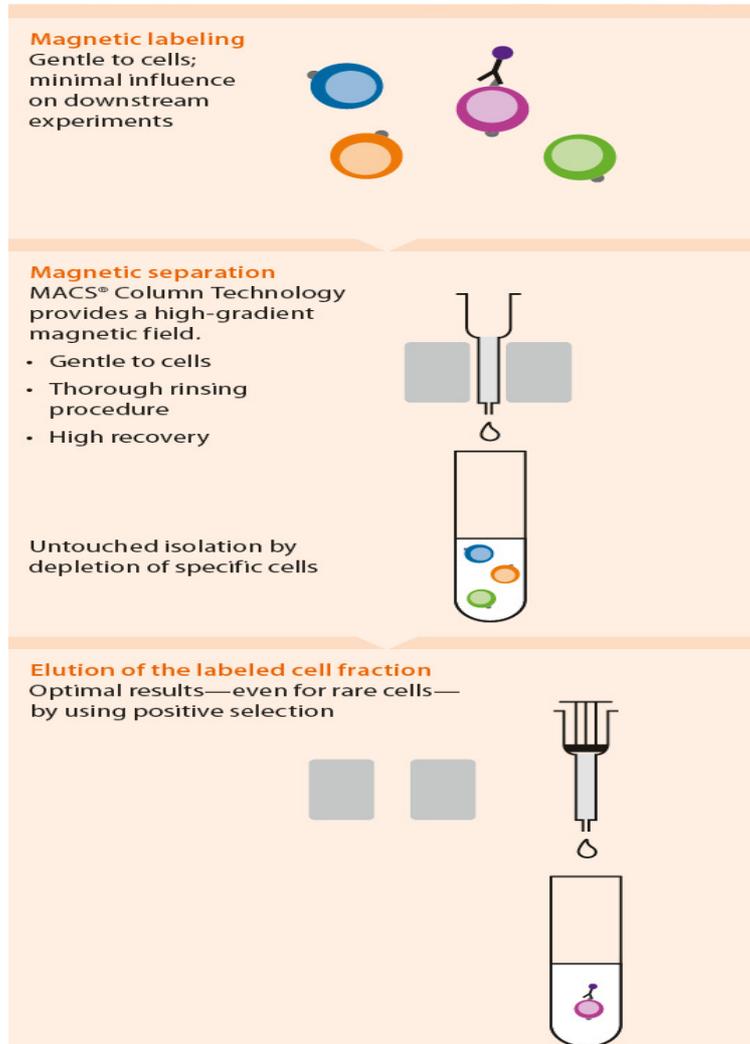


Abbildung 15 Graphische Darstellung des Isolierungsprinzips des MiniMACS™ System von Miltenyi

entnommen aus http://www.miltenyibiotec.com/en/ NN_1146_Basic_principle.aspx

Dieses Medium enthält viele Wachstumshormone in geeigneter Konzentration und einen definierten p-Wert. Weitere Informationen können dem Beiblatt des Mediums entnommen werden (Abbildung 12).

Wenn nach 2-5 Tagen die Zellen angewachsen waren, wurde das Medium gewechselt. Nach ca. 7 Tagen war das Well einer 6-well Platte konfluent bewachsen und es wurden pro 6-Well eine 100 mm Platte angesetzt.

Zur Bestimmung, ob es sich um eine reine Epithelzellkultur handelt, wurde ein Aliquot entnommen und mit Immunfluoreszenz begutachtet. Es wurde als spezifischer Epithelzellmarker der Uromodulin-Antikörper eingesetzt.

Zeigte sich, dass noch Fibroblasten in der Kultur waren, wurde eine zweite Aufreinigung durchgeführt.

Generell ist zu beachten, dass die Primärzellen sehr behutsam zu behandeln sind. Die Primärzellen wurden mit 0,025 % Trypsin abgelöst, das für die Zellen weniger toxisch ist.

3.3 Molekulargenetische Methoden

3.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten erfolgte mit der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Hierbei liefern Sequenz-spezifische Oligonukleotide (Primer) freie 3'OH-Gruppen, die als Ansatzstellen für die DNA-abhängige DNA-Polymerase dienen. Sie ermöglichen die Polymerisation des DNA-Abschnitts. Diese Primer sollen mindestens 20bp lang sein, um eine zufällige Bindung im Genom oder an Vektoren zu verhindern.

Für die PCR gibt es viele verschiedene DNA-Polymerasen, die je nach Anwendung unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Bei der Amplifikation von DNA-Abschnitten, die als Insert für Klonierungen dienen, wurde die AccuPrime™Taq DNA Polymerase (Invitrogen) verwendet. Diese verfügt über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die ihr ermöglicht Fehlpaarungen zu korrigieren und Fehler während der Amplifikation zu verhindern.

Diese Eigenschaft ist relevant, um später weniger bis keine falsch-positiven Klone zu erzeugen. Als Template-DNA diente entweder cDNA (s. 3.3.10) aus der Niere/Leber oder schon archivierte rekombinierte Plasmide. Als Primer dienten die unter 3.1.2.1 aufgeführten Oligonucleotide.

Die Menge Template-DNA beträgt 2 µl bei einem PCR-Ansatz von 20 µl. Wichtig ist, dass die Extending-Temperatur der Accu-Prime-Polymerase je nach Fragmentlänge variiert. Sie beträgt 1 min pro 1000 bp.

PCR-Programm der Accu-Prime

95°C ⇨ 15 min

95°C ⇨ 30 sec
58°C ⇨ 1 min
68°C ⇨ 1min/kb
68°C ⇨ 10 min

} X 25

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte auf einem Agarose-Gel. Dazu wurden die PCR-Produkte mit 2x Agarose-Ladepuffer (3.1.2.8) versetzt und auf Agarose-Gele aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller als größere, wodurch eine Auftrennung nach der Molekülgröße erreicht wird. Um die DNA sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Ethidiumbromid, einem interkalierenden Farbstoff, der sich in die Doppelhelix der DNA einlagert und unter UV-Licht (260 nm) fluoresziert, versetzt. Die verwendeten Gele enthielten 1 % Agarose und 0,02 % Ethidiumbromid in 1x TBE, als Laufpuffer wurde ebenfalls 1x TBE benutzt.

3.3.3 Sequenzierung von PCR-Produkten oder rekombinanten Plasmiden

Alle für die Transfektion von eukaryontischen Zellen (siehe 3.2.3) verwendeten Plasmide, die nach Standard-Protokollen generiert wurden, wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Um die genaue Sequenz zu ermitteln, wurde nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger verfahren. Die Sequenzierung der zu untersuchenden DNA wurde bei der Firma Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben oder in unserem Institut durchgeführt. Bei der kommerziellen Sequenzierung wurden 200 bis 400 ng der in A. dest. gelösten DNA zusammen mit 10 bis 20 pmol des entsprechenden Primers in einem Eppendorfgefäß bei 50 °C getrocknet. Anschließend wurde es der Firma zur Durchführung der Sequenzier-PCR und anschließenden Analyse zugeschickt. In den Fällen, in denen die Sequenzierung im institutseigenen Labor stattfand, lief die Sequenzier-PCR nach folgendem Schema ab:

Sequenzier-PCR-Ansatz

DNA-Probe 50-500 ng

Primer 10 µM

BigDye Terminator v3.3 Ready Reaction Mix 1,5 µl

H₂O ad 10 µl

Programm der Sequenzier-PCR

1. 96°C ⇨ 1:00 min

2. 96°C ⇨ 0:10 min

3. 50°C ⇨ 0:05 min

4. 60°C ⇨ 4:00 min

Die Schritte 2-4 wurden 25-mal wiederholt. Im Anschluss an die Sequenzier-PCR erfolgte die Fällung des PCR-Produktes mit Ethanol und Natriumacetat [49].

Die getrockneten Proben wurden in 20 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) resuspendiert und mit dem ABI Prism 310 oder ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) analysiert. Die Auswertung aller analysierten Proben erfolgte mit Hilfe des Alignment-Programmes von NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.3.4 Klonierung

Zur Klonierung wurden die spezifischen Restriktionsstellen mit Hilfe eines Primers eingefügt. Jeweils am Ende eines Primers wurde die Schnittstellensequenz des Restriktionsenzymes angehängt, die dann ab Zyklus 3 der PCR mit amplifiziert wird.

Da Restriktionsenzyme noch einen kleinen Überhang benötigen, wurden beim Design des Primers sechs Basenpaare an die Schnittstelle zugefügt. Nachfolgend werden die verwendeten Restriktionsenzyme und die damit erstellten Konstrukte aufgelistet (siehe Abbildung 16).

- C-Term-GFP Konstrukt in pEGFP mit *BamHI* und *XhoI*
- C-Term-His Konstrukt in pcDNA6/V5/HIS mit *BamHI* und *XhoI*
- IZ-His Konstrukt in pcDNA6/V5/HIS mit *EcoRI* und *XhoI*
- IZ-GFP Konstrukt in pEGFP-C1 mit *EcoRI* und *XhoI*
- RACK1-HA full length in pRc/CMV mit *HindIII* und *XbaI* an den Primer wurde noch die Sequenz des HA-Tags gehängt der dann auch ab Zyklus 3 amplifiziert wird
- RACK-HA WD40 3-5 in pRc/CMV mit *HindIII* und *XbaI* mit HA-Tag Sequenz
- RACK1-HA WD40 5-7 in pRc/CMV mit *HindIII* und *XbaI* mit HA-Tag Sequenz
- ADAM12 full length in pCMV-Myc mit *Sall* und *XhoI*
- Alle Deletionsmutanten wurden an dem RACK1-HA *full length Konstrukt* erstellt

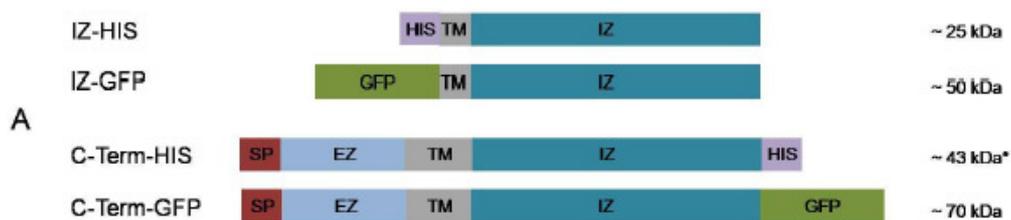


Abbildung 16 Graphische Darstellung der Konstrukte des PKHD1-Gens, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Entnommen aus Dissertation V. Frank [59]

3.3.5 Restriktionsverdau

Vektor und Insert wurden mit Restriktionsendonukleasen behandelt, die spezifisch doppelsträngige DNA erkennen und schneiden. Die jeweiligen Restriktionsbedingungen entsprechen den Herstellerangaben (Fermentas).

Es wurden jeweils 50 µl Ansätze verwendet, die zwischen 200 – 1000 ng DNA und 5 Units des entsprechenden Enzyms enthalten. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 37°C. Die kurze Inkubationszeit war möglich, weil Fast Digest Enzyme der Firma Fermentas verwendet wurden. Anschließend erfolgte gegebenenfalls eine 20-minütige Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme bei

65°C. Die Vektoren wurden im Anschluss an den Verdau mittels alkalischer Phosphatase dephosphoryliert.

Um eine Re-Ligation des Vektors zu vermeiden, werden die Phosphat-Reste am 5'-Ende der linearisierten Plasmid-DNA abgespalten. Dazu wurden zu 5 ng/µl des Vektors je 0,1 U/µl Alkalische Phosphatase und 1x Dephosphorylierungs-Puffer zugegeben und für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden im Anschluss mittels QIAquick PCR Purification-Kit (Qiagen) gereinigt und in einem Volumen von 30 µl eluiert und photometrisch bestimmt.

3.3.6 Ligation

Die geschnittenen Vektoren und Inserts wurden nun über die so genannten Sticky ends verbunden. Dies sind Überhänge, die bei dem Restriktionsverdau entstehen. Bei gleich verwendeten Enzymen sind diese Überhänge komplementär. Der Vektor und das Insert werden dann durch eine Phosphorylierung verbunden (Ligation). Hierzu wurde eine T4-Ligase verwendet. In die Ligation wurden je etwa 100 ng Vektor mit der entsprechenden Menge Insert im Verhältnis 1:3 nach folgender Formel eingesetzt:

$$ng\ Insert = 3 \times \frac{50ng\ Vektor \times bp_i}{bp_v}$$

Für den Ligationsansatz wurde ein Volumen von 10 µl nach Angaben des Herstellers verwendet. Inkubiert wurde ü. N. bei 4 °C oder 2 Stunden bei Raumtemperatur.

3.3.7 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation von Bakterien bezeichnet das Einschleusen von Plasmid-DNA in Bakterienzellen. Dies dient der Vermehrung von Plasmiden. Hierzu wurden 25 - 50 µl chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und 10 µl eines Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben. Zunächst wurden die Zellen für 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei lagerte sich das Plasmid von außen an die Bakterienzellwand an.

Beim folgenden Hitzeschock für 45 sec bei 42°C im Wasserbad gelangte das Plasmid durch die nun durchlässige Zellwand ins Innere der Bakterienzelle. Nach weiteren zwei Minuten Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 500 µl SOC-Medium versetzt und für etwa 60 Minuten bei 37 °C im Inkubator geschüttelt.

Nach der Inkubation wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde bei Raumtemperatur (RT) und 13000 rpm 1 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde bis auf etwa 100 µl verworfen, der Rest des Bakterienpellets anschließend resuspendiert und auf einer weiteren Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte über Nacht (ü.N.) im Brutschrank bei 37 °C. Je nach Selektionsstrategie wurden Ampicillin- oder Kanamycin-Agarplatten verwendet. Nur Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen haben, können durch die erworbene Resistenz wachsen.

3.3.8 Anlegen von Glycerolstocks

Um Bakterienkulturen für längere Zeit zu lagern, ohne sie permanent in Kultur halten zu müssen, können diese als sogenannte Glycerolstocks bei einer Temperatur von -70 °C eingefroren werden. Das Glycerol dient hierbei als Frostschutzmittel, das ein Platzen der Bakterienzellen durch die Eiskristalle verhindert. Dazu wurden 850 µl einer Bakterienkultur mit 150 µl autoklaviertem 80 %igem Glycerol in einem Reaktionsgefäß versetzt, gut vermischt und sofort bei -70 °C eingefroren, um ein Absetzen des Glycerols zu vermeiden.

3.3.9 Anlegen von Übernachtskulturen und Plasmid-Isolation

Je nach Verwendung wurden 5 - 500 ml LB-Medium mit einem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion versetzt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde entweder eine Kolonie von einer Agarplatte oder etwas Material aus einem Glycerolstock entnommen und in das Medium gegeben.

Die angeimpften Kulturen wurden ü. N. bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen mit Hilfe von Plasmidisolierungskits bearbeitet und die Plasmide isoliert.

Als Kits wurde Midi oder Maxi Kits™ der Firma Quiagen oder bei kleinen Volumina das Gene-Jet Mini-Präp Kit™ der Firma Fermentas angewendet. Es wurde nach Anleitung gearbeitet. Am Ende wurde die DNA-Konzentration piezoelektrisch gemessen.

3.3.10 cDNA Synthese aus humaner Nieren-RNA

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Nieren-RNA stammte von der Firma Invitrogen. Es handelt sich hierbei um einen humanen mRNA-Pool aus der Niere, d. h. alle mRNAs, die in der Niere exprimiert werden, können hieraus mit Hilfe der Reversen-Transkription auf cDNA-Ebene dargestellt werden. Es wurde mit dem First Strand cDNASynthesis Kit™ der Firma Fermentas gearbeitet. Als Template-RNA wurde 2 µl des humanen Nieren-mRNA Pools verwendet.

Es wurde nach Anleitung gearbeitet. Das genaue Synthese-Programm kann der Anleitung entnommen werden.

3.3.11 Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese wurde mit dem QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) durchgeführt. Die Methode beruht auf einer PCR, die an einem Plasmid durchgeführt wird, wobei das Plasmid als Ganzes repliziert wird. Durch die Wahl geeigneter Mutagenese-Primer wird dabei die Sequenz an einer gezielten Stelle verändert. Im Anschluss erfolgte ein Restriktionsverdau, der den methylierten Vektor, der als Vorlage für die PCR diente und die gewollte Sequenzveränderung nicht beinhaltet, schneidet. Die in der PCR entstandenen Plasmide bleiben ungeschnitten und stehen für weitere Klonierungsschritte zur Verfügung.

Bei allen Schritten wurde nach Herstellerangaben verfahren. Als Template dienten je 5-10 µg Plasmid, die PCR umfasst 20 Zyklen.

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Coimmunopräzipitation (Co-IP) mit dem μ -MACS System

Die Coimmunopräzipitation dient der Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen. Sie ist ein sehr bekanntes und anerkanntes Mittel um Interaktionen zwischen Proteinen zu identifizieren (Abbildung 17).

Das Zielprotein wird mit einem Antikörper aus einem Zelllysate isoliert. Im vorliegenden Fall das C-terminale Konstrukt von FPC. Durch die Bindung des Antikörpers wird das Zielprotein präzipitiert. Alle Proteine, die eine ausreichende Interaktion mit dem Zielprotein ausprägen, werden ebenfalls präzipitiert. Diese Proteine können anschließend im Western-Blot in der so genannten Co-IP-Lane nachgewiesen werden.

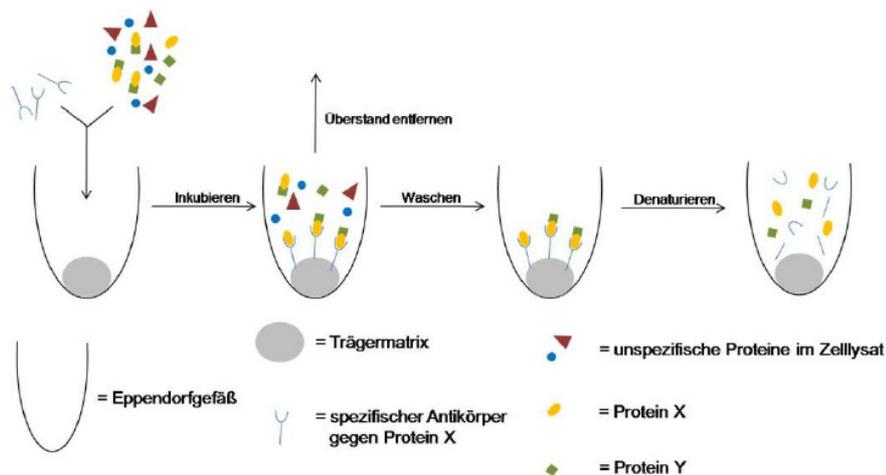


Abbildung 17 Schematische Darstellung der Coimmunopräzipitation

Entnommen aus Dissertation V. Frank [59]

Das μ -MACS-System funktioniert ähnlich wie das Zellisolierungskit. Die zu untersuchenden Proteine wurden vorher durch Klonierung mit einem *Tag* versehen. Dann wurden beide Konstrukte in eine geeignete Zelllinie cotransfiziert, so dass in der Zelllinie beide Konstrukte exprimiert werden. Nun wurde zu dem Zelllysate zum einen ein mit Magnet-Beads markierter anti-HA Antikörper hinzugegeben, der das Zielprotein präzipitiert.

Der Proteinkomplex, bestehend aus Antikörper-Zielprotein und möglichem Interaktionspartner, wird durch das angelegte Magnetfeld an die Säule

gebunden. Das folgende sehr stringente Waschen mit Wash-Puffer entfernt unspezifisch gebundene Proteine von der Säule und vom Antikörper. Der Elutionspuffer kann den Proteinkomplex von der Säule lösen und dieser kann dann in der SDS-Page aufgetrennt werden. Anschließend wird der Komplex im Western-Blot untersucht. Es wurde die gesamte Menge an Eluat aufgetragen. Durch die direkte Bindung des Zielproteins über das *Tag* ist die Effizienz der Präzipitation sehr hoch. Die mögliche unspezifische Bindung anderer Proteine wird damit minimiert. Das genaue Vorgehen ist der Kitanleitung zu entnehmen.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Lämmli verfahren [60], bei der mit einem diskontinuierlichen System aus zwei Gelen, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben) gearbeitet wird. Die beiden Gele unterscheiden sich hinsichtlich ihres pH-Werts, der Ionenstärke und ihres Vernetzungsgrads. Das Sammelgel dient zur Konzentrierung der Proben, die dann anschließend im Trenngel ihrer molekularen Größe nach aufgetrennt werden. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 4 %, das Trenngel je nach Proteingröße 10 oder 12 %. Die Geldicke betrug 1 mm.

Zusammensetzung von 6 ml Sammelgel

30% Acrylamid/Bisacrylamid 0,8 ml

4x Sammelgel-Puffer 1,5 ml

A.dest. 3,7 ml

Kurz vor dem Gießen hinzufügen:

TEMED 6 µl

APS (20 %) 16,2 µl

Zusammensetzung von 12 ml Trenngel 10 %:

30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 4,1 ml

8x Trenngel-Puffer 1,5 ml

A.dest. 6,4 ml

Zusammensetzung von 12 ml Trenngel 12 %:

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) 4,9 ml

8x Trenngel-Puffer 1,5 ml

A. dest. 5,6 ml

Kurz vor dem Gießen hinzufügen:

TEMED 6 μ l

APS (20 %) 30 μ l

Die Gelträger, bestehend aus einer Glasplatte und einer Platte aus Aluminiumoxid, wurden mit Hilfe des Gelgießsystems von Bio-Rad gegossen. Zuvor wurden die Platten je einmal mit Ethanol (70 %) und A. dest. gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen durch Fremdproteine zu vermeiden. Das angesetzte Trenngel wurde kurz nach der Zugabe des Radikalstarters APS und des Polymerisations-Katalysators TEMED zwischen die beiden Platten gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet. Dadurch wurden Luftblasen entfernt und eine ebene Geloberfläche geschaffen. Nach einer Inkubation von ca. 10 Minuten bei 50 °C im Wärmeschrank wurde das Isopropanol abgeschüttet und es erfolgte ein mehrmaliges Ausspülen mit A. dest..

Die Komponenten des Sammelgels wurden nach obenstehenden Angaben vermischt und zur Überschichtung des Trenngels genutzt. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesteckt, um Taschen für das Auftragen der Proben zu erhalten.

Nach dem vollständigen Auspolymerisieren, das für ca. 15 Minuten bei RT ablief, wurde das Gel in die Gelkammer eingesetzt, und die obere und untere Pufferkammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Der Kamm wurde aus dem Sammelgel entfernt.

Anschließend folgte das Auftragen der Proben. Um die Größe der Proteine abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Größenstandard aufgetragen.

Dieser Größenstandard dient als Laufkontrolle. Im Western-Blot kann er weiterhin als Größenstandard genutzt werden, da er biotinyliert ist und mit einem Antikörper gegen Biotin nachgewiesen werden kann.

Um die Proben in das Gel einlaufen zu lassen, muss eine Spannung von 120V angelegt werden. Erreichte die Bromphenolblau-Bande des Ladepuffers den unteren Rand des Trenngels, wurde die Elektrophorese gestoppt.

3.4.3 Western-Blot

Den Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Trägermembran über ein elektrisches Feld, bezeichnet man als Western Blot. Die Proteine werden dadurch immobilisiert und stehen für weitere Versuche, z.B. deren immunologischen Nachweis, zur Verfügung. Durch die Übertragung auf die Nitrocellulose-Membran werden die Proteine dort durch ionische Wechselwirkungen gebunden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Semidry-Blotsystem Fastblot B34 der Firma Biometra verwendet. Geblottet wurde unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems auf eine Nitrozellulose-Membran, deren Größe den Maßen des Gels entsprach (5 x 6 cm). Dazu wurden die Membran und zwei Lagen Whatman-Papier zuerst für mindestens 5 Minuten in Anodenpuffer II inkubiert, je 5 Lagen Whatman-Papier der entsprechenden Größe wurden in Anodenpuffer I bzw. Kathodenpuffer getränkt.

Es erfolgte die Schichtung der einzelnen Komponenten nach Herstellerangaben, wobei darauf geachtet wurde, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bildeten. Anschließend wurde die Blotkammer mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer verlief bei einer Spannung von 150 mA pro Membran über 45 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach dem Transfer wurden die Proteine auf der Nitrozellulose mit Ponceau S reversibel angefärbt, um den Proteintransfer zu bestätigen. Das überschüssige Ponceau S wird am Ende mit Wasser entfernt.

3.4.4 Immunologischer Nachweis der Proteine

Unter einer immunologischen Detektion versteht man den spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Ein primärer Antikörper erkennt dabei eine spezifische Peptidsequenz und bindet diese.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Immunedektion sowohl primäre Antikörper verwendet, die schon HRP (horseradish peroxidase)-gekoppelt sind wie auch sekundäre Antikörper die einen primären Antikörper erkennen.

Das Prinzip besteht darin, dass das HRP das Wasserstoffperoxid umsetzt. Dabei entstehen Sauerstoffradikale die mit dem Luminol reagieren. Dabei entsteht Licht einer für das menschliche Auge nicht wahrnehmbaren Wellenlänge. Wird die Nitrozellulose Membran auf einen Röntgenfilm gelegt, wird dieser an der Stelle, an der Protein–Antikörper-Komplexe vorliegen, belichtet. Dies wurden dann in der Membran autoradiographisch detektiert.

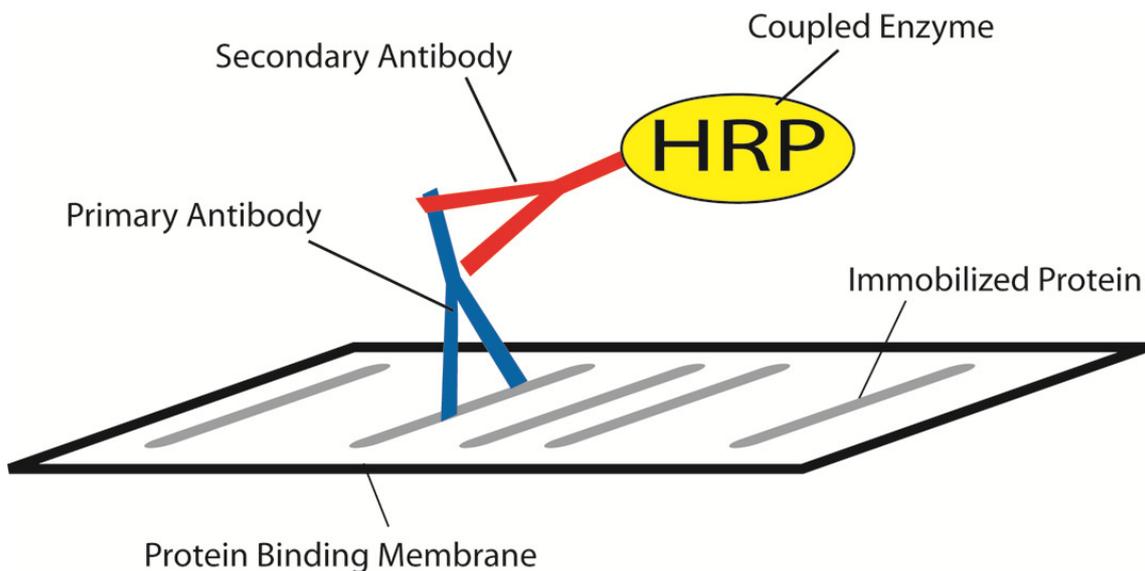


Abbildung 18 Graphische Darstellung der Immundetektion mit HRP

Entnommen aus (<http://info.gbiosciences.com/Portals/127518/images/Western%20image.jpg>)

Das Prinzip der Immundetektion wird auch bei der Immunfluoreszenz eingesetzt (s. 3.4.5) Dort ist der Antikörper nicht mit HRP gekoppelt, sondern mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird sichtbar, wenn er mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird. Dabei emittiert dieser Farbstoff Licht einer längeren Wellenlänge als der, mit der er bestrahlt wurde. Dieses Licht kann dann in der Mikroskopie (s. 3.4.6) detektiert und lokalisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nitrozellulose nach der Inkubation in Ponceau mit Waschpuffer (1x PBS) gründlich gewaschen und anschließend für 1 Stunde bei RT in Blockierungspuffer (5 % Magermilchlösung) schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper in den folgenden Schritten zu minimieren. Nach dem Blocken wurde die Membran gründlich mit Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte ü. N bei 4 °C und unter Schütteln in einem Volumen von 10 ml Waschpuffer.

Zusätzlich wurden die verdünnten primären Antikörper mit 0,09 % Natrium-Azid versetzt, um ihre Haltbarkeit für den mehrmaligen Gebrauch zu verbessern. Nach Entfernen des primären Antikörpers und dreimaligem kurzen Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran mit 1 ml selbst hergestellter ECL Lösung behandelt. Diese ECL-Lösung vermittelt die entstehende Chemolumineszenz.

Wurde ein sekundärer Antikörper verwendet, dann wurde die Membran für 30 min mit dem sekundären Antikörper in 10 ml Waschpuffer bei RT geschüttelt. Es folgten drei kurze Waschschriffe und drei Waschschriffe für je 5 min bei RT und unter Schütteln.

Nach Abschütten der Waschlösung wurde die Membran mit einem Volumen von 1 ml selbst hergestellter Chemilumineszenz-Lösung für 1 min benetzt und anschließend zwischen zwei Plastikfolien gebracht, wobei der Großteil der Flüssigkeit durch Herauspressen entfernt wurde. Anschließend erfolgte die Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

3.4.5 Immunfluoreszenz (IF)

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode um mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten-Antikörper Proteine in der Zelle sichtbar zu machen und damit einen besseren Einblick in die Lokalisation und mögliche Funktion zu erhalten. Auch ist es möglich, damit die Interaktion zwischen Proteinen in der Zelle sichtbar zu machen und die Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, die *in vitro* bei der Coimmunopräzipitation erlangt wurden.

Die Immunfluoreszenz basiert darauf, dass Antikörper in die Zelle gelangen, dort ihre spezifischen Antigene binden und diese markieren.

Die Fluoreszenz wird dann mit Hilfe eines speziellen Mikroskops analysiert und in Bildern angezeigt.

Zu Beginn der Immunfluoreszenz wird eine 24-well Platte mit kleinen 1.5 mm dicken Glasplättchen gefüllt. Bei manchen Zelllinien, wie zum Beispiel HEK290 oder COS7 mussten die Glasplättchen dann noch mit Poly-L-Lysin beschichtet werden.

Andere Zelllinien, wie IMCD-3 Zellen oder MDCK, konnten ohne Poly-L-Lysin auf den Glasplättchen wachsen. Nun wurden je 1 ml DMEM-Medium pro Well hinzugegeben und die Zellen 1-2 Tage inkubiert. Es folgte entweder die sofortige Weiterführung mit Fixierung oder es wurden nun transient Proteinkonstrukte transfiziert und diese nach 24 Stunden weiterbehandelt. Der folgende Ablauf war identisch, unabhängig davon ob es sich um transfizierte Zellen oder „normale“ Zellen handelte. Die 24 Well-Platte wurde gewaschen und mit Fixierungsmittel fixiert. Dabei werden die Zellen durch Austrocknung und Denaturierung der Proteine fest an die Glasoberfläche fixiert. Die Inkubationszeit betrug bei Methanol 8 min bei 4 °C und bei 4 % Paraformaldehyd 15 min bei 4 °C und 5 min RT. Nun musste sehr vorsichtig mit 1x PBS gewaschen werden. Ansonsten werden die Zellen weiter zerstört und sie liefern dann keine brauchbaren Ergebnisse.

Es folgte der Blockierungsschritt mit 1 % BSA für 30 min, anschließend der Permeabilisierungsschritt, falls Paraformaldehyd angewendet wurde. Paraformaldehyd permeabilisiert die Membran nicht wie Methanol, deswegen muss mit Tween 20 die Zellmembran permeabilisiert werden. Nur durch eine Zellmembran, die permeabilisiert wurde, können Antikörper in die Zelle gelangen. Die Zellen nennt man dann als Übergang Sphäroblasten.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit 0,25 % Tween20 permeabilisiert. Zusätzlich wurde als pH-Stabilisator noch 75 mM NH₄Cl genutzt. Das sollte für eine stabilere Antikörper-Antigen-Bindung sorgen. Während alle Schritte in einer 24-Well Platte durchgeführt wurden, wurden nun die Glasplättchen mit den fixierten Zellen und dem primären Antikörper inkubiert. Dafür wurden sie mit einer Pinzette vorsichtig aus dem Well gelöst und in eine Plastikschaale mit Parafilm übertragen. Auf diesem Parafilm wurden die Tropfen mit Antikörperverdünnung übertragen und die Glasplättchen mit der Zellseite auf diesen Tropfen gelegt. Nach ca. einer Stunde bei RT wurden die Plättchen mit 1x PBS gewaschen und mit dem sekundären Fluoreszenz-Antikörper für 15-30 min inkubiert. Das Färbeprinzip ist hier die indirekte Immunfluoreszenz. Der sekundäre Antikörper erkennt den Fc-Teil des primären Antikörpers und bindet ihn. Nur durch diese Bindung entsteht die eigentliche Färbung.

Nun folgt der letzte Schritt, das Einbetten in 8 µl Mowiol und 0,25 % DABCO. Pro Objektträger können bis zu vier Glasplättchen benutzt werden. Nach 24 Stunden trockneten sie bei RT und Dunkelheit. Sie konnten nun in der Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

3.4.6 IF-Mikroskopie

In der IF-Mikroskopie wurden die Präparate mit einem speziellen IFMikroskop analysiert. Dieses Mikroskop sendet Licht einer bestimmten Wellenlänge auf die markierte Probe, so dass diese Licht einer bestimmten Wellenlänge zurück emittiert. Das emittierte Licht wird durch einen Filter im Mikroskop gelenkt, so dass am Okular nur noch Licht einer Wellenlänge ankommt. Dieses Licht kann dann im Okular wahrgenommen werden. Der genaue Aufbau eines IF-Mikroskops ist in Abbildung 19 zu sehen.

Für nähere Details, wie ein IF-Mikroskop funktioniert sei auf die beiliegenden Anleitungen und Broschüren der Firma Zeiss verwiesen.

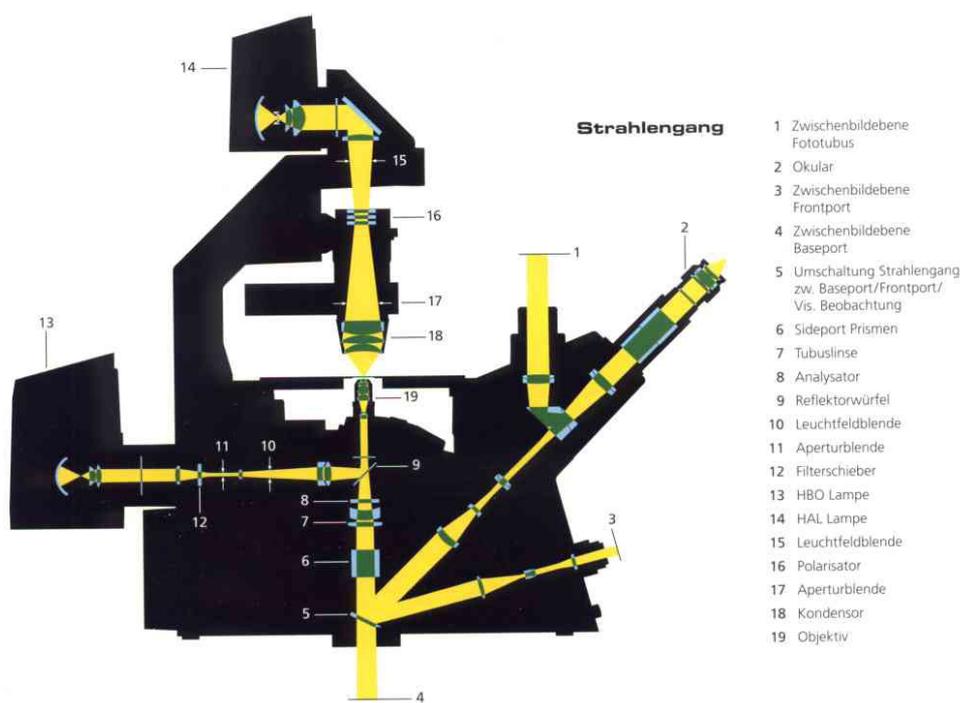


Abbildung 19 **Aufbau eines Axiovert observer-IF-Mikroskops von Carl Zeiss GmbH**

Zu sehen in gelb ist der Strahlenverlauf im Mikroskop und die wichtigsten Gebrauchselemente; *entnommen aus der Informationsbroschüre von Zeiss*

Das Entfernen von Licht, welches aus nicht-fokussierten Bereichen in die Fokusebene strahlt, ist in der Fluoreszenzmikroskopie eine wesentliche Voraussetzung für die scharfe Darstellung von Strukturen im 3-dimensionalen Kontext. Grundlage dafür ist die digitale Aufnahme eines 3-dimensionalen Datensatzes. Die zugehörige Software Axiovision™ von Zeiss kann so genannte Z-Stapel von dem Präparat erstellen, so dass ein genaueres Bild in Relation zu der 3D-Struktur des Präparats entsteht. Die Software weist das Mikroskop an, alle 0,24 µm ein Schichtbild zu machen. Es kann eingestellt werden, wie viele einzelne Schichtbilder gemacht werden sollen. Es ist wichtig, um besser abschätzen zu können, ob es sich um eine Kolo-kalisation der Proteine handelt oder nur um eine Überlagerung der Fluoreszenz aus unterschiedlichen Ebenen. Das Problem bei solchen Aufnahmen ist das bei der Abbildung eines 3-dimensionalen Objektes in verschiedenen optischen Ebenen, das Ergebnis nicht der wirklichen Form dieses Objektes entspricht. „Das Bild wird nach dem Passieren des Strahlengangs verzerrt. Physikalisch ausgedrückt: das Objekt wird mit der sogenannten Point-Spread Funktion (PSF) des jeweiligen optischen Systems "gefaltet" (Konvolution = Faltung). Die PSF beschreibt die Art und Weise, wie das Licht eines punktförmigen Objektes durch das optische System wiedergegeben wird. Die Konvolution kann mathematisch weitgehend rückgängig gemacht werden, wenn die PSF und damit der Verzerrungsgrad bekannt ist. Die Abbildung wird mit der PSF wieder "entfaltet" (Dekonvolution = Entfaltung) und die Ursprungsform des Objektes damit rekonstruiert“ (zitiert von der Zeiss-Homepage).

Genauere Informationen können der Anleitung der Software entnommen werden.

3.5 RACK1 Patientenkollektiv

14 Patienten die einen ARPKD Phänotyp zeigen, aber bis zum jetzigen Zeitpunkt keine identifizierte Mutation im Gen *PKHD1* besitzen und nicht aufgeklärt werden konnten, wurden für das Gen *GNB2L1* (NM_006098) sequenziert. Alle 8 Exons (insgesamt 1125 bp) des Gens wurden mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung sequenziert und mit dem Programm Seq-Pilot™ (JSI) analysiert.

Bei zwei Familien (F1464 und F1534) lagen von den Indexpatienten nur sehr wenig DNA vor, so dass entschieden wurde für das Screening DNA eines Elternteils einzusetzen. Wäre eine Mutation gefunden worden, wäre sie beim Index bestätigt worden.

F-Nummer	M-Nummer	Untersuchte Person	Verdachtsdiagnose
1417	7125	Index	ARPKD
1432	7232	Index	ARPKD
1476	7859	Index	ARPKD
1464	8314	Vater	ARPKD
1489	7998	Index	ARPKD
1491	8063	Index	ARPKD
1534	9948	Mutter	ARPKD
1574	9435	Index	ARPKD
1610	9946	Index	ARPKD
1654	10865	Index	ARPKD
239	11372	Index	ARPKD
1189	4645	Index	ARPKD
FD129	2640	Index	ARPKD
1495	8146	Index	ARPKD

Tabelle 6: Untersuchte Familien im RACK1 Patientenkollektiv

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der Methode zur Gewinnung von Primärzellen aus Nierengewebe von ARPKD-Patienten

Vor Beginn der Arbeit mit humanem Patientenmaterial wurde die Etablierung der Methode an Schweinenieren getestet. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Kollagenase B und Trypsin in Kombination am effektivsten war. Damit konnte ohne Beschädigung des Gewebes eine ausreichende Menge an Zellen gewonnen werden. In den Experimenten zur Bestimmung der optimalen Konzentration waren 2 mg/ml Kollagenase für 30 min und 10 min 0,05% Trypsin diejenige, mit der die meisten Zellen aus dem Gewebe herausgelöst werden konnten. Die entsprechend behandelten Zellen konnten wiederum am schnellsten an der Platte adhären und zeigten nach mehrmaligem Umsetzen die beste Teilungsaktivität.

Zu Beginn wurden mehrere Möglichkeiten ausgetestet, wie das Zellgemisch Epithelzellen/Fibroblasten optimal selektioniert werden konnte.

- 1.) Mit Hilfe von Zellfiltern mit unterschiedlichem Durchmesser und Medien, die nach der Literatur selbst hergestellt wurden.
- 2.) Auf der anderen Seite konnte man die Zellen mit einem Selektionsmedium und der MACS-Selektion auftrennen.

Letztendlich erwies sich das Vorgehen mit einem Selektionsmedium für Epithelzellen der Firma PromoCell und der Zellisolierung von Miltenyi als die vielversprechendste Methode. Damit die Zellzahl nicht zu gering war, mussten die Nierenepithelzellen vom Schwein in einer 6-Well-Platte angesetzt werden. Ab diesem Zeitpunkt war die Methode zur Anlegung von Primärzellen aus der Niere etabliert. Es konnte von nun an mit Patientenmaterial gearbeitet werden. Die Zellisolierung mit dem MiniMACS-System überlebten die Zellen aus Patientenmaterial ohne großen Verlust, so dass am Ende zwei Fraktionen entstanden.

- 1.) Epithelzellen, die für die Forschung verwendet werden konnten (im nachfolgenden in den Ergebnissen verwendet).
- 2.) Fibroblasten die für diagnostische Zwecke genutzt wurden, wie z.B. DNA-Extraktion und Mutationsanalyse

Um sie nach der Isolierung effektiv zu behandeln, wurden die Zellen erst in 6-Well-Platten aufgenommen und dann auf eine 100 mm²-Platte verteilt. Es wurden zwölf 100 mm²-Platten angelegt, die nach einem bestimmten Schema bearbeitet wurden (Abbildung 20). Die Epithelzellen konnten bis zu fünf Passagen lang ohne große Veränderungen in der Morphologie und der Teilungsgeschwindigkeit passagiert werden. Danach konnte eindeutig ein größeres Absterben der Zellen und eine klar veränderte Morphologie identifiziert werden.

In dem Verhalten nach Passage der Zellen konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen ARPKD-Patienten und Wildtyp-Zellen festgestellt werden. Die Wildtypzellen konnten bis zur Passage 8 weitergezogen werden, die ARPKD-Zellen hingegen nur bis Passage 5. Danach war bei beiden Primärzelllinien keine ausreichende Teilungsaktivität mehr vorhanden.

Es konnte gezeigt werden, dass das Vorgehen, das mit Schweinenierenepithelzellen etabliert wurde, ohne größere Einschränkungen oder Veränderungen auf menschliche Nierenepithelzellen übertragen werden kann. Nur der eingesetzte Antikörper zur Zellisolierung musste ersetzt werden. Es wurde ein Oberflächenmarker-Antikörper gegen humane Zellen verwendet. Dieser konnte ohne Veränderung der Vorgehensweise benutzt werden.

Mit Hilfe des Uromodulin- Antikörpers konnte der Nachweis von Epithelzellen in der Immunfluoreszenz erbracht werden. Uromodulin war primär in der Membran und im Golgi-Apparat der Epithelzellen der Niere lokalisiert (Abbildung 22). Es ist gut zu erkennen, dass Uromodulin in einem höheren Maß auf einer Seite der Zelle nachgewiesen wurde.

Man weiß, dass Uromodulin sehr stark an der apikalen Membran einer Zelle lokalisiert ist. Ob es sich hier auch um die apikale Membran handelt ist nicht zu belegen, aber anzunehmen.

Die Phasenkontrast-Aufnahmen der Primärzellkulturen zeigen, dass es kaum einen Unterschied in Morphologie der Patientenzellen zu den IMCD-Zellen gibt (Abbildung 21).

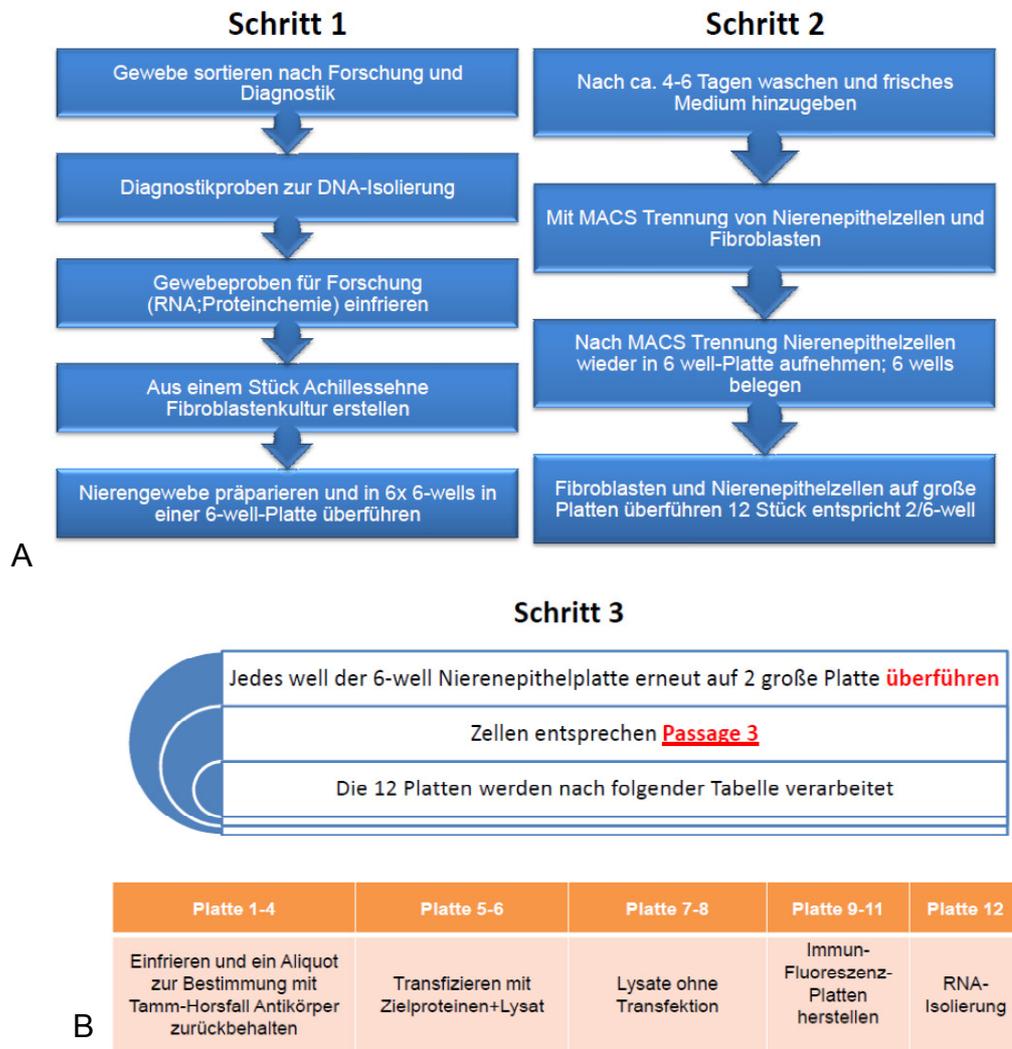
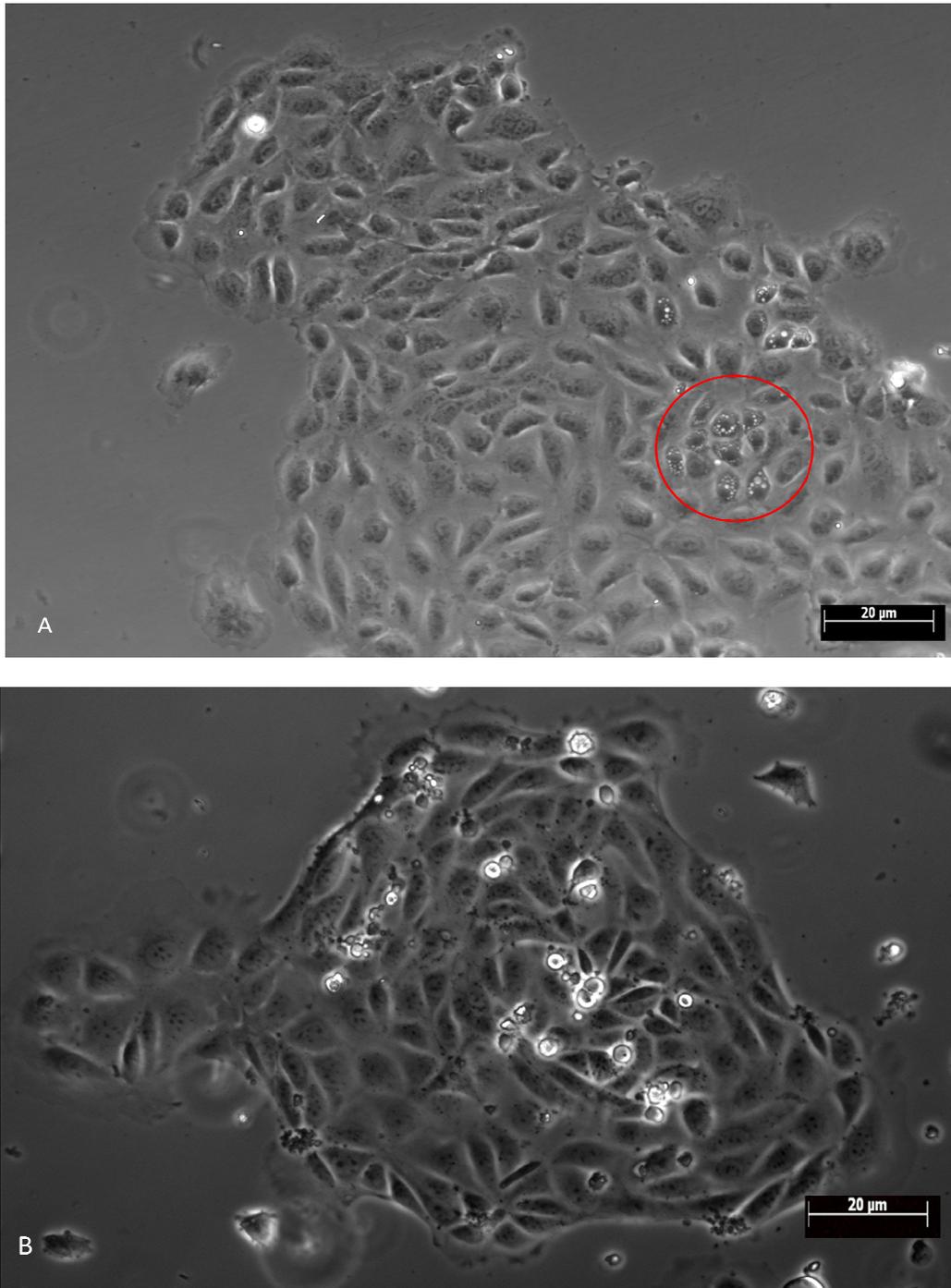


Abbildung 20 **Ablaufschema bei Einsendung von Patientenmaterial zur DNA Archivierung, Fibroblastenkultur und Primärzellen**

A) Für diagnostische Zwecke wurde zur DNA-Isolierung aus der Achillessehne eine Fibroblastenkultur angelegt.

B) Dieser Ablauf gilt nur für die erstellten ARPKD-Nierenepithelzellen zu Forschungszwecken



**Abbildung 21 Phasenkontrast-Aufnahme von Primär-
Nierenepithelzellen und IMCD-Zellen als Kontrolle**

- A) Nierenepithelzellkultur eines ARPKD Patienten. Die typische kubisch-rundliche Form der Epithelzellen ist gut zu erkennen. Der rote Kreis zeigt wahrscheinlich in der Apoptose befindliche Zellen.
- B) IMCD-Zellen als Kontrolle mit sehr ähnlicher Morphologie.

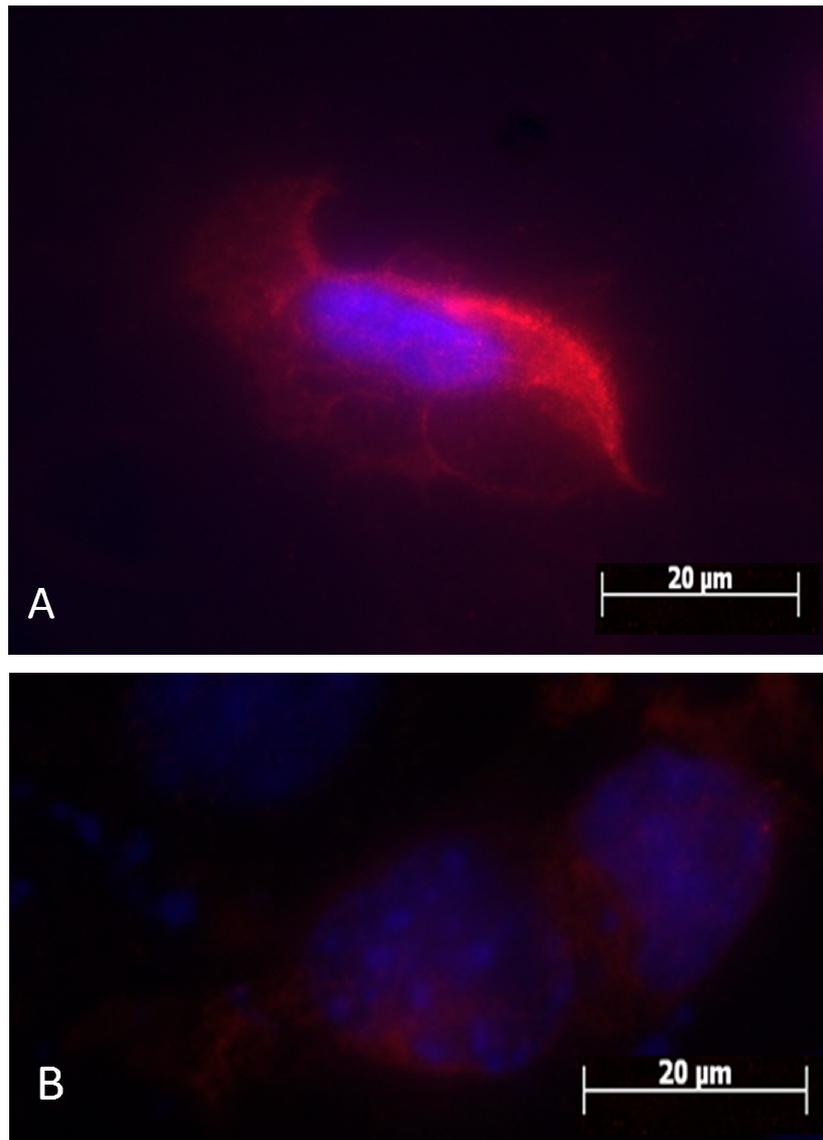


Abbildung 22 IF-Aufnahme einer Epithelzelle eines ARPKD-Patienten.

A) In Blau DAPI-Färbung als Kernfärbung, in Rot der sekundäre Antikörper donkey-Alexa-Fluor 555 anti-Rabbit (Invitogen) mit einer Verdünnung von 1:800, der über indirekte Immunfluoreszenz den Uromodulin-Antikörper (Santa Cruz) bindet. Zu erkennen ist die Lokalisation des Uromodulins in der Plasmamembran und im Golgi-Apparat.

B) Färbungen und Antikörper wie in A. Zum Vergleich eine Fibroblasten-Zelle zur Darstellung des Unterschieds in der Expression der Zelltypen des Proteins Uromodulin. Zu erkennen ist die übliche Hintergrundaktivität eines sekundären Antikörpers.

Durch das Ablaufschema kann eine effiziente und schnelle Bearbeitung des Patientenmaterials gewährleistet werden. Es konnten bis zur vorliegenden Arbeit sechs Primärzellkulturen von humanem Patientenmaterial angelegt werden. Der Phänotyp der Patienten ist der Tabelle 7 zu entnehmen.

Nach molekulargenetischer Diagnostik des Patientenmaterials stellte sich heraus, dass nur bei Patient 5 der angelegten Primärzellkulturen auch die Verdachtsdiagnose ARPKD bestätigen werden konnte.

Dieser Fall ist auch histopathologisch gesichert und es konnte eine Nonsense-Mutation c.3885T>A (p.Tyr1295X) im Exon 32 des *PKHD1*-Gens identifiziert werden (Abbildung 23). Eine zweite Mutation konnte nicht identifiziert werden, ein Befund, der bei ca. 20% der Patienten erhoben wird. Eine Erklärung ist, dass eine zweite Mutation in Regulationsregionen liegt, die nicht analysiert werden. Möglich ist auch, dass eine tief im Intron liegende Mutation vorliegt, die ebenfalls nicht mit Sanger-Sequenzierung detektiert werden kann. Diese intronische Mutation kann das Speißen beeinflussen. Trotz der sichereren histopathologischen Untersuchung kann es sein, dass es sich nicht um eine ARPKD im klassischen Sinne handelt und dass andere Gen-Loci ursächlich für das phänotypische Erscheinungsbild des Patienten sind.

Patient	Phänotyp	Genotyp
F1276	dysplastische Nieren beidseits; Abortmaterial	unbekannt; PKHD1 und HNF1β negativ
F1278	dysplastische Nieren beidseits; Abortmaterial	unbekannt; PKHD1 und HNF1β negativ
F1228	vergrößerte Nieren leichte portale Leberfibrose; Obduktionsmaterial	unbekannt; PKHD1, HNF1β und NPHP3 negativ
F1153	Oligohydramnion; Nierenfehlbildung nicht näher beschrieben und Dandy-Walker-Malformation	Zellweger-Syndrom auswärts diagnostiziert
F1689	Oligohydramnion; Pfeffer-Salz-Muster der Nieren; nach 2 Tagen verstorben an respiratorischer Insuffizienz aufgrund der Lungenhypoplasie	ARPKD PKHD1 Positiv
Kontrolle	Gesundes Nierengewebe von einer Nephrektomie der Niere wegen Tumor; Gesundes Gewebe wurde durch die hiesige Pathologie entnommen	Wildtyp-Kontrolle

Tabelle 7: Phänotyp-Genotyp Korrelation der angelegten sechs Patienten Primärzellkulturen

G C G G G C G N T C C C A C T G
190 197 2

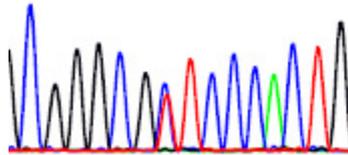


Abbildung 23 Elektropherogramm der *PKHD1*-Mutation c.3885T>A (p.Tyr1295X)

4.2 Ergebnisse der direkten Interaktion zwischen RACK1 und Konstrukten des Fibrocystin-Proteins

4.2.1 Negativkontroll-Blot für das μ -MACS-System

Das μ -MACS-System (3.4.1) basiert auf der magnetischen Markierung der Zielproteine und anschließenden Isolierung über Magnetsäulen und nachfolgend sehr stringenten Waschschritten. Durch die Markierung mit primärem Antikörper und der stringenten Waschschrritte ist die Wahrscheinlichkeit von unspezifisch gebundenen Proteinen gering.

Um dies zu bestätigen, wurde ein Blot ohne transient transfizierte Konstrukte erstellt (Abbildung 24). Es zeigte sich, dass - wie angenommen - keine Proteine unspezifisch gebunden wurden oder mit dem primären Antikörper nachgewiesen werden konnten.

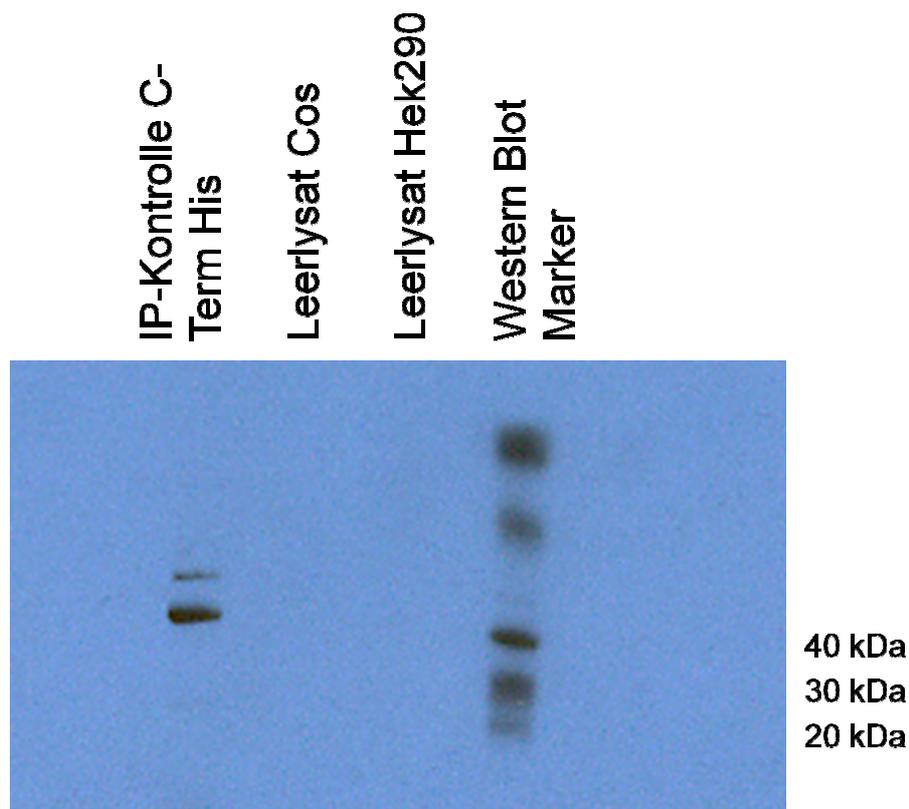


Abbildung 24 Negativkontroll-Blot des MACS-Systems

Zum Nachweis, dass an den MACS-Säulen keine unspezifischen Proteine gebunden werden. Als IP-Kontrolle wurde Fibrocystin-C-Term-His verwendet, als Nachweisstimmung dass transient transfizierte Proteine an der Säule binden und bestimmt werden können. Als Größenstandard wurde ein Westen Blot Marker der Firma Cell Signaling verwendet (Nachweis mit anti-Biotin-HRP im Kit enthalten). Die SDS-Page lief in einem 10%-Polyacrylamid-Gel.

4.2.2 Co-Immunopräzipitation von RACK1 und des C-terminalen Fibrocystin-Konstrukts

RACK1 und das Fibrocystin-C-Term-Konstrukt sind in der Co-Immunopräzipitation in beiden Richtungen nachweisbar. Dadurch ist eine Interaktion in der CO-IP nachgewiesen (Abbildung 25).

Der Nachweis von drei Banden in der IP und Co-IP des Fibrocystin-C-Term-His Konstrukt erklärt sich damit, dass unterschiedlich glykosylierte Proteinkonstrukte entstehen, die in der SDS-Page unterschiedliche Größen aufweisen (42,44 und 46 kDa).

Die Interaktion konnte in allen vier verwendeten immortalisierten Zelllinien (Tabelle 5) nachgewiesen werden. Zur Übersicht wird nur eine Co-IP gezeigt, aber alle Co-IPs wurden immer in allen vier Zelllinien durchgeführt.

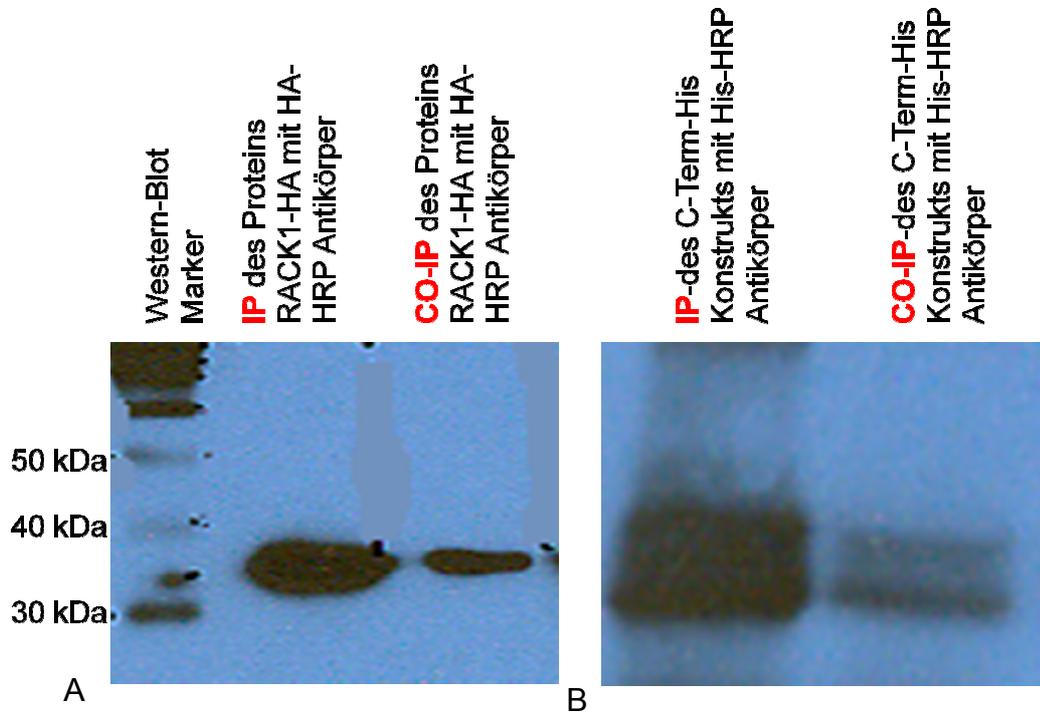


Abbildung 25 Western-Blots der Coimmunopräzipitation mit dem RACK-HA-*full-length*-Protein und dem Fibrocystin-C-Term-His-Konstrukt in COS-Zellen

Der Western-Blot-Marker wurde mit dem im Kit enthaltenen anti-Biotin-HRP-Antikörper nachgewiesen (Cell Signaling). Die Banden wurden mit den primären Antikörpern gegen (A) HA Protein RACK1 und (B) His C-Term Konstrukt (beide Miltenyi) nachgewiesen. Die SDS-Page lief in einem 10%-Polyacrylamid-Gel.

Zusätzlich zu den immortalisierten Zelllinien wurden auch die isolierten Patienten-Primärzellkulturen sowie die WT-Zellen aus der hiesigen Pathologie mit RACK1 und mit dem C-Term Konstrukt transfiziert. Auch in diesen Zellkulturen konnte die Interaktion nachgewiesen werden (Abbildung 26).

Es wurde die ARPKD-Zelllinie des Trägers der Mutation p.Tyr1295X und eine Primärzellkultur der Wildtyp-Nierenzelllinie verwendet.

In mehreren Blots bestätigte sich, dass die Primärzellen ineffizienter zu transfizieren sind und die Expression der Proteine schwach ist.

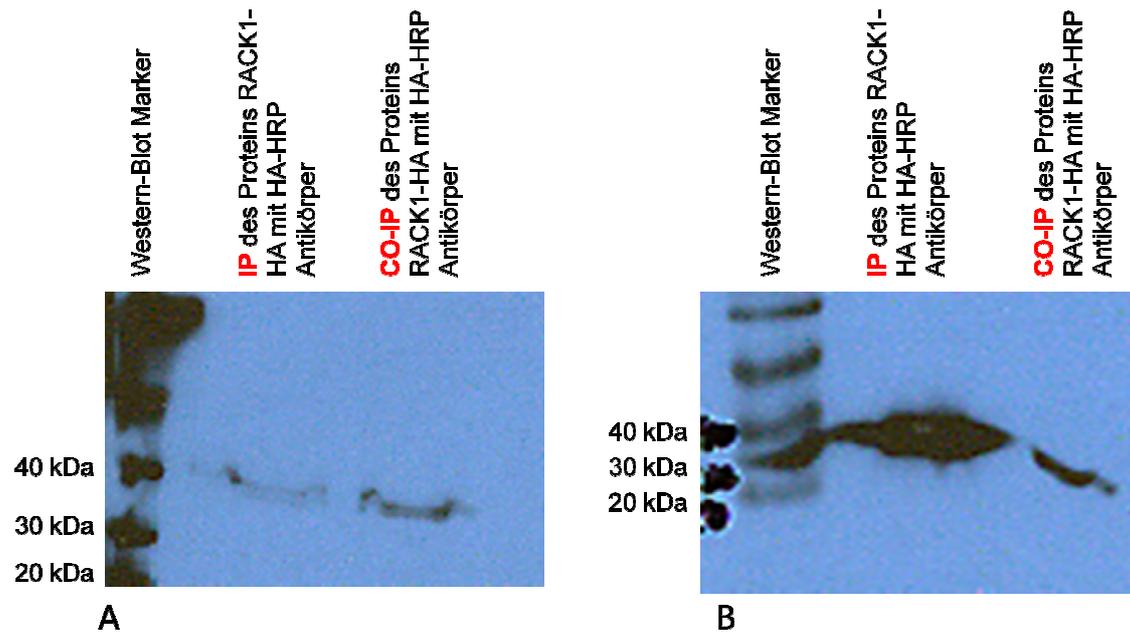


Abbildung 26 Western-Blot der Co-IP mit transfizierten Primärzellen mit RACK1-HA und dem Fibrocystin-C-Term-His Konstrukt

A) Co-IP mit ARP-KD-Primärzellen der Mutation p.Tyr1295X nachgewiesen mit Anti-HA-HRP (Miltenyi) B) Wildtyp-Primärzellen nachgewiesen mit Anti-HA-HRP (Miltenyi). Der Western-Blot-Marker wurde mit dem im Kit enthaltenen anti-Biotin-HRP Antikörper nachgewiesen (Cell Signaling).

In Abbildung 26 ist gut zu erkennen, dass sich die Wildtyp-Primärzellen bei Einsatz einer gleichen Menge an DNA (6 µg) effizienter transfizieren lassen als die ARP-KD-Nierenepithelzellen. Die IP des Proteins RACK1, die als Referenz der Transfektionsfähigkeit gelten kann, ist bei den Wildtypzellen signifikant höher als bei den ARP-KD-Primärzellen. Bei beiden Ansätzen wurde die gleiche Menge an Zellen und auch das gleiche Transfektionsreagenz (Roti-Fect-Plus) eingesetzt.

4.2.3 Immunfluoreszenz Studien in IMCD-Zellen mit RACK1 und dem C-terminalen Konstrukt des Fibrocystin-Proteins

In der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass beide Proteine kolokalisieren und eine Interaktion beider Proteine damit wahrscheinlich ist. Es zeigte sich, dass RACK1 und Fibrocystin-C-Term-GFP bei sich teilenden Zellen in der Teilungsfurche besonders häufig kolokalisieren. Auch ließ sich die Kolokalisation beider Proteine um den Kern herum, also im rauen Endoplasmatischen Retikulum, darstellen. An der Plasmamembran sind in gleicherweise beide Konstrukte lokalisiert.

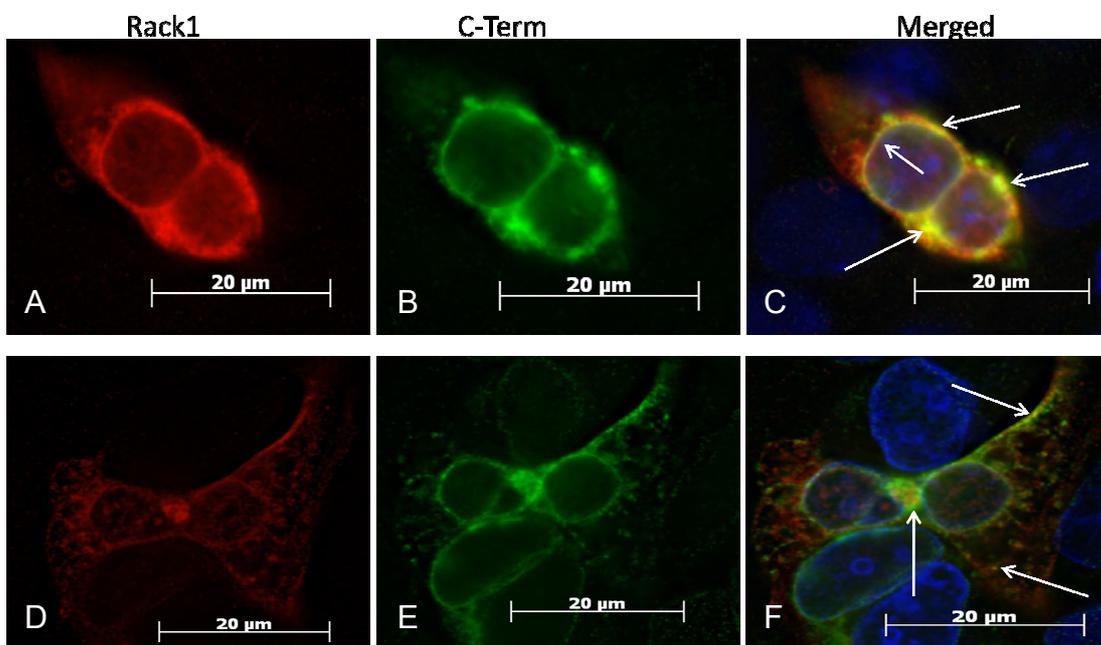


Abbildung 27 Teil 1 Immunfluoreszenz-Studie mit RACK1-HA und dem Fibrocystin-C-Term-GFP-Konstrukt bei sich teilenden IMCD-Zellen.

(A+D) Rot: RACK1-HA markiert mit dem primären Antikörper HA mouse (Bethyl) und als sekundärer Antikörper wurde der Alexa donkey anti-mm 555 (Invitrogen) eingesetzt. (B+E) grün: C-Term-GFP-Konstrukt. Blau: DAPI-Kernfärbung. (C+F) Die Pfeile markieren die Kolokalisation in der Teilungsfurche, an der Plasmamembran und an vesikulären Strukturen Die Bilder wurden in 15 Schichten in Z-Richtung aufgenommen und mit diesen Schichtbildern mit der Methode der Dekonvolution eine Kolokalisation verifiziert. Die Überlagerung wurde mit den Bildern A,E und D,E durchgeführt. Die Fixierung wurde mit Methanol und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

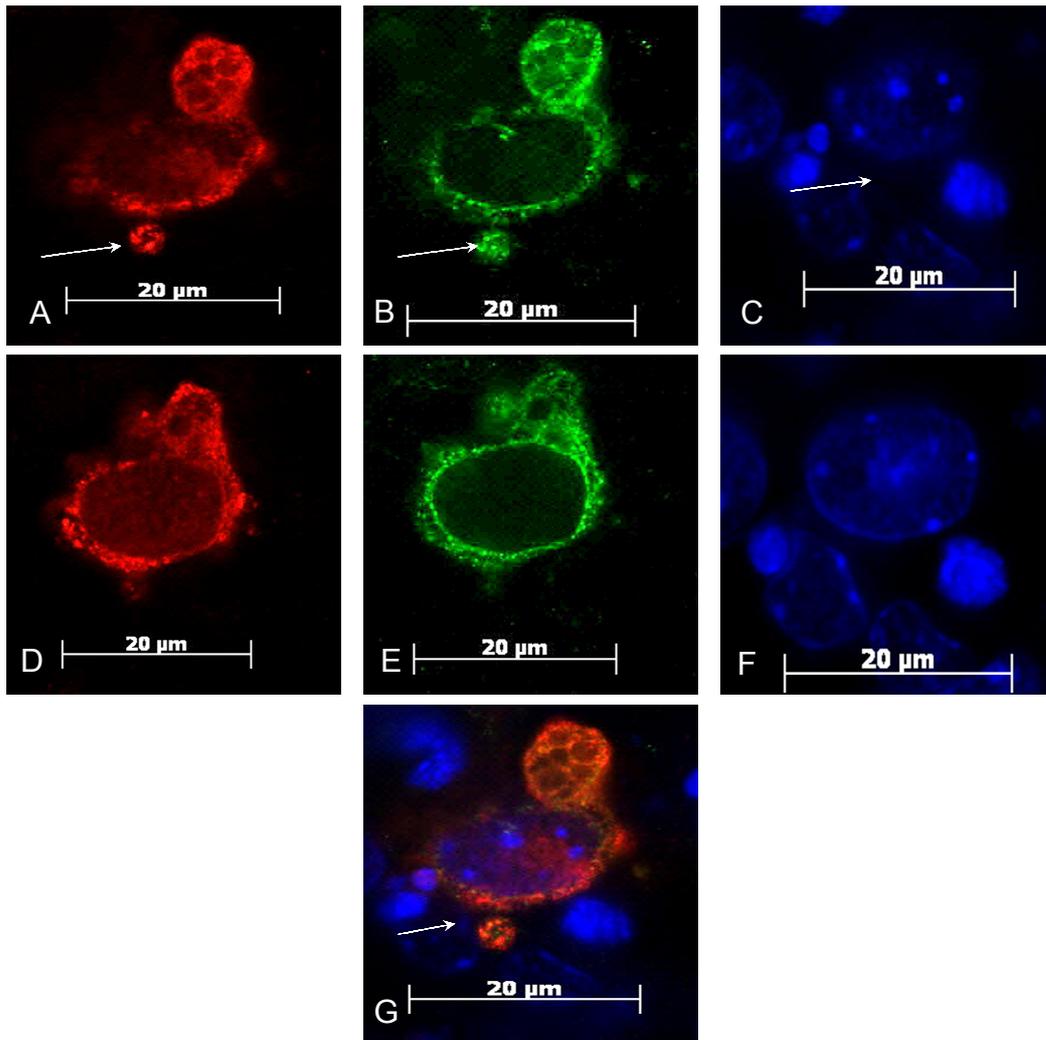


Abbildung 28 Teil 2 der Immunfluoreszenz Studie mit RACK1-HA und dem Fibrocystin-C-Term-GFP Konstrukt bei IMCD-Zellen in Ruhe in 2 Ebenen aufgenommen

(A+D) Rot: RACK1-HA markiert mit dem primären Antikörper HA mouse (Bethyl); als sekundärer Antikörper wurde der Alexa donkey anti-mm 555 (Invitrogen) eingesetzt. (B+E) grün: C-Term-GFP Konstrukt. (F) Blau: DAPI-Kernfärbung.

Der rote Kreis markiert die Stelle, an der ein größeres Vesikel wahrscheinlich abgeschnürt wird. (F) zeigt, dass dort kein DNA-Material vorhanden ist und somit auch keine verkümmerte Zelle oder Kernreste. (C+G) Überlagerte Bilder aller Kanäle in zwei unterschiedlichen Schichten. Die Pfeile markieren besondere Kollokalisierungen der Konstrukte. Die Bilder wurden in 15 Schichten in Z-Richtung aufgenommen und mit der Methode der Dekonvolution das Streulicht verrechnet, wodurch die Kollokalisierung wahrscheinlicher ist. Die Fixierung wurde mit 4% PFA und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25%) durchgeführt. Vergrößerung 63-fach

In der oberen Reihe der Abbildung 28 ist eine Aufnahme der unteren Ebene zu sehen. Besonders zu erkennen sind vesikuläre Strukturen, Golgi-Aparat und Endoplasmatisches Retikulum. Die untere Reihe zeigt eine Aufnahme aus der oberen Ebene. Zu erkennen ist die Kolokalisation besonders an der Plasmamembran.

Die unterschiedliche Verteilung der Fluoreszenz in den unterschiedlichen Schichten ist gut zu erkennen (Abbildung 28). Hier zeigt sich die enorme Bedeutung der Z-Stapel-Aufnahmen und der nachfolgenden Bearbeitung mittels Dekonvolution. Erst in der oberen Ebene wird die Interaktion an der Plasmamembran deutlich, im Gegensatz zu den vesikulären Strukturen, die eher in der unteren Ebene zu erkennen sind.

Um die Interaktion genauer zu charakterisieren wurden zwei Zellorganell-Marker eingesetzt (Abbildung 29), Calnexin als ER-Marker und E-Cadherin als Plasmamembran-Marker.

Auch bei Zellen, die sich nicht in der Teilung befinden, wird die Kolokalisation in der Immunfluoreszenz sichtbar. Hier ist die Kolokalisation hauptsächlich um den Kern herum, im ER und Golgi-Aparat zu erkennen. Auch in vesikulären Strukturen und im Bereich der Plasmamembran ist die Interaktion nachweisbar. Aufgrund der Organellmarker aus der Abbildung 29 ist zu erkennen, dass beide Proteine RACK1 und Fibrocystin-His-Konstrukt in diesen Organellen vorkommen können.

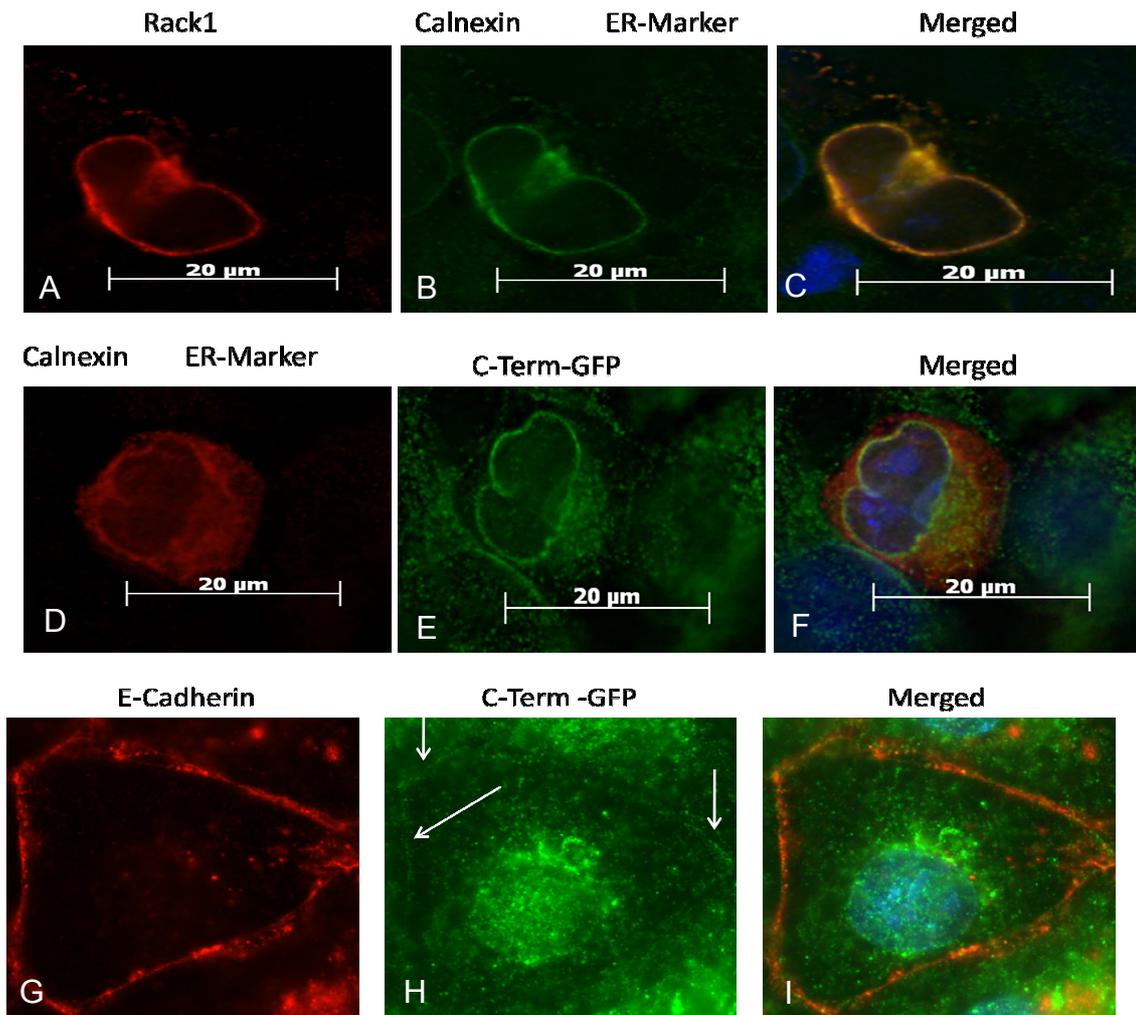


Abbildung 29 Immunfluoreszenz der Zellorganell-Marker mit den Protein-Konstrukten

A) Rot: RACK1 Färbung mit dem primären Antikörper anti HA-mouse. Als sekundärer Antikörper wurde der Alexa donkey anti-mm 555 (Invitrogen) verwendet B) Grün: rabbit-anti-Calnexin (Abcam) Endoplasmatisches Retikulum Marker und sekundärer Antikörper Alexa donkey anti rabbit 488 C) Überlagerung von A,B D) rabbit-anti-Calnexin (Abcam) E) C-Term GFP F) Überlagerung von D,E G) rat-anti-E-Cadherin (Abcam) mit sekundärem Antikörper Alexa goat anti-rat 555 H) C-Term GFP I) Überlagerung von G,H.

Die Fixierung wurde mit Methanol und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

4.2.4 Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation mit RACK1 und dem Fibrocystin-IZ-His-Konstrukt

Auch das verkürzte IZ-Konstrukt von FPC ist in der Lage, RACK1 zu präzipitieren und damit zu interagieren.

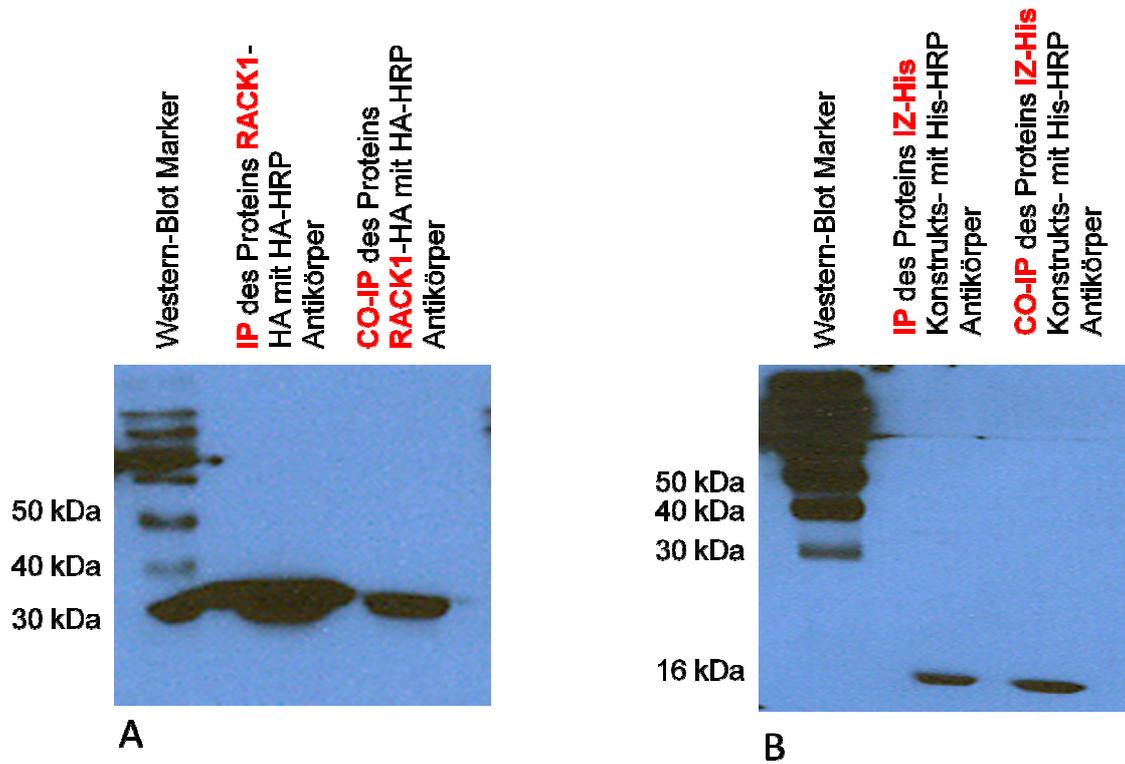


Abbildung 30 Western-Blot der Co-IP mit RACK1-HA und dem Fibrocystin-IZ-His Konstrukt

Der Western-Blot-Marker wurde mit dem im Kit enthaltenen anti-Biotin-HRP Antikörper nachgewiesen (Cell Signaling). Die Banden wurden mit den primären Antikörpern gegen (A) HA RACK1 und (B) His IZ- Konstrukt (Antikörper beide Miltenyi) nachgewiesen. Die SDS-Page lief in einem 12%-Polyacrylamid-Gel.

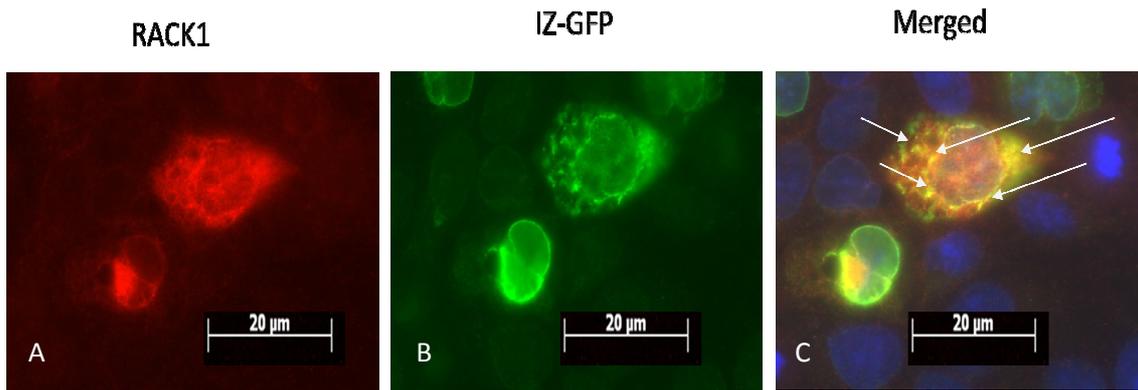


Abbildung 31 Immunfluoreszenz Aufnahme einer in der Interphase befindlichen IMCD-Zelle mit dem Fibrocystin-IZ-GFP Konstrukt und RACK1

A) Rot: RACK1-HA mit primäre HA-rabbit-Antikörper und Alexa donkey anti rabbit-555 B) Grün: IZ-GFP C) Überlagerung der Bilder A,B Blau:Kernfärbung mit DAPI

Die Pfeile markieren wichtige Kollokalisierungen im Golgi und Endoplasmatischen Retikulum der beiden Proteine. Die Fixierung wurde mit Methanol und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

Die Ergebnisse der Co-IP konnten auch mit dem IZ-Konstrukt in der IF sehr gut verifiziert werden. Die Interaktion findet wie beim C-Term-Konstrukt im rauen ER und dem Golgi-Aparat statt. Auch sind die markanten vesikulären Strukturen zu erkennen. In Abbildung 32 (D-F) ist auch die Interaktion im Kern gut zu erkennen.

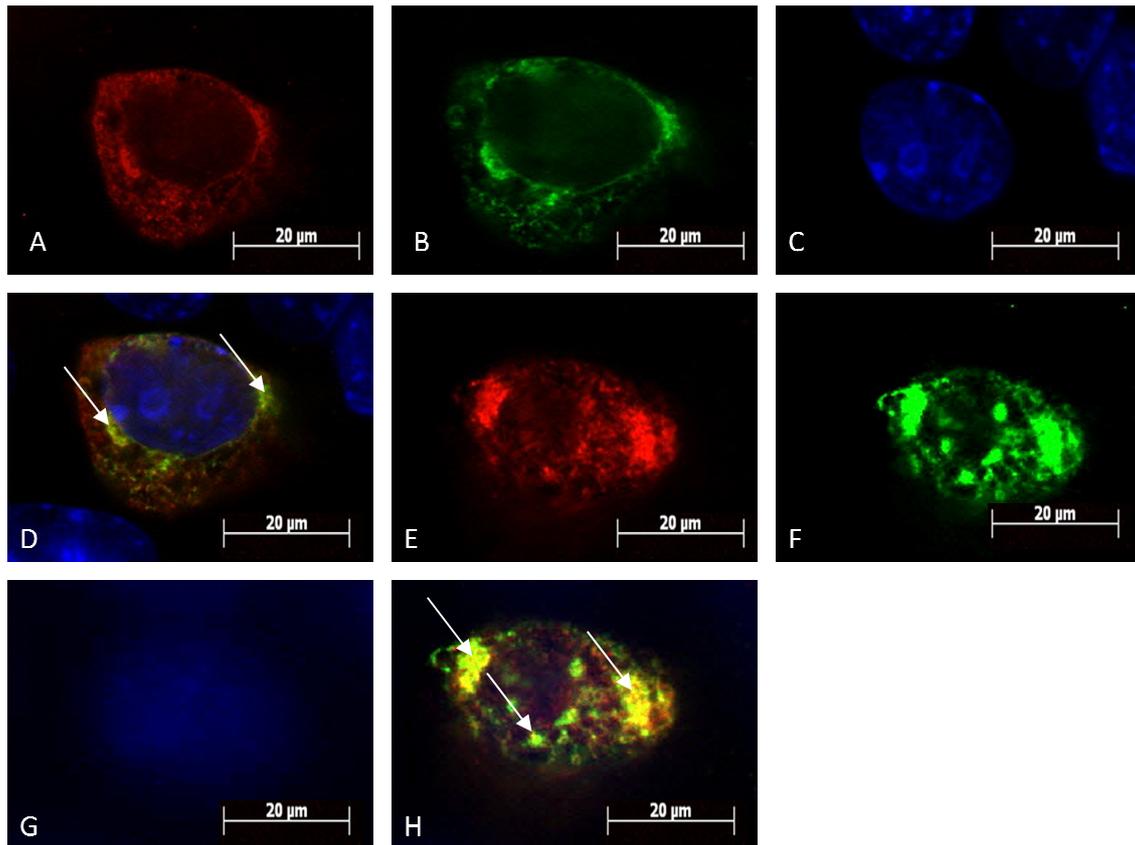


Abbildung 32 Immunfluoreszenz Aufnahme zur Darstellung der Interaktion zwischen RACK1 und Fibrocystin-IZ-GFP in Golgi-Strukturen und Kern

(A + E) Rot: RACK1 mit HA-mouse primären Antikörper und als sekundären Antikörper donkey anti-mouse 555 in zwei unterschiedlichen Ebenen. Die obere Reihe zeigt eine tiefe Ebene an und die untere Reihe eine höhere. (B+F) IZ-GFP: Die Obere Reihe zeigt eine tiefe Ebene an und die untere Reihe eine höhere. (C+G) DAPI-Färbung. (D+H) Überlagerungen aller Kanäle Pfeile zeigen besondere Kolokalisationen wie z.B. am und im Kern sowie im Golgi an. Die Fixierung wurde mit 4 % PFA und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

4.2.5 Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation der Deletionsmutanten von RACK1 mit dem Fibrocystin-C-Term-Konstrukt

Zur weiteren Bestimmung der Interaktion wurde RACK1 in zwei rekombinante Proteine unterteilt. Es wurden zwei Proteine kloniert, die nur aus den WD40-Domänen 3-5 bzw. 5-7 bestehen.

Diese Auswahl erfolgte, weil in der Literatur gezeigt werden konnte, dass diese Domänen am häufigsten an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt sind [39, 40].

Es konnte nachgewiesen werden, dass beide rekombinanten Proteine mit dem Fibrocystin-C-Term-His-Konstrukt interagieren. Dabei ist aber festzustellen, dass die Interaktion mit dem Konstrukt WD40-3-5 nicht eindeutig ist: Erstens ist die Bande schwächer als bei dem Konstrukt WD40-5-7, weiterhin konnte die Interaktion nicht in mehreren Versuchen reproduziert werden. Die Interaktionen konnten in beiden Richtungen nachgewiesen werden (Abbildung 33).

Um nun mögliche Aminosäuren, die an der Interaktion beteiligt sind, zu identifizieren wurden Deletionsmutanten erzeugt. Diese Aminosäuren wurden in der Literatur häufig als signifikante Aminosäuren für Interaktionen zwischen RACK1 und anderen Proteinen beschrieben [39, 40, 60]. Die Aminosäuren Arginin und Lysin sind beide bei einem zellulären pH-Wert positiv geladen, was eine potenzielle Beteiligung an einer Interaktion wahrscheinlicher macht.

Die Aminosäure Tyrosin ist eine Aminosäure mit einem Benzol-Ring, an der eine Hydroxy-Gruppe gebunden ist. Aufgrund der Hückel-Regel (d.h. die π -Bindungen im Benzol-Ring sind frei in ihrer Lage) kann Tyrosin sehr gut an Interaktionen mit Proteinen beteiligt sein.

Im Folgenden sind die erstellten Deletionsmutanten aufgeführt.

1. RACK1-HA Deletion AS Tyrosin Y52
2. RACK1-HA Deletion AS Arginin R57
3. RACK1-HA Deletion AS Lysin K127
4. RACK1-HA Deletion AS Isoleucin_Isoleucin I1235_236

Die Deletionsmutanten der einzelnen Aminosäuren zeigten keinerlei Veränderungen in der Fähigkeit, das C-Term-His Konstrukt zu präzipitieren. Daraus kann abgeleitet werden, dass die Deletion der Aminosäuren nicht zum Verlust der Interaktion führt. Die Co-IP der Deletionsmutanten wurde nur in einer Richtung durchgeführt (Abbildung 34).

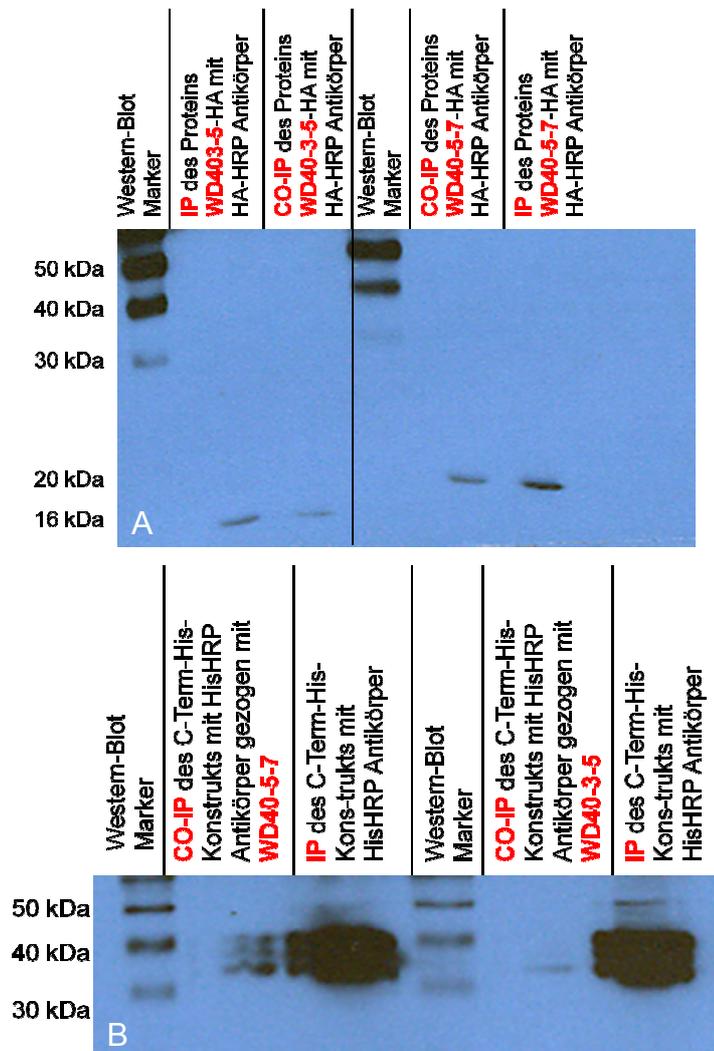


Abbildung 33 Western Blots der Co-Immunopräzipitation mit den WD40 Konstrukten 3-5 und 5-7 und dem Fibrocystin-C-Term-His Konstrukt

A) Western Blot mit dem anti-HA-HRP Antikörper (Miltenyi) Nachweis der IP und Co-IP Banden von RACK1

B) Western Blot mit anti-His-HRP Antikörper (Miltenyi). Nachweis der IP und Co-IP Banden des C-Term-His Konstrukts Die SDS-Page lief in einem 10%-Polyacrylamid-Gel

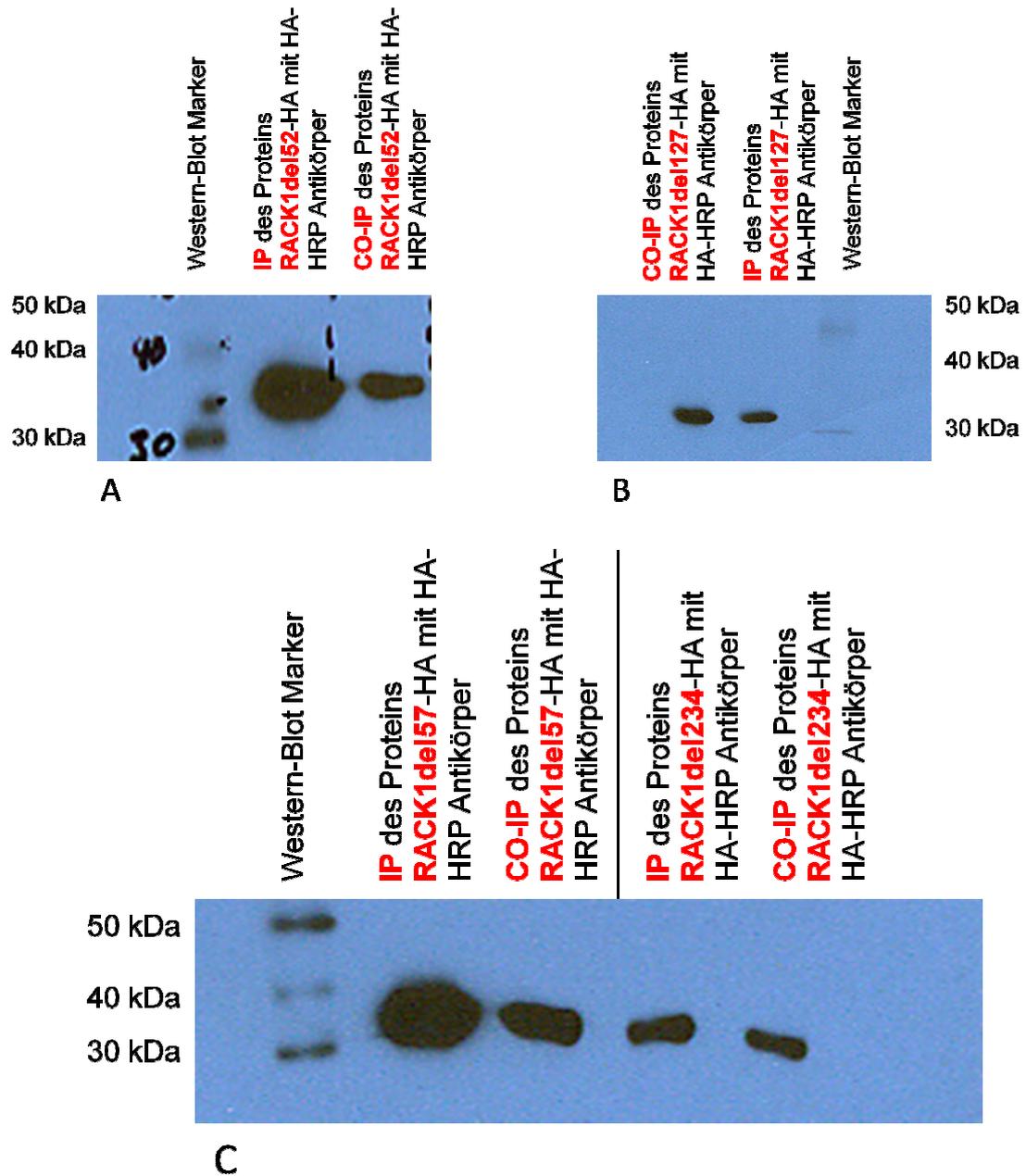


Abbildung 34 Western Blots der Einzel-AS-Deletionsmutanten

- A) Co-IP mit der Deletionsmutante Y52
- B) Co-IP mit der Deletionsmutante K127
- C) Co-IP mit den Deletionsmutanten R57 und II 234-235

Eingesetzte Antikörper und Bedingungen wie in Abbildung 33

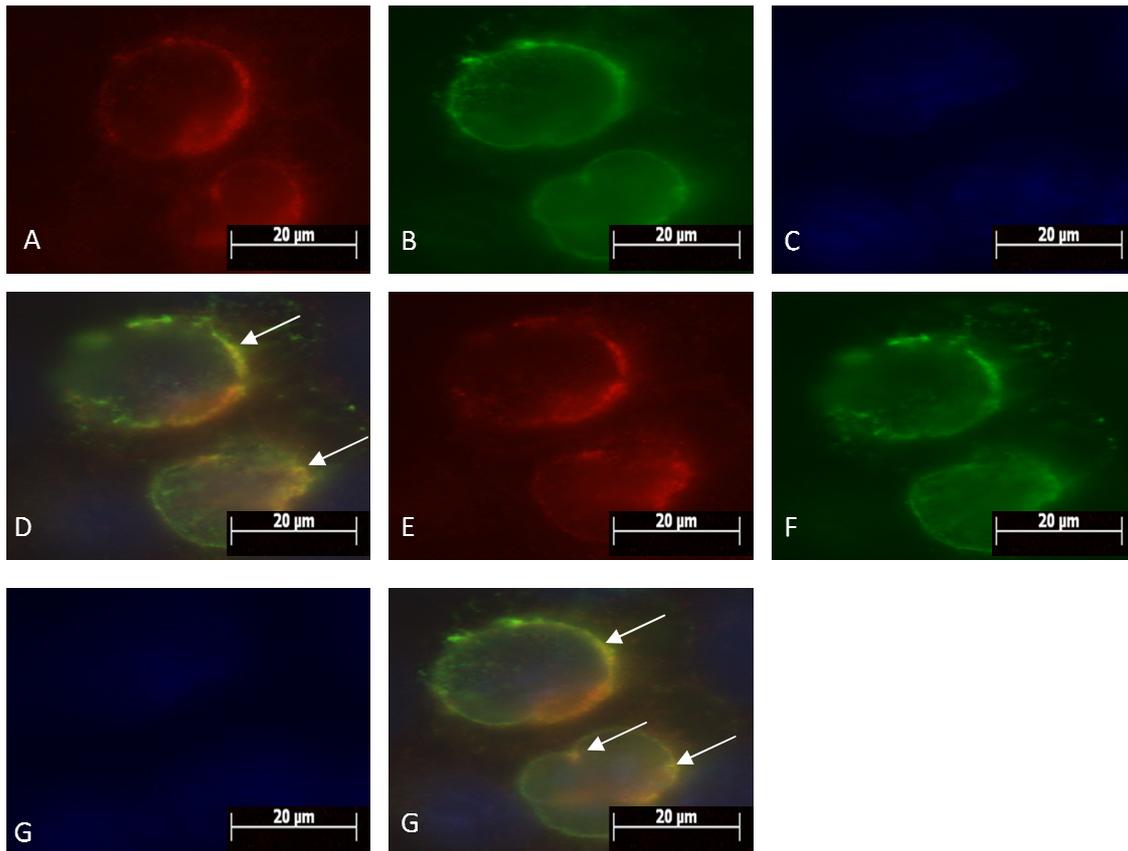


Abbildung 35 Immunfluoreszenz-Aufnahme zur Kolokalisation der Konstrukte RACK1-WD40-5-7 und dem C-terminalen Fibrocystin Konstrukt

(A+E) RACK1-WD40-5-7 Konstrukt mit HA-mouse primären Antikörper und als sekundären Antikörper donkey anti-mouse 555 in zwei unterschiedlichen Ebenen. Die obere Reihe zeigt eine tiefe Ebene an und die untere Reihe eine höhere. (B+F) C-terminales-Fibrocystin-GFP Konstrukt: Die Obere Reihe zeigt eine tiefe Ebene an und die untere Reihe eine höhere. (C+G) DAPI-Färbung. (D+G) Überlagerungen aller Kanäle Pfeile zeigen besondere Kolokalisationen wie z.B. am und im Kern sowie im Golgi an. Die Fixierung wurde mit 4 % PFA und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

Die Abbildung 35 zeigt eine Immunfluoreszenz-Aufnahme in der gut zu erkennen ist, dass das Konstrukt RACK1-WD40-5-7 im ER und Golgi-Apparat kolokalisiert. Vesikuläre Kolokalisation ist nicht zu erkennen. Die IF bestätigt die Co-IP, so dass angenommen werden kann das RACK1-WD40-5-7 mit dem C-terminalen-Fibrocystin-Konstrukt interagiert.

4.2.6 Nachweis der Interaktion zwischen Fibrocystin-C-Term-His-Konstrukt und ADAM12

Nach der Identifizierung von RACK1 als Interaktionspartner des C-Term-Konstrukts von FPC sollte nun untersucht werden, ob auch der bekannte Interaktionspartner ADAM12 des Proteins RACK1 mit dem C-Term-Konstrukt interagiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass auch ADAM 12 sehr wahrscheinlich mit dem C-Term-Konstrukt interagiert (Abbildung 36).

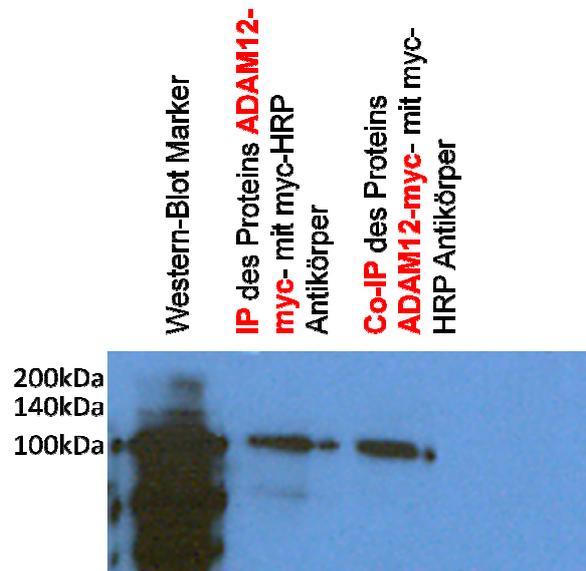


Abbildung 36 Western-Blot der Co-IP mit ADAM12-myc und Fibrocystin-C-Term-His

ADAM12 ist bei einer Größe von 102kDa gut nachweisbar. Die IP wie die Co-IP wurden mit His-Antikörper gezogen. Nachweis des Proteins ADAM12 mit dem c-myc Antikörper (Miltenyi). Die SDS-Page lief in einem 10 % Polyacrylamidgel. In der ersten Linie ist der Größenstandard zu sehen (Western-Blot-Marker Cell Signaling)

Zum Nachweis, dass alle drei Proteine in einem Komplex vorliegen, wurde ADAM12 indirekt aus den Transfektionsansätzen nachgewiesen. Wurde eine Zellkultur mit RACK1-HA und C-Term-His transfiziert, konnte ADAM12 mit nativen Antikörper in der Co-IP der beiden Ansätze identifiziert werden (Abbildung 37).

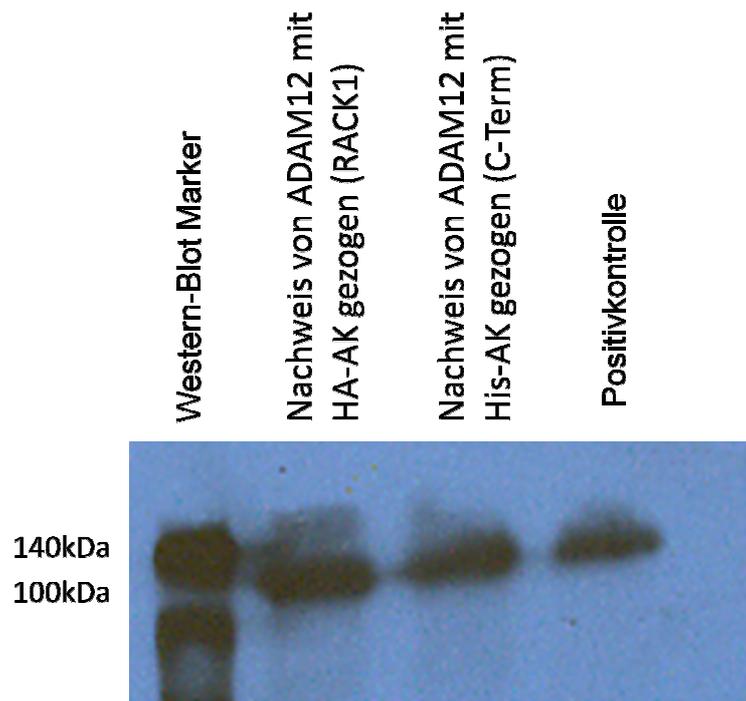


Abbildung 37 Indirekter Nachweis von ADAM 12

ADAM12 wurde mit dem nativen rabbit anti-ADAM12 Antikörper von Abcam nachgewiesen.

In der unteren Immunfluoreszenz-Aufnahme in Abbildung 38 konnte gezeigt werden, dass auch in der IF ADAM12 und C-Term-Konstrukt kolokalisieren und damit sehr wahrscheinlich interagieren. Besonders die Kolokalisation an der Plasmamembran ist hervorzuheben. Aber auch im ER und Golgi sind klare Signale beider Proteine zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie dort auch eine Interaktion aufweisen.

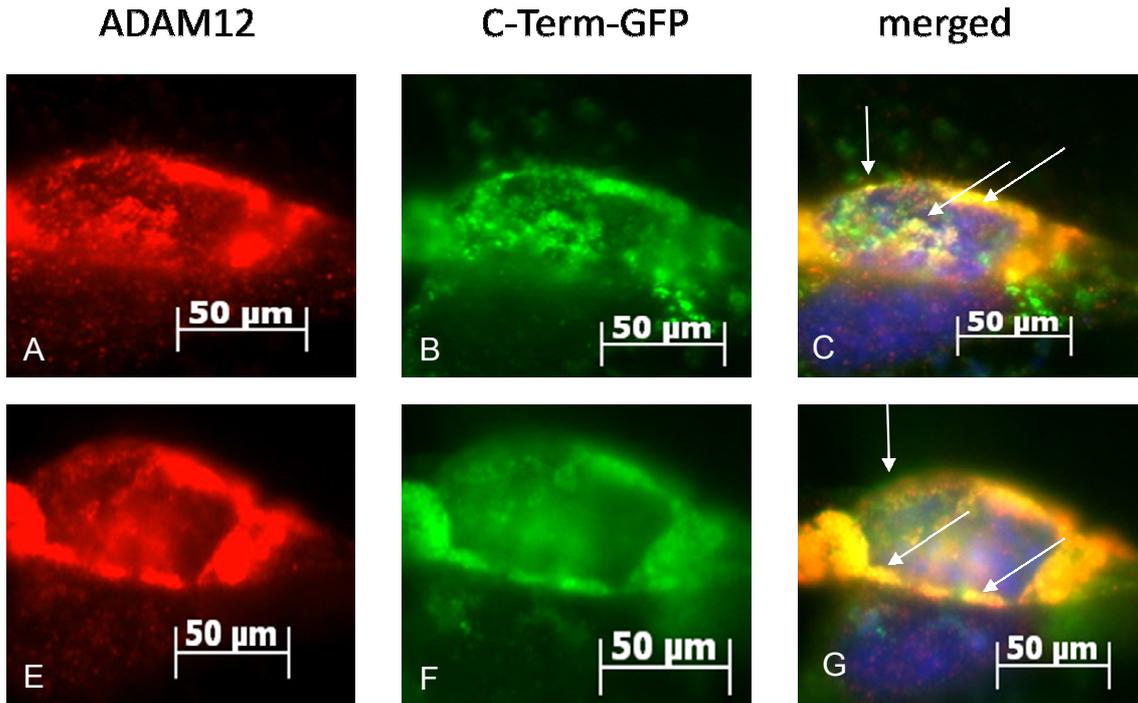


Abbildung 38 Immunfluoreszenz-Aufnahmen zur Kolokalisation zwischen ADAM12 und C-Term-GFP

A+ E) Rot: ADAM12 mit goat anti-Myc als Erstantikörper und donkey anti-goat als Zweitantikörper. B+F) Grün: C-Term-GFP C+G) Überlagerung beider Kanäle
A-C) Untere Ebene einer Z-Stapel-Aufnahme E-G) Obere Ebene einer Z-Stapel-Aufnahme
Durch die Z-Stapel-Aufnahme von 10 Schichten konnte ausgeschlossen werden, dass die Fluoreszenzsignale Überlagerungen aus anderen Ebenen sind und daher die Kolokalisation stammt. Die Fixierung wurde mit 4 % PFA und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt. Die Vergrößerung entspricht 63-fach

4.2.7 Etablierung einer Immunfluoreszenz-Aufnahme mit vier Farben

In der Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die vier Wellenlängen der drei eingesetzten Zweitantikörper und DAPI ausreichend voneinander getrennt sind, da keine zusätzlichen Fluoreszenzsignale in den Kanälen auftraten. Auch ist zu erkennen, dass ADAM12, RACK1 und Fibrocystin-C-Term-Konstrukt in dieser Aufnahme hauptsächlich im Golgi-Apparat kolokalisieren. In Abbildung 39 sieht man ein Beispielbild der drei Proteine. Man sieht eine Kolokalisation in den internen Membranen der Kompartimente, besonders der Zellvakuolen, die darauf hinweisen, dass sich die Zelle im Anfangsstadium der Apoptose befindet. Mit dieser Immunfluoreszenz-Aufnahme konnte gezeigt werden das nun ein weiterer Antikörper für die IF zur Verfügung steht. Damit sind viele weitere Experimente möglich, wie z.B. Nachweis der Kolokalisation zweier untersuchter Proteine und eines Organell-Marker. Dadurch kann nun eine mögliche Interaktion direkt im Organell nachgewiesen werden.

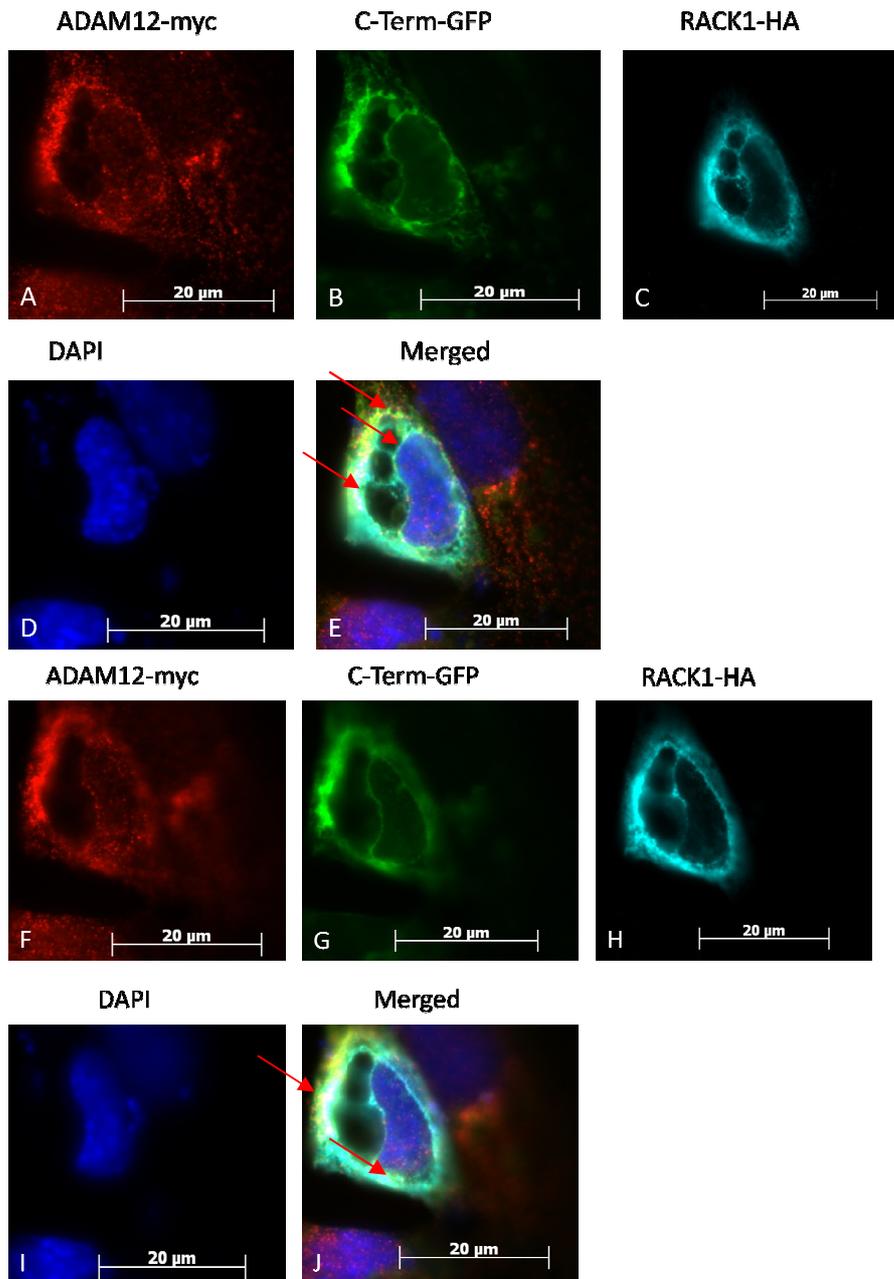


Abbildung 39 Immunfluoreszenz-Aufnahme mit vier Farben

A+F) Rot: ADAM12-myc mit goat anti-myc (Erstantikörper Bethyl) und Alexa-Fluor-555 donkey anti goat (Zweitantikörper Invitrogen) B+F) Grün: C-Term-GFP C+F) Türkis: RACK1-HA mit rabbit anti-HA (Erstantikörper Bethyl) und Alexa-Fluor-647 donkey anti-rabbit (Zweitantikörper Invitrogen) D+I) Blau: Kernfärbung mit DAPI E+J) Überlagerung der vier Kanäle
A-E) untere Ebene der Z-Stapel Aufnahme mit 10 Schichten F-J) Obere Ebene der Z-Stapel-Aufnahme mit 10 Schichten. Die Fixierung wurde mit 4 % PFA und die Permeabilisierung mit Tween 20 (0,25 %) durchgeführt.

5. Diskussion

Vor Beginn der Arbeit konnte in einem Yeast-Two-Hybrid (YTH)-System RACK1 als ein potenzieller Interaktionspartner des C-terminalen Bereichs von Fibrocystin identifiziert werden. In der vorliegenden Dissertation sollte nun diese neue mögliche Proteininteraktion zwischen FPC und RACK1 verifiziert und charakterisiert werden. Dafür wurden die Methoden Coimmunopräzipitation (Co-IP) und Immunfluoreszenz (IF) genutzt. Mit Hilfe der Co-IP konnte die Interaktion aus dem YTH bestätigt werden. Die IF ergab Hinweise darauf, in welchen Zellkomponenten und in welcher Lokalisation die beiden Proteine miteinander interagieren. Des Weiteren sollte in der vorliegenden Dissertation eine Methode zur Isolierung von Nierenepithelzellen als Primärzellen etabliert werden. Experimente mit Primärzellen sind von Vorteil, da sie die Situation *in vivo* besser abbilden, denn sie sind nicht biochemisch immortalisiert und damit nicht in ihrer Zellbiologie/Genetik verändert.

5.1. Etablierung der Methode zur Isolierung von Nierenepithelzellen als Primärzellkultur

Die Isolierung der Primärzellen war mit mehreren Herausforderungen verbunden.

- 1.) Es musste eine schonende Methode gefunden werden, wie die Zellen aus ihrem Gewebeverbund gelöst werden könnten und anschließend in einer Gewebeschale anwachsen
- 2.). Darauf folgend musste das Problem gelöst werden, dass beim Herauslösen der Nierenepithelzellen aus dem Gewebeverbund unausweichlich auch Bindegewebszellen, die Fibroblasten, mit abgelöst werden.

Diese Fibroblasten wiederum hatten aber eine bessere Adhäsionsfähigkeit und überwucherten die Nierenepithelzellen schnell. Außerdem ist eine Mischkultur nicht akzeptabel.

Daher war das Problem der Trennung dieser Zellpopulationen enorm wichtig und schlussendlich musste ein geeignetes Zellmedium gefunden werden.

Viele Kollagenasen sind sehr stark zellschädigend, dabei aber nicht ausreichend in ihrer Enzymaktivität. Als Kollagenase, die die vielversprechendsten Ergebnisse liefert, konnte die Kollagenase B aus *Clostridium histolyticum* (Sigma) ermittelt werden. Das Enzym löst sehr schonend das Kollagen auf, das als Stützprotein das Bindegewebe zusammenhält. Nach der Behandlung des Gewebes mit Kollagenase müssen die „Zellklumpen“ noch vereinzelt werden. Das aus der Zellkultur bekannte Enzym Trypsin erwies sich hier als geeignet. Um die Zellzahl zu erhöhen und die Zellen an die Bedingungen zu gewöhnen, wurde das Zellgemisch in einer Gewebeschale angezüchtet. Das dafür verwendete Medium wurde speziell für Nierenepithelzellen entwickelt (Medium von PromoCell).

Alle Wachstumsfaktoren sind speziell für Nierenepithelzellen abgestimmt worden, ebenso die eingesetzten Konzentrationen. Das Medium sorgte für eine gute Stimulierung und Umgebung, so dass die Mehrzahl der Zellen sich nach ein paar Tagen an der Gewebeschale adhärierte. Durch das Medium wurde außerdem dafür gesorgt, dass die Fibroblasten in ihrer Teilungsgeschwindigkeit gehemmt wurden, so dass die Nierenepithelzellen besser und schneller als die Fibroblasten wachsen konnten. Durch die Versuche mit den Schweinenierenepithelzellen konnte das MiniMACS-System von Miltenyi als beste Methode zur Trennung der beiden Zelltypen ermittelt werden. Das Trennprinzip ist in Abbildung 15 zu sehen. Das ausgewogene Verhältnis der Pufferzusammensetzung und die sehr schonende Methode der Bindung an die Säulen machte es möglich, dass die Zellen die Prozedur gut überstanden.

Die negative Trennung, d.h. Fibroblasten werden an die Säule gebunden, erwies sich als die erfolgreichere Methode gegenüber der positiven Isolierung (Nierenepithelzellen binden an die Säule). Wahrscheinlich ist der Antikörper gegen CD42, der als Fibroblasten Antikörper verwendet wurde, spezifischer in der Antigenerkennung als der ebenfalls eingesetzte Antikörper gegen Oberflächenantigene von Epithelzellen.

Hierfür spricht, dass der Antikörper gegen Epithelzellen in der Kultur noch Fibroblasten im signifikanten Maße nachweisen konnte.

Das bedeutet, dass diese in einem gewissen Maß auch von dem Antikörper gebunden wurden und somit ebenfalls an der Säule hängen blieben.

Auffällig war, dass die Primärzellkulturen der Patienten eine erhöhte Teilungsaktivität besaßen. Dies konnte in dieser Arbeit aber nur durch reine empirische Beobachtungen festgestellt werden. Zur Bestimmung dessen sollten noch Versuche der Teilungsrate durchgeführt werden. Ebenso ist deutlich geworden, dass die Zellen der Wildtyp-Kontrolle bis zur Passage 8 passagiert werden konnten, bei Patientenzellen aber nur bis Passage 5-6. In wieweit dies auf eine erhöhte Apoptoserate hinweist, kann nur spekuliert werden. Hier sind z.B die Transport- und- Entnahmebedingungen zu berücksichtigen. Die Wildtyp-Zellen konnten schon nach zwei Stunden in Kultur genommen werden. Dies könnte die hohe Apoptoserate sehr gut erklären. Die höhere Apoptoserate wird durch die stärkere Ausbildung von Zellvakuolen die auf eine Apoptose hindeuten (roter Kreis Abbildung 21A) deutlich.

Die Zellmorphologie weist darauf hin, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Nierenepithelzellen handelt. Zum Vergleich ist in Abbildung 21B ein Bild einer Kultur von *Inner medullary collecting duct* (IMCD) Zellen zu sehen. Es ist gut zu erkennen, dass beide Kulturen eine starke Ähnlichkeit in Ihrer Morphologie aufweisen. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz das Protein Uromodulin nachgewiesen werden, das ausschließlich in Epithelzellen der Niere exprimiert wird (Uniprot Protein Datenbank). Die subzelluläre Lokalisation findet sich an der apikalen wie basolateralen Membran. Des Weiteren wird Uromodulin in geringen Mengen auch in der Cilienmembran ausgeprägt. Durch diese Tatsachen ist davon auszugehen, dass es sich um eine reine Primärzellkultur von Nierenepithelzellen handelt. Es konnten während dieser Arbeit sechs Patientenkulturen angelegt werden.

Es konnte nur eine molekulargenetisch sehr wahrscheinlich gesicherte ARPKD-Patientenkultur etabliert werden. Das liegt daran, dass viele klinische Symptome, wie Zysten in der Niere, portale Hypertension, Leberveränderungen usw. häufig auch bei sehr ähnlichen Erkrankungen vorkommen.

Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die überlappenden Erkrankungen wie ADPKD, Renal Cysts and Diabetes Syndrom (RCAD) oder eine früh manifeste Nephronophthise. Dies erschwert dem einsendenden Arzt die eindeutige Diagnose.

Deshalb wird zwar häufig Patientenmaterial oder Blut als Verdachtsdiagnose ARPKD versandt, doch später wird eine andere Erkrankung diagnostiziert. Erst die molekulargenetische Untersuchung schafft meist Klarheit. Die molekulargenetische Bestätigung der Primärzellkultur des ARPKD-Patienten ist von Seiten der Mutation sehr eindeutig. Es handelt sich um eine Stopmutation, deren Pathogenität nicht in Frage steht.

Obwohl es aufgrund der niedrigen Allelfrequenz von *PKHD1*-Mutationen und der bekannten Detektionsrate von „nur“ 80-85 Prozent, sehr wahrscheinlich ist, dass es sich um eine ARPKD handelt, besteht noch eine gewisse Restunsicherheit.

5.2 RACK1 und Fibrocystin als direkte Interaktionspartner

Auf der Basis der YTH-Screening-Ergebnisse wurde RACK1 als ein möglicher Interaktionspartner des C-terminalen Bereichs von FPC identifiziert. Zellbiologisch ist RACK1 ein interessanter Kandidat, da RACK1 als Gerüstprotein für viele Signalwege in der Zelle fungiert. Es ist in vielen Zellprozessen involviert, in denen auch Fibrocystin eine Rolle spielt. Daher wurde entschieden, RACK1 weiter näher zu charakterisieren.

In der Coimmunopräzipitation sah man, dass RACK1 mit dem C-terminalen Ende von FPC (im Folgenden kurz als C-Term Konstrukt bezeichnet) interagiert (Abbildung 25). Das C-Term-Konstrukt besteht aus dem kurzen cytoplasmatischen Teil von FPC, der Transmembrandomäne und dem extrazellulären Bereich des N-terminalen Teils, der im „Ectodomain Shedding“ gespalten wird.

In beiden Richtungen war die Interaktion nachweisbar, so dass abgeleitet werden kann, dass RACK1 das C-Term-Konstrukt präzipitieren kann, aber auch umgekehrt das C-Term-Konstrukt das RACK1-Protein.

Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Interaktion stark und stabil ist. Des Weiteren konnte die Interaktion in mehreren unterschiedlichen Zellkulturen, in IMCD-Zellen (Sammelrohrzellen der Maus), in COS-Zellen (Epithelzellen der Grünen Meerkatze), in MDCK-Zellen (Epithelzellen des Spezies Hund) und in HEK290 (einer Mischkultur von Epithelzellen und Fibroblasten des Menschen) in der Co-IP und der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dies belegt, dass die Interaktion speziesübergreifend vorliegt und unterstreicht die Validität der Ergebnisse. Besonders zeigt die Interaktion in Primärzellen, dass die Interaktion unter physiologischen Bedingungen möglich ist.

Wie bereits erwähnt sind Primärzellen nicht immortalisiert und damit kommen sie der natürlichen Situation in den Nierenepithelzellen am nächsten.

In allen Co-IPs ist in der Intensität der Interaktion zwischen beiden Proteinen kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Ob der Intensitätsunterschied in der Interaktion zwischen ARPKD-Primärzellen und Wildtyp-Primärzellen tatsächlich existiert, bleibt unklar (Kapitel 4.1 und Abbildung 26). Der Intensitätsunterschied könnte mit einer veränderten Transkriptionsaktivität oder Translation erklärt werden. Aber es ist nicht bekannt, dass Fibrocystin die Transkription oder die Translation von Proteinen beeinflusst. Daher ist zu erwarten, dass diese beiden Vorgänge in der Zelle auch bei ARPKD-Patienten unbeeinträchtigt sind. Es ist wahrscheinlich, dass der Intensitätsunterschied durch die unterschiedliche Transfektionseffizienz entsteht. Die unterschiedliche Transfektionseffizienz kann am ehesten mit der möglicherweise verstärkten Apoptose in den ARPKD-Primärzellen erklärt werden. In der Immunfluoreszenz ist darstellbar, dass beide Proteine besonders stark kolokalisieren, wenn die Zelle sich in der Teilung befindet. Man kann eine Kolokalisation in der Äquatorialebene, an der Plasmamembran und im Cytosol sowie in vesikulären Strukturen erkennen. Die Kolokalisation an der Plasmamembran ist interessant, denn damit ist wahrscheinlich, dass beide Proteine an der Plasmamembran

interagieren. Die Kolokalisation in der Äquatorialebene deutet auf eine mögliche Interaktion in der Mitose hin. Es ist zu beobachten dass in ER und Golgi eine Kolokalisation stattfindet, und somit eine Interaktion in diesen Organellen möglich ist (Abbildung 29).

Die „Abschnürung“ (Abbildung 28) könnte ein größeres Exosom sein, möglich wären auch abgestorbene Zellreste. Die DAPI-Färbung war in diesem Bereich negativ, so dass wahrscheinlich keine DNA-Reste vorliegen. Das Exosom ist daher wahrscheinlicher. In der Literatur ist bekannt, dass FPC sekretiert wird und im Urin nachgewiesen werden kann. Es ist davon auszugehen, dass FPC über Exosomen sekretiert werden kann [38, 71].

Um die Interaktion zwischen RACK1 und dem C-Term-Konstrukt weiter zu charakterisieren, wurden zwei RACK1-Konstrukte erstellt. Ein Konstrukt bestand aus den WD40-Domänen 3, 4 und 5 von RACK1, das andere aus den WD40-Domänen 5, 6 und 7.

Dadurch sollte der Bereich eingrenzbar sein, in dem wahrscheinlich das C-Term-Konstrukt mit RACK1 interagiert. Es ist anzunehmen, dass RACK1 als Gerüstprotein fungiert und daher zusätzlich zu dem C-Term-Konstrukt noch weitere Proteine bindet. In der Literatur ist beschrieben, dass die fünf WD40-Domänen, die als Konstrukte angefertigt wurden, am häufigsten an Interaktionen mit Proteinen beteiligt sind [39, 40]. PDE4D5, eine Phosphodiesterase, bindet RACK1 zum Beispiel mit den WD40 Domänen 5, 6, und 7. Die Src-Kinase bindet RACK1 mit der WD40-Domäne 6 und die β -Untereinheit der Proteinkinase C bindet mit den WD40-Domänen 3 und 6 [39].

In Abbildung 33 ist zu sehen, dass beide Konstrukte in der Lage sind das C-Term-Konstrukt zu präzipitieren. Das Konstrukt WD40 3-5 scheint das C-Term-Konstrukt schwächer zu binden als das Konstrukt WD40 5-7. Daher ist es wahrscheinlich, dass für die Bindung des C-Term-Konstrukts an RACK1 die WD40-Domänen 5 und 6 möglicherweise wichtiger sind als die Domänen 3-4. Um die Interaktion noch weiter einzugrenzen, wurden vier Deletionsmutanten angefertigt, die in der Literatur schon als wichtige Aminosäuren für eine Interaktion mit Proteinen nachgewiesen worden sind. Es handelt sich um die Aminosäuren Tyr52, Arg57 und Lysin127 und Ile-Ile234_235 [39, 60].

Die Aminosäuren Tyrosin, Arginin und Lysin sind polare Aminosäuren, die häufig eine wichtige Funktion während einer Interaktion zwischen Proteinen innehaben. Ein Grund ist, dass sie durch ihre Polarität nichtkovalente Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindung oder Dipol-Dipol Wechselwirkung eingehen können. Speziell die beiden Aminosäuren Arginin und Lysin sind dafür sehr gut geeignet, denn sie sind bei einem intrazellulären pH-Wert von 7,4 positiv geladen. Durch die frei beweglichen π -Bindungen im Benzol-Ring des Tyrosins kann diese AS leicht neue Bindungen eingehen. Des Weiteren ist Tyrosin bekannt als eine Aminosäure, die häufig phosphoryliert wird und erst dann mit den entstehenden Bindungspartnern interagieren kann.

Wie dargelegt, hatten die deletierten AS keinen direkten Einfluss auf die Interaktion zwischen RACK1 und dem C-Term-Konstrukt (Abbildung 34). Das bedeutet, dass diese Aminosäuren nicht hauptverantwortlich für die Interaktion beider Proteine sind.

Um den Bereich der Interaktion, mit der das C-Term-Konstrukt mit RACK1 interagiert, zu bestimmen wurde ein so genanntes IZ-Konstrukt von FPC erstellt, das nur noch aus dem kurzen cytoplasmatischen Bereich von FPC besteht. Damit könnte bei Verlust der Interaktion gezeigt werden, dass die Transmembrandomäne und der kurze extrazelluläre Teil des N-Terminals Ende mit RACK1 für die Interaktion verantwortlich sind.

Es konnte gezeigt werden, dass auch das IZ-Konstrukt weiterhin mit RACK1 interagiert. In der Immunfluoreszenz ist gut zu erkennen, dass beide Proteine kolokalisieren. Hier ist vor allem die Kolokalisation im Golgi-Apparat und im Kern zu erwähnen. Von beiden Proteinen ist bekannt, dass sie in den Kern translozieren [31, 40, 42]. Auch an der Plasmamembran sind beide Proteine kolokalisiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass RACK1 ein direkter Interaktionspartner von ADAM12 ist [61]. Diese Interaktion ist aus zwei Gründen interessant:

1.) RACK1 ist verantwortlich für die Proteinkinase C-abhängige Translokation von ADAM12 zur Plasmamembran. Typ-I-Kollagen bindet seinen Rezeptor β 1-Integrin und durch diese Bindung wird die Proteinkinase C aktiviert. β 1-Integrin ist wiederum ein wichtiges extrazelluläres Matrixprotein/Rezeptor, das durch

die Interaktion mit ADAM12, die Organisation der ECM reguliert [48, 62] Damit ist β 1-Integrin ein Protein, das entscheidend für die Entstehung der Leberfibrose ist. Daher ist diese Interaktion von Bedeutung für die kongenitale Leberfibrose der ARPKD [61, 63]. (Siehe auch Abschnitt 5.7)

2.) Kaimori et al [32] postulierten, dass FPC einem Notch-ähnlichen Prozess unterliegt. Beim Notch-Signalweg handelt es sich um einen hoch konservierten Signalweg, der für die Oberflächenstrukturierung, Morphogenese und Homöostase der Zelle verantwortlich ist. Notch-Rezeptoren sind Typ-I-Transmembran-Glycoproteine, die nach Bindung eines Liganden folgende Prozesse durchlaufen: Im ersten Schritt erfolgt eine Ectodomain-Spaltung der extrazellulären Domäne durch eine Protease der ADAM-Familie. Die abgespaltene Domäne von Notch bindet erneut den Rest des Notch-Rezeptors, dies führt zur Aktivierung einer α -Sekretase. Die α -Sekretase proteolysiert mittels einer regulierten Intramembranproteolyse (RIP) erneut der Notch-Rezeptor und durch diese Proteolyse wird die Notch-intrazelluläre Domäne ins Cytosol freigesetzt und kann in den Nucleus translozieren [64]. Kaimori et al (2007) konnten zeigen, dass FPC einen ähnlichen Prozess durchläuft. Durch eine bisher nicht beschriebene Metalloproteinase der ADAM-Familie wird der große N-terminale Teil von FPC an das zurückbleibende Stück von FPC durch Disulfid-Bindungen angebunden. Durch diese Bindung wird eine α -Secretase aktiviert und durch eine Intramembranproteolyse wird der C-terminale Teil nun endgültig vom Rest des Proteins getrennt. Die große abgespaltene Ectodomain von FPC übernimmt in diesem Prozess eine ähnliche Funktion wie der Notch-Rezeptor im Notch-Signalweg. Er aktiviert die RIP.

Der kleine intrazelluläre Teil von FPC wird frei und kann in den Kern und ins Cytosol transportiert werden [32, 58]. Dieser Transport ist ein aktiver regulierter Prozess, der durch viele Signalwege reguliert werden kann. Als Beispiel sei genannt der Ca^{2+} -Proteinkinase-Signalweg. Der Transport in den Kern wird über Vesikel gesteuert.

Diese beiden Prozesse machen die Interaktion zwischen RACK1 und ADAM12 für FPC interessant. ADAM12 könnte die beteiligte Metalloproteinase in einem Notch-ähnlichen Prozess der Proteolyse von Fibrocystin in den primären Zilien sein. Die Interaktion des C-Term-Konstrukts mit ADAM12 ist nachweisbar (Abbildung 35). Es konnte zwar nur in eine Richtung nachgewiesen werden, dennoch sind die Belege, die in dieser Arbeit gezeigt werden, für die postulierte Interaktion eindeutig.

Auch in der Immunfluoreszenz ist die wahrscheinliche Interaktion der beiden Proteine durch die bestehende Kolokalisation an der Plasmamembran und im Golgi-Apparat gut zu erkennen (Abbildung 37). Es wurden Z-Stapel-Aufnahmen dokumentiert, die zeigen, dass die Kolokalisation nicht auf Fluoreszenz-Überlagerungen basieren.

Nach der Identifizierung der Interaktion zwischen RACK1 und dem C-Term-Konstrukt sowie der Interaktion zwischen dem C-Term-Konstrukt und ADAM12, sollte nun eine IF-Aufnahme mit vier Farben etabliert werden. Diese sollte eine mögliche Kolokalisation aller drei Proteine zeigen.

Zu beachten ist hierbei, dass sich die emittierten Fluoreszenzen der eingesetzten Zweitantikörper nicht überlagern. Ebenfalls als schwierig erwies sich eine ausreichende Transfektionseffizienz für alle rekombinanten Proteine zu erhalten. Für die Kernfärbung wurde DAPI mit einer emittierten Fluoreszenz von 445 nm verwendet. Im grünen Spektrum wurde GFP und Alexa-Fluor 488 verwendet, das bei 520 nm emittiert. Im roten Spektrum wurde Alexa-Fluor-555 verwendet, das bei 575 nm emittiert. Nun musste ein Zweitantikörper verwendet werden, der ausreichend entfernt von der emittierten Wellenlänge des Alexa-Fluor-555-Antikörpers ist. Ansonsten würde die Fluoreszenz des Alexa-Fluor-555-Antikörpers auch im Filter des anderen Antikörpers sichtbar. Die Wahl fiel auf den Alexa-Fluor-647 nm Antikörper, der bei 680 nm emittiert. Diese Wellenlänge ist nicht mehr mit dem menschlichen Auge sichtbar, sondern nur mit Hilfe einer CCD-Kamera.

Wichtig war es weiterhin ein gutes Mischungsverhältnis der eingesetzten DNA's zwecks transienter Transfektion zu finden. RACK1 und C-Term-GFP sind recht kleine Konstrukte, die mit höherer Konzentration (750 ng/well) eingesetzt

wurden. ADAM12 wurde in der Standard-Konzentration (500 ng/well) eingesetzt. Die verwendeten Zweit-Antikörper wurden 1:800 (Alexa-Fluor 555 und Alexa-Fluor 488) und donkey anti- Alexa-Fluor 647 1:300 eingesetzt, da er eine recht schwache Antigenbindung aufwies. Auch die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist geringer, dies könnte durch die energieärmere, langwelligere Fluoreszenz verursacht sein.

5.3 RACK1-Patientenkollektiv

Es konnte gezeigt werden das RACK1 ein möglicher Interaktionspartner von FPC ist. Aus diesem Grund könnten mögliche Sequenzveränderungen im Gen *GNB2L1* zu ähnlichen phänotypischen Ausprägungen führen wie *PKHD1*-Mutationen. In der Sequenzierung der 14 ARPKD-Patienten ohne *PKHD1*-Mutation konnte keine pathogenetisch relevante Veränderung im Gen *GNB2L1* (RACK1) dargestellt werden.

Dies kann u. a. damit erklärt werden, dass eine loss-of-function Mutation wahrscheinlich nicht mit dem Leben vereinbar sein wird. Dabei kann es sich um Stopmutationen, Spleißmutationen und schwerwiegende Missense-Mutationen handeln. Es kommt auf die phänotypische Ausprägung der Mutation an. Da RACK1 in sehr vielen Signalwegen der frühen Entwicklung involviert ist, kann ein kompletter Verlust der Proteinaktivität nicht kompensiert werden. Das bedeutet, dass sich der Embryo nicht ausreichend entwickeln kann und es zu einem Abort kommen kann. Ein Beispiel für die wichtige Funktion von RACK1 in der Entwicklung ist insbesondere die Schließung des Neuralrohrs [47].

5.4 Ectodomain-Shedding von Fibrocystin und die mögliche Rolle von RACK1 und ADAM12

FPC unterliegt in der primären Zilie einer komplizierten Proteolyse. Wie in Abschnitt 5.2 erwähnt handelt es sich um die regulierte Intramembranproteolyse (RIP). Der große N-terminale Teil des Proteins wird in einem Prozess proteolysiert, den man als Ectodomain-Shedding bezeichnet.

In der Literatur wird postuliert, dass dies durch eine Metalloproteinase der ADAM-Familie erfolgt. [32]. Nach der Spaltung des N-Terms erfolgt die

regulierte Intramembranproteolyse in der eine γ -Secretase beteiligt ist. In der ADAM-Familie sind bisher 30 Metalloproteinasen bekannt [63]. Es ist schwierig vorherzusagen, welche an der Proteolyse beteiligt sind. In der Literatur ist bekannt, dass RACK1 mit der Metalloproteinasen ADAM12 interagiert [61]. In dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass RACK1 und ADAM12 mit dem C-Term-Konstrukt interagieren und dass dadurch ein Proteinkomplex aus diesen drei Proteinen wahrscheinlich ist.

Das führt zu der Hypothese, dass ADAM12 die Metalloprotease ist, die den N-terminalen Teil von FPC proteolysiert.

RACK1 ist als Gerüstprotein indirekt an der Proteolyse beteiligt. Bekannt ist, dass RACK1, ADAM12 und FPC an der Plasmamembran lokalisiert sind, was die Beteiligung der Proteine am Ectodomain-Shedding möglich macht.

Unklar ist, inwiefern RACK1 an dem Prozess beteiligt ist, da das Ectodomain-shedding im Lumen der Sammelrohre stattfindet, also extrazellulär. Auch ist ADAM12 eine integrale Transmembranproteinasen, die ihre Protease-Domäne extrazellulär ausprägt. RACK1 dagegen ist eigentlich ein intrazelluläres Gerüstprotein, das in Signalwegen in der Zelle beteiligt ist. Es ist vorstellbar, dass der Proteinkomplex der drei Proteine intrazellulär im gezielten Transport von ADAM12 und FPC eine Rolle spielt. Denkbar ist weiterhin, dass RACK1 im ER mit ADAM12 und FPC interagiert und der Proteinkomplex dann über den Golgi-Apparat und Transportvesikel an die Plasmamembran transportiert wird. Dort befindet sich ADAM12 und FPC dann in räumlicher Nähe. Möglich ist auch, dass die letzte Proteolyse, die zum Abspalten des C-Terms von FPC führt, RACK1 als Gerüstprotein benötigt. Außerdem ist bekannt, dass die Spaltung von FPC durch eine Aktivierung von Proteinkinase C in Abhängigkeit von Ca^{2+} stimuliert wird [31]. RACK1 ist ein Aktivator der Proteinkinase C, was wiederum für eine Beteiligung von RACK1 an der FPC-Spaltung sprechen könnte.

Eine weitere Hypothese ist, dass erst durch die Phosphorylierung des C-Terminus die Abspaltung in Form der Intramembran-Proteolyse möglich ist.

Es ist bekannt, dass der C-Terminus von FPC Phosphorylierungsstellen besitzt. Das C-Term-Konstrukt wurde daher so konzipiert, dass es bis zur Ectodomain-Sequenz des FPC kloniert wurde.

Das bedeutet, dass ein Ectodomain-shedding stattfinden könnte. Eine Interaktion zwischen ADAM12 und dem C-Term Konstrukt wäre somit möglich (Abbildung 40).

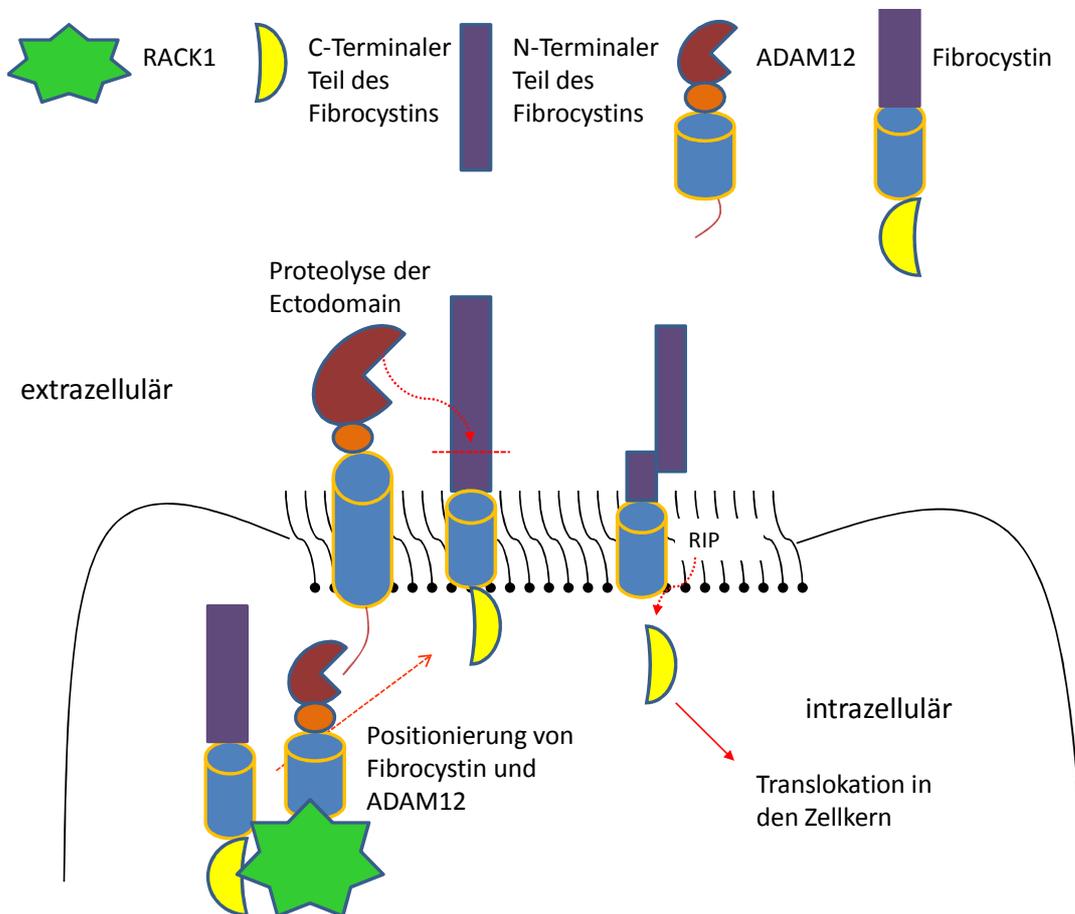


Abbildung 40 **Möglicher Mechanismus der Proteolyse des N-Terminalen Teils von Fibrocystin und die Funktion der Interaktion von RACK1 und ADAM 12**

Durch die Interaktion mit RACK1 wird Fibrocystin und ADAM12 in räumlicher Nähe in der Membran positioniert. ADAM12 als Metalloprotease proteolytisch spaltet die Ectodomain des N-terminalen Teils von Fibrocystin. Die Ectodomain bindet den Rest der N-terminalen Domäne von Fibrocystin und es kommt zur regulierten Intramembranproteolyse (RIP). RIP setzt den C-terminalen Teil von Fibrocystin frei, der dann in den Zellkern translozieren kann.

5.5 Ca^{2+} -Signaling in Verbindung mit RACK1 und Fibrocystin

Mehrere Studien belegen, dass FPC direkt oder zumindest indirekt mit Polycystin-2 interagiert. Dadurch ist FPC beteiligt an der Regulation der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle [33, 34, 36, 37]. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen sorgen dafür, dass eine niedrige cAMP-Konzentration in der Zelle vorliegt. Durch diese niedrige cAMP-Konzentration sind der ERK-Signalweg und weitere MAPK-Signalkaskaden inhibiert und die Zellproliferation ist gering. Bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen hingegen steigt die cAMP-Konzentration an, und die MAPK-Signalkaskaden werden aktiviert, was wiederum zu einer höheren Zellproliferation führt [23, 49]. In Cholangiozyten, den Epithelzellen der Gallengänge, konnte nachgewiesen werden, dass die Hyperproliferation auf eine Proteinkinase A-Stimulation und der vorhergehenden Erniedrigung der Ca^{2+} -Konzentration basiert. Dies hat zur Folge, dass die Konzentration an cAMP hoch ist [50].

In diesen Regulationsprozess kann die Interaktion zwischen FPC und RACK1 eingreifen. RACK1 kann durch seine Gerüstfunktion gleichzeitig mehrere Proteine binden. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass RACK1 und PDE4D5 in einem Komplex vorliegen. Hier ist er für die richtige Steuerung der Zellpolarität wichtig durch die Rekrutierung von ECM-Komponenten [43]. Eine Hypothese könnte sein, dass RACK1 das C-Term-Konstrukt und gleichzeitig die Phosphodiesterase PDE4D5 bindet. Der C-terminale Teil von FPC inhibiert die PDE4D5 und cAMP wird langsamer abgebaut. Dies führt zu einer erhöhten Zellproliferation. Eine normale Zilienfunktion ist Voraussetzung dafür, dass ausreichend Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird. Auch die Konzentration des C-terminalen Teils von FPC hat dann die richtige phänotypische Ausprägung.

Eine gestörte Funktion von FPC kann bewirken, dass erstens die Polycystin-2 Kanalaktivität zu gering ist, wodurch die Ca^{2+} -Konzentration fällt. Das führt zu einer verminderten Aktivierung der Proteinkinase C und das wiederum führt zu einer geringeren Proteolyse des C-Terminals Teils von FPC

Dadurch wird auch die Konzentration vom gespaltenen cytoplasmatischen Teil des FPCs im Cytosol und im Kern niedriger.

Eine korrekte Interaktion zwischen RACK1 und dem C-terminalen Teil von FPC ist nicht mehr möglich. Der ERK-Signalweg wird nicht mehr ausreichend inhibiert und es kommt zu einer Hyperproliferation und Zystenwachstum. Bei ARPKD-Patienten konnte gezeigt werden, dass sie eine erhöhte Konzentration an cAMP aufweisen während die Ca^{2+} -Konzentration geringer ist als bei gesunden Menschen [65].

Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt-Signalweg spielt in der Aktivierung der Zellproliferation und der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle, so dass dieser eine weitere Erklärung für die erhöhte Zellproliferation sein könnte [66]. *PKHD1* inhibierte HEK293-Zellen zeigen eine erhöhte PI3K Aktivität. Eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges führt zu einer erhöhten Apoptoserate und die erhöhte PI3K/Akt Aktivität korreliert auch mit Wachstumsunterdrückung.

RACK1 ist ebenfalls im PI3K/Akt-Signalweg über die Inhibition der c-Src Kinase und der Vermittlung über den VEGFR-1 Rezeptor involviert. Es reguliert die Zellmigration durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs [67]. Inwiefern die in dieser Dissertation identifizierte Interaktion zwischen dem C-terminalen Teil von FPC und RACK1 eine Rolle spielt, ist unklar. Wahrscheinlich ist, dass auch hier der C-terminale Teil als Inhibitor eingreift und den PI3K/Akt-Signalweg negativ reguliert.

Des Weiteren ist bekannt, dass Prosaposin mit dem C-Terminus von FPC interagiert und damit auch die Zellproliferation und Apoptose reguliert [68]. Auf welche Weise Prosaposin und FPC Einfluss auf die Zellmigration nehmen ist unklar.

Die Proteinkinase A-Stimulation in den Cholangiozyten der Gallengänge wird in der Regel durch den PI3K/Akt-Signalweg reguliert. Durch diese Regulation könnte die Interaktion zwischen RACK1 und dem C-Terminus in die Zellproliferation der Gallengänge eingreifen und die Entstehung der Leberfibrose einleiten.

5.6 Die Interaktion zwischen FPC und RACK1 und der mögliche Einfluss auf die planare Zellpolarität

Durch die Interaktion zwischen RACK1 und Fibrocystin könnte die Regulation der planaren Zellpolarität Einfluss auf die ARPKD-Entstehung nehmen. Folgende zwei Mechanismen machen dies zu einem möglichen Szenario.

- 1.) Durch die über Proteinkinase C und Polycystin-2 regulierte Ca^{2+} -Konzentration, die wiederum den nicht-kanonischen-Wnt Signalweg reguliert.
- 2.) Durch die bekannte Interaktion von RACK1 mit Vangl2, das ebenfalls den Wnt-Signalweg beeinflusst [46].

Die Interaktion zwischen RACK1 und dem C-Terminus von FPC könnte über die Regulation der Ca^{2+} -Konzentration den Wnt-Signalweg inhibieren, so dass die planare Zellpolarität normal verläuft. Ist in ARPKD-Patienten die Inhibition des Wnt-Signalweges gestört, führt dies wahrscheinlich zu einer Zystenexpansion.

Der nicht-kanonische-Wnt-Signalweg reguliert durch die RhoA-GTPase die planare Zellpolarität. Mutationen in einem wichtigen Schlüsselregulator ($\text{GDI1}\alpha$) des Rho-G-Proteins zeigen im Mausmodell einen Zystennieren ähnlichen Phänotyp [49]. RhoA-GTPase vermittelt die Phosphorylierung der Focal Adhäsion Kinase (FAK) und ist damit in die Assemblierung der fokalen Adhäsionskomplexe involviert. Diese sind elementar für die extrazelluläre Matrixregulation und der planaren Zellpolarität.

In Brustkrebszellen und in NIH3T3-Zellen zeigt eine Überexpression von RACK1 eine erhöhte Zellproliferation und Zellmigration. Es konnte nachgewiesen werden, dass RACK1 mit der RhoA-GTPase interagiert [67]. Möglicherweise hat FPC hier eine Funktion in der Regulierung der Zellmigration und Zellproliferation.

RACK1 interagiert mit Vangl2 und durch diese Interaktion wird die richtige Membranlokalisierung von Vangl2 gewährleistet. Ebenso schwächt diese Interaktion den Wnt-Signalweg.

Es ist vorstellbar, dass der C-Terminus von FPC in diese Interaktion involviert ist und damit auch den Wnt-Signalweg inhibiert.

Des Weiteren ist bekannt, dass FPC an den mitotischen Spindeln lokalisiert ist und dort die Spindelbipolarität reguliert [30].

5.7 RACK1 und der C-Terminus von FPC in der extrazellulären Matrix-Regulation

Israeli et al. konnten Veränderungen in der Bildung, Regulation und Funktion der fokalen Adhäsionskomplexe in ARPKD-Epithelzellen feststellen [56]. Es ist bekannt, dass die fokalen Adhäsionskomplexe eine zentrale Rolle in der Regulation der extrazellulären Matrix von Epithelzellen, Migration und Differenzierung einnehmen. Bei ADPKD konnte gezeigt werden, dass Polycystin-1 und 2 (PC1 und PC2) als Mechanosensoren in primären Zilien wirken. Diese Aktivität wird über Komplexbildung von PC1 und PC2 mit bekannten fokalen Adhäsionskomplex Proteinen wie Paxillin, c-Src und β 1-Integrin in Epithelzellen vollzogen.

Die Fokal-Adhäsions-Proteine sind Fokal-Adhäsions-Kinase (FAK), c-Src und Paxillin. In ARPKD-Nierenepithelzellen konnte gezeigt werden, dass es einen signifikanten Unterschied in der Verteilung und Phosphorylierung dieser Proteine im Vergleich zum Wildtyp gibt [56]. Dies führt zu einer Veränderung der Mechanotransduktion und der Zellmigration der Nierenepithelzellen bei ARPKD-Patienten. Die veränderte Migration basiert auf der stärkeren Adhäsion an der extrazellulären Matrix und daher einer schlechteren Beweglichkeit der Zellen [56].

Die Arbeit von Israeli et al konnte ebenfalls zeigen, dass FPC im Fokal Adhäsions-Komplex vorkommt und an der Dysregulation der Zellmatrix und Migration beteiligt ist.

RACK1 ist als Interaktor vieler Proteine der extrazellulären Matrix bekannt und ist ein bekannter Regulator der FAK [43, 60]. RACK1 formt einen Komplex mit PDE4D5 und FAK und besitzt so einen regulativen Effekt auf die cAMP-Konzentration, aber auch auf die Formation von Actin-Filamenten in der Zelle. Des Weiteren ist bekannt, dass RACK1 die c-Src Kinase Aktivität reguliert und die Paxillin-Dynamik moduliert [44]. ADAM12 ist an Actin-reichen Strukturen an der Zellperipherie lokalisiert und kann hier die c-Src-Kinase Aktivität regulieren [69].

Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass ADAM12 extrazellulär Cluster von Invadopodia d.h. von Aktin-reichen Strukturen der extrazellulären Matrix induziert [70].

In diesem Zusammenspiel von Proteinen könnte der in dieser Dissertation identifizierte Komplex aus RACK1, ADAM12 und dem C-Terminus von FPC eine wichtige Rolle spielen und eine weitere Verbindung zur Pathogenese der ARPKD aufzeigen. Gerade die obligate kongenitale Fibrose der Leber bei ARPKD-Patienten könnte hierdurch zumindest partiell erklärt werden. Charakteristika der Fibrose bei polyzystischen Nierenerkrankungen sind die frühe Veränderung der Epithelzell-Polarität und Morphologie sowie eine Akkumulation von Kollagenfasern und Fibroblastenzellen in den Portalfeldern der Leber. Auch konnte eine erhöhte Expression von Metalloproteasen und TGF- β RII gemessen werden [58]. Die erhöhte TGF- β Expression könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, wie Fibrocystin und ADAM12 über RACK1 hier die Entstehung der Fibrose beeinflussen. ADAM12 ist im TGF- β -Signalweg durch die Interaktion mit dem Typ-II-Rezeptor involviert [71].

Eine andere interessante Hypothese ist, dass ADAM12 und RACK1 den Transport in Exosomen bewerkstelligen, da TGF- β ein bekanntes Signalweg-Protein der Regulation von Endosomen ist. In der Literatur ist beschrieben, dass FPC in Exosomen-ähnlichen Vesikeln sezerniert wird. Die Funktion dieser Vesikel ist letztendlich noch nicht geklärt.

Es ist vorstellbar, dass die Interaktion zwischen RACK1, ADAM12 und dem C-Terminus von FPC an dem Transport beteiligt ist.

5.8 Ausblick

Weiterführende Experimente zu dieser Thematik wären si-RNA Inhibition mit anschließendem MAP-Kinase-Assay. Es sollte zukünftig untersucht werden, ob die Inhibition von FPC einen signifikanten Einfluss auf den ERK-Signalweg hat. Die mögliche Interaktion von FPC und Vangl2 sollte mit den gängigen Versuchen zur Proteininteraktion untersucht werden. Die Möglichkeit, in der Immunfluoreszenz vier Farben zu nutzen, kann in den Kollokalisationsstudien mit ADAM12 und RACK1 noch weitere relevante Ergebnisse liefern. Es können hiermit auch durch Zellorganellmarker genauere Zuordnungen der Kollokalisation von RACK1, ADAM12 und FPC getroffen werden. Die Anwendung von Live-Zell-Bildgebung in der Immunfluoreszenz wäre für die Aufdeckung von Transportprozessen eine wichtige Anwendung. Die Immortalisation der etablierten ARPKD-Primärzellen wäre im Hinblick auf weiterführende Experimente ein interessantes Projekt.

Literaturverzeichnis

1. Bergmann, C., *Ciliopathies*. Eur J Pediatr, 2011.
2. Ferkol, T.W. and M.W. Leigh, *Ciliopathies: The central Role of Cilia in a Spectrum of Pediatric Disorders*. The Journal of Pediatrics, 2011.
3. Pazour, G.J., *Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(10): p. 2528-36.
4. Kolb, R.J. and S.M. Nauli, *Ciliary dysfunction in polycystic kidney disease: an emerging model with polarizing potential*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4451-66.
5. Ward, C.J., et al., *Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(20): p. 2703-10.
6. Goetz, S.C. and K.V. Anderson, *The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(5): p. 331-44.
7. Harris, P.C. and V.E. Torres, *Polycystic kidney disease*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 321-37.
8. Marshall, W.F., *The cell biological basis of ciliary disease*. J Cell Biol, 2008. **180**(1): p. 17-21.
9. Veland, I.R., et al., *Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease*. Nephron Physiol, 2009. **111**(3): p. p39-53.
10. Christensen, S.T., et al., *Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling*. J Pathol, 2012. **226**(2): p. 172-84.
11. Pedersen, L.B., et al., *Assembly of primary cilia*. Dev Dyn, 2008. **237**(8): p. 1993-2006.
12. Berbari, N.F., et al., *The primary cilium as a complex signaling center*. Curr Biol, 2009. **19**(13): p. R526-35.
13. Christensen, S.T., et al., *Sensory cilia and integration of signal transduction in human health and disease*. Traffic, 2007. **8**(2): p. 97-109.
14. Christensen, S.T., et al., *The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair*. Curr Top Dev Biol, 2008. **85**: p. 261-301.
15. Gerdes, J.M., E.E. Davis, and N. Katsanis, *The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease*. Cell, 2009. **137**(1): p. 32-45.
16. Grünewald, C. *Identifikation von Calmodulin und C-Myc als Interaktionspartner von Polyduktin*. 2010.

17. Brüchle, N.O., A.Venghaus, and e. al, *Zystennieren - eine Übersicht*. Medgen, 2010. **22**: p. 322-331.
18. Zerres, K. and N. Ortiz Brüchle, [*Cystic kidney diseases*]. Internist (Berl), 2012. **53**(4): p. 419-21, 423-5, 427-8.
19. MacRae Dell, K. and E.D. Avner. *Polycystic Kidney Disease, Autosomal Recessive*. 2012; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1326/>.
20. Bergmann, C., et al., *Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD)*. Kidney Int, 2005. **67**(3): p. 829-48.
21. Ward, C.J., et al., *The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein*. Nat Genet, 2002. **30**(3): p. 259-69.
22. Onuchic, L.F., et al., *PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(5): p. 1305-17.
23. Sweeney, W.E. and E.D. Avner, *Molecular and cellular pathophysiology of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)*. Cell Tissue Res, 2006. **326**(3): p. 671-85.
24. Ortiz Brüchle, N., et al. *Mutation Database Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD/PKHD1)*. 2012; Available from: <http://www.humgen.rwth-aachen.de/>.
25. Rossetti, S. and P.C. Harris, *Genotype-phenotype correlations in autosomal dominant and autosomal recessive polycystic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(5): p. 1374-80.
26. Bergmann, C., et al., *Algorithm for efficient PKHD1 mutation screening in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)*. Hum Mutat, 2005. **25**(3): p. 225-31.
27. *SMART-Simple Modular Architecture Research Tool*. Available from: smart.embl-heidelberg.de/smart.
28. Menezes, L.F., et al., *Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm*. Kidney Int, 2004. **66**(4): p. 1345-55.
29. Follit, J.A., et al., *The cytoplasmic tail of fibrocystin contains a ciliary targeting sequence*. J Cell Biol, 2010. **188**(1): p. 21-8.

30. Zhang, J., et al., *Polycystic kidney disease protein fibrocystin localizes to the mitotic spindle and regulates spindle bipolarity*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(17): p. 3306-19.
31. Hiesberger, T., et al., *Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C*. J Biol Chem, 2006. **281**(45): p. 34357-64.
32. Kaimori, J.Y., et al., *Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia*. Hum Mol Genet, 2007. **16**(8): p. 942-56.
33. Wang, S., et al., *Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 3241-52.
34. Rohatgi, R., et al., *Mechanoregulation of intracellular Ca²⁺ in human autosomal recessive polycystic kidney disease cyst-lining renal epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(4): p. F890-9.
35. Kim, I., et al., *Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(3): p. 455-68.
36. Kim, I., et al., *Polycystin-2 expression is regulated by a PC2-binding domain in the intracellular portion of fibrocystin*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31559-66.
37. Wu, Y., et al., *Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(22): p. 3280-92.
38. Hogan, M.C., et al., *Characterization of PKD protein-positive exosome-like vesicles*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 278-88.
39. McCahill, A., et al., *The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms*. Mol Pharmacol, 2002. **62**(6): p. 1261-73.
40. Adams, D.R., D. Ron, and P.A. Kiely, *RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 22.
41. Stirnimann, C.U., et al., *WD40 proteins propel cellular networks*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(10): p. 565-74.
42. Vomastek, T., et al., *RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8296-305.
43. Serrels, B., et al., *A complex between FAK, RACK1, and PDE4D5 controls spreading initiation and cancer cell polarity*. Curr Biol, 2010. **20**(12): p. 1086-92.

44. Doan, A.T. and A. Huttenlocher, *RACK1 regulates Src activity and modulates paxillin dynamics during cell migration*. Exp Cell Res, 2007. **313**(12): p. 2667-79.
45. Mamidipudi, V. and C.A. Cartwright, *A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways*. Oncogene, 2009. **28**(50): p. 4421-33.
46. Li, S., et al., *Rack1 is required for Vangl2 membrane localization and planar cell polarity signaling while attenuating canonical Wnt activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(6): p. 2264-9.
47. Wehner, P., et al., *RACK1 is a novel interaction partner of PTK7 that is required for neural tube closure*. Development, 2011. **138**(7): p. 1321-7.
48. Kveiborg, M., et al., *Cellular roles of ADAM12 in health and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1685-702.
49. Abdul-Majeed, S. and S.M. Nauli, *Calcium-mediated mechanisms of cystic expansion*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(10): p. 1281-90.
50. Banales, J.M., et al., *The cAMP effectors Epac and protein kinase a (PKA) are involved in the hepatic cystogenesis of an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)*. Hepatology, 2009. **49**(1): p. 160-74.
51. Carroll, T.J. and A. Das, *Planar cell polarity in kidney development and disease*. Organogenesis, 2011. **7**(3): p. 180-90.
52. Fischer, E. and M. Pontoglio, *Planar cell polarity and cilia*. Semin Cell Dev Biol, 2009. **20**(8): p. 998-1005.
53. Fischer, E., et al., *Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease*. Nat Genet, 2006. **38**(1): p. 21-3.
54. Nishio, S., et al., *Loss of oriented cell division does not initiate cyst formation*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(2): p. 295-302.
55. Zebda, N., O. Dubrovskiy, and K.G. Birukov, *Focal adhesion kinase regulation of mechanotransduction and its impact on endothelial cell functions*. Microvasc Res, 2012. **83**(1): p. 71-81.
56. Israeli, S., et al., *Abnormalities in focal adhesion complex formation, regulation, and function in human autosomal recessive polycystic kidney disease epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(4): p. C831-46.
57. Drummond, I.A., *Polycystins, focal adhesions and extracellular matrix interactions*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(10): p. 1322-6.
58. Seeger-Nukpezah, T. and E.A. Golemis, *The extracellular matrix and ciliary signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2012.

59. Frank, V., *Molekulare Charakterisierung des PKHD1-Gens und seines Proteins Polyductin bei autosomal rezessiver polyzystischer Nierenerkrankung (ARPKD)*, 2009, RWTH Universität Aachen.
60. Kiely, P.A., et al., *Phosphorylation of RACK1 on tyrosine 52 by c-Abl is required for insulin-like growth factor I-mediated regulation of focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 2009. **284**(30): p. 20263-74.
61. Bourd-Boittin, K., et al., *RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis*. J Biol Chem, 2008. **283**(38): p. 26000-9.
62. Kawaguchi, N., et al., *ADAM12 induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 19): p. 3893-904.
63. Duffy, M.J., et al., *The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?* Clin Proteomics, 2011. **8**(1): p. 9.
64. Groot, A.J. and M.A. Vooijs, *The role of Adams in Notch signaling*. Adv Exp Med Biol, 2012. **727**: p. 15-36.
65. Yang, J., et al., *PKHD1 gene silencing may cause cell abnormal proliferation through modulation of intracellular calcium in autosomal recessive polycystic kidney disease*. J Biochem Mol Biol, 2007. **40**(4): p. 467-74.
66. Sun, L., et al., *Down-regulation of PKHD1 induces cell apoptosis through PI3K and NF- κ B pathways*. Exp Cell Res, 2011. **317**(7): p. 932-40.
67. Wang, F., et al., *RACK1 regulates VEGF/Flt1-mediated cell migration via activation of a PI3K/Akt pathway*. J Biol Chem, 2011. **286**(11): p. 9097-106.
68. Sun, L., et al., *Regulation of cell proliferation and apoptosis through fibrocystin-prosaposin interaction*. Arch Biochem Biophys, 2010. **502**(2): p. 130-6.
69. Stautz, D., et al., *ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity*. Exp Cell Res, 2010. **316**(1): p. 55-67.
70. Albrechtsen, R., et al., *Extracellular engagement of ADAM12 induces clusters of invadopodia with localized ectodomain shedding activity*. Exp Cell Res, 2011. **317**(2): p. 195-209.
71. Atfi, A., et al., *The disintegrin and metalloproteinase ADAM12 contributes to TGF-beta signaling through interaction with the type II receptor*. J Cell Biol, 2007. **178**(2): p. 201-8.

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1	ÜBERSICHT ALLER VON ZILIOPATHIEN BETROFFENEN ORGANE.....	10
ABBILDUNG 2	DIE HÄUFIGSTEN SYNDROMALEN ZILIOPATHIEN MIT DEN ASSOZIIERTEN GENEN; 11	
ABBILDUNG 3	ÜBERSICHT ÜBER AUFBAU UND SIGNALSTRUKTUREN.....	12
ABBILDUNG 4	AUFBAU DES PROTEINS FIBROCYSTIN.	16
ABBILDUNG 5	STRUKTUR DES 7-TEILIGEN B-PROPELLERS VON RACK1	19
ABBILDUNG 6	SCHEMATISCHER AUFBAU DER ADAM12-METALLOPROTEASE [48].....	21
ABBILDUNG 7	ÜBERSICHT ÜBER CALCIUM REGULIERTEN SIGNALWEGE.....	23
ABBILDUNG 8	VEKTORKARTE PEGFP MIT DER MCS.....	32
ABBILDUNG 9	VEKTORKARTE PCDNA6/V5/HIS MIT DER MCS.....	32
ABBILDUNG 10	VEKTORKARTE PRC/CMV MIT MCS	33
ABBILDUNG 11	VEKTORKARTE PCMV-MYC MIT MCS	33
ABBILDUNG 12	ZUSAMMENSETZUNG DES RENAL EPITHELIAL CELL MEDIA 2 READY FOR USE VON PROMOCCELL	36
ABBILDUNG 13	LAUFMUSTER DES BIOTINYLIERTEN WESTERN-BLOT MARKERS	37
ABBILDUNG 14	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES LIPOSOMS MIT EINGELAGERTER DNA.....	43
ABBILDUNG 15	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES ISOLIERUNGSPRINZIPS DES MINIMACS™ SYSTEM VON MILTENYI	46
ABBILDUNG 16	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER KONSTRUKTE DES PKHD1-GENS, DIE IN DIESER ARBEIT VERWENDET WURDEN.....	50
ABBILDUNG 17	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER COIMMUNOPRÄZIPITATION.....	54
ABBILDUNG 18	GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER IMMUNDETEKTION MIT HRP	58
ABBILDUNG 19	AUFBAU EINES AXIOVERT OBSERVER-IF-MIKROSKOPS VON CARL ZEISS GMBH	61
ABBILDUNG 20	ABLAUFSHEMA BEI EINSENDUNG VON PATIENTENMATERIAL.....	66
ABBILDUNG 21	PHASENKONTRAST-AUFNAHME VON PRIMÄR-NIERENEPIHELZELLEN UND IMCD-ZELLEN ALS KONTROLLE	67
ABBILDUNG 22	IF-AUFNAHME EINER EPITHELZELLE EINES ARPKD-PATIENTEN.	68
ABBILDUNG 23	ELEKTROPHEROGGRAMM DER <i>PKHD1</i> -MUTATION C.3885T>A (P.TYR1295X).....	70
ABBILDUNG 24	NEGATIVKONTROLL-BLOT DES MACS-SYSTEMS.....	71
ABBILDUNG 25	WESTERN-BLOTS DER COIMMUNOPRÄZIPITATION MIT DEM RACK-HA-FULL-LENGTH-PROTEIN UND DEM FIBROCYSTIN-C-TERM-HIS-KONSTRUKT IN COS-ZELLEN	72
ABBILDUNG 26	WESTERN-BLOT DER CO-IP MIT TRANSFIZIERTEN PRIMÄRZELLEN MIT RACK1-HA UND DEM FIBROCYSTIN-C-TERM-HIS KONSTRUKT.....	73
ABBILDUNG 27	TEIL 1 IMMUNFLUORESCENZ-STUDIE MIT RACK1-HA UND DEM FIBROCYSTIN-C-TERM-GFP-KONSTRUKT BEI SICH TEILENDEN IMCD-ZELLEN.....	74
ABBILDUNG 28	TEIL 2 DER IMMUNFLUORESCENZ STUDIE MIT RACK1-HA UND DEM FIBROCYSTIN-C-TERM-GFP KONSTRUKT BEI IMCD-ZELLEN IN RUHE IN 2 EBENEN AUFGENOMMEN	75

ABBILDUNG 29	IMMUNFLUORESCENZ DER ZELORGANELL-MARKER MIT DEN PROTEIN-KONSTRUKTE	77
ABBILDUNG 30	WESTERN-BLOT DER CO-IP MIT RACK1-HA UND DEM FIBROCYSTIN-IZ-HIS KONSTRUKT	78
ABBILDUNG 31	IMMUNFLUORESCENZ AUFNAHME EINER IN RUHE BEFINDLICHEN IMCD-ZELLE MIT DEM FIBROCYSTIN-IZ-GFP KONSTRUKT UND RACK1	79
ABBILDUNG 32	IMMUNFLUORESCENZ AUFNAHME ZUR DARSTELLUNG DER.....	80
ABBILDUNG 33	WESTERN BLOTS DER CO-IMMUNOPRÄZIPITATION MIT DEN WD40 KONSTRUKTEN 3- 5 UND 5-7 UND DEM FIBROCYSTIN-C-TERM-HIS KONSTRUKT	82
ABBILDUNG 34	WESTERN BLOTS DER EINZEL-AS-DELETIONSMUTANTEN	83
ABBILDUNG 35	IMMUNFLUORESCENZ-AUFNAHME ZUR KOLOKALISATION DER KONSTRUKTE RACK1- WD40-5-7 UND DEM C-TERMINALEN FIBROCYSTIN KONSTRUKT	84
ABBILDUNG 36	WESTERN-BLOT DER CO-IP MIT ADAM12-MYC	85
ABBILDUNG 37	INDIREKTER NACHWEIS VON ADAM 12.....	86
ABBILDUNG 38	IMMUNFLUORESCENZ-AUFNAHMEN ZUR KOLOKALISATION ZWISCHEN ADAM12 UND C-TERM-GFP	87
ABBILDUNG 39	IMMUNFLUORESCENZ-AUFNAHME MIT VIER FARBEN	89
ABBILDUNG 40	MÖGLICHER MECHANISMUS DER PROTEOLYSE DES N-TERMINALEN TEILS VON FIBROCYSTIN UND DIE FUNKTION DER INTERAKTION VON RACK1 UND ADAM 12.	101

Abkürzungsverzeichnis

ADPKD	autosomal-dominant-polyzystischen Nierenerkrankung
APS	Ammoniumpersulfat
ARPKD	autosomale rezessive polyzystische Nierenerkrankung
AS	Aminosäuren
ADAM12	a disintegrin and metalloprotease
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
cDNA	codierende DNA
Co-IP	Coimmunopräzipitation
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
dCTP	2'-deoxycytosine 5'-triphosphate
dGTP	2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate
dNTP	2'- Desoxyribonucleotid-5'-phosphate
dTTP	2'-deoxythymidine 5'-triphosphate
DNA	Desoxyribonucleinacid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ECM	Extrazellulären Matrix
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FPC	Fibrocystin/Polyductin
GFP	Green Fluoreszenz Protein
HA	Anti-Hemagglutinin
HRP	Meerretich-Peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IFT	Intraflagellar Transport System
IMCD	Inner medullary collecting duct
IPT	Immunoglobuline-like fold shared by Plexin Transcriptionfactors
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCS	multiple cloning site

ORF	Open Reading Frame
PbH1	Parallel beta-Helix 1
PBS	Phosphat buffered Saline
PCP	Planar cell polarity
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PKHD1	Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1
SDS	Sodiumdodecylsulfat
RACK1	Receptor for Activated C Kinase 1
RCAD	Renal Cysts and Diabetes Syndrom
RIP	regulierte Intramembran Proteolyse
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinasen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
YTH	yeast two hybrid

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bergmann danke ich für Bereitstellung des Themas und für die fachliche, geduldige wie freundliche Betreuung der Dissertation. Des weiteren möchte ich ihm danken für die Übernahme des ersten Berichters der Dissertation.

Herrn Univ. Prof. Dr. rer. nat. Johannes Bohrmann möchte ich für die freundliche Übernahme des Korreferates und das Interesse an meiner Arbeit danken.

Herrn Univ. Prof. Dr. med. Klaus Zerres danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Humangenetik auf dem weitläufigen Gebiet der zystischen Nierenerkrankungen anfertigen zu können. Und das ich während meiner Zeit am Institut Einblick in die spannende Welt der humangenetischen Diagnostik bekommen konnte.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nadina Ortiz Brüchle, die mir nicht nur fachlich sondern auch menschlich die manchmal anstrengenden Stunden in dieser Zeit erleichtert hat. Ich freue mich sehr sie als Arbeitskollegin kennengelernt zu haben und sie ist eine gute Freundin geworden. Ein weiterer besonderer Dank gilt Prof. Dr. Thomas Eggermann, der mich in der Zeit auch sehr mit Rat und Tat unterstützt hat. Allen anderen Mitarbeitern im Institut danke ich für die sehr kollegiale Arbeitsatmosphäre und den öfter mal benötigten Rat.

Bedanken möchte ich mich auch beim SFB TRR 57 „Organ fibrosis: From mechanism of injury to modulation of disease“ für die finanzielle Unterstützung der Dissertation und für die Möglichkeit mit den verbundenen Arbeitsgruppen kooperieren zu können.

Meinen Eltern möchte ich danken, die mir immer mit Trost und Aufmunterung zur Seite standen und die mit Ihrer Liebe und Unterstützung diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Katharina Gläsmann, die geduldig die vielen Stunden Schreiben und vorher die vielen Stunden im Labor unterstützt hat. Meine Liebe zu ihr hat mich immer durchhalten lassen.

Tel.: (02431) / 9759591
Mobil: 0162 / 6160303
E-Mail: andreasvenghaus@web.de

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname: Venghaus, Andreas
Geburtsdatum: 17.01.1982
Geburtsort: Schwerte
Anschrift: Karl-Platz-Str 13a
in 41812 Erkelenz
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch



Studium & Promotion

10/2007-08/2013

Promotion am Institut für Humangenetik Uniklinikum Aachen im SFB TRR 57 „Organ Fibrosis: From mechanism of injury to modulation of disease“
Thema: Charakterisierung und Identifizierung von Interaktionspartnern von Fibrocystin dem Protein der autosomalen-rezessiven-Polyzystischen-Nierenerkrankung

Besondere Kenntnisse: Immunfluoreszenz;
Proteinchemie, hier Co-IP, Western Blot; MACS etc;
allgemeine Zellkultur; insbesondere Anlegen von Primärzellkulturen; molekulargenetische Techniken wie PCR, Klonierung, RT-PCR, Mutagenese und SNP-Array Analysen
Übernahme von **diagnostischen Aufgaben der Humangenetik** (Molekulargenetik)

09/2002-08/2007

Studium der Molekularen Biologie an der Fachhochschule Gelsenkirchen (akkreditiert als uniäquivalenter Studiengang)
Masterarbeit: Untersuchung des Transports der GAG-Proteine von Retroviren an die Plasmamembran am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung Braunschweig; Proteinchemie; Arbeiten in S2-Zellkultur und Molekulargenetik

Berufsausbildung & Berufserfahrung

- 07/2006-08/2007 **Forschungsprojekt** am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung; Proteinchemie; Arbeiten in S2-Zellkultur und Molekulargenetik
- 02/2005-07/2005 **Praxisphase mit abschließender Bachelor-Arbeit** am Forschungszentrum Jülich in der Abteilung Physikalische Biologie
- 09/2001-08/2002 **Zivildienst als Biologisch-technischer-Assistent** am Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund
Toxikologische Analysen wie Comet-Assay, Neutralrot-Assay und Zellkultur in der Hauptsache Arbeiten mit Schimmelpilzgiften
- 07/2001-08/2001 **BTA** in der Abteilung Molekulare Botanik Prof. Kück der Ruhr Universität Bochum
DNA-Blottechniken, Klonierung und DNA-Isolierungen
- 08/1998-07/2001 **Ausbildung zum Biologisch-technischem-Assistenten** am Berufskolleg Olsberg mit zusätzlicher Erlangung der **Fachhochschulreife**

Schulbildung

- 07/1993-07/1998 Johann-Gutenberg-Realschule

Sprachkenntnisse

Englisch: Sehr gut

aktive Teilnahme mit Vorträgen/Poster an englischsprachigen Konferenzen

regelmäßige „Progress reports“ in englischer Sprache im SFB

Business Englisch Kurs TÜV-Rheinland Abschluss LCCI-Zertifikat

Sonstige Kenntnisse

Sehr gute Kenntnisse in den Office-Produkten Word, Excel, PowerPoint und Outlook Sehr gute Kenntnisse mit dem Programm SeqPilot (Auswertesoftware für DNA-Sequenzierungen) und der Analysesoftware für Immunfluoreszenz Axiovision von Zeiss

Publikationsliste Andreas Venghaus

1. L. Sun; S. Adhi Susanto; G. Viol Hemgard; A. Venghaus; Z. Y. Jingxiu; Z. Su; M. Wirth **Interplay of Caveolin-1 with Virus Structural Proteins During the Infection Cycle**
(Poster 2008 2nd International PhD Symposium Helmholtz Zentrum für Infektionserkrankungen)
2. Venghaus A., Ortiz Bruchle N., Frank V., Wali S., van Spaendonck-Zwarts K.Y., Giltay J., Cremer F.W., Rossier E., Jonsson J., Zerres K., Bergmann C. **NPHP3 mutations can cause Ivemark syndrome and may mimic recessive polycystic kidney disease**
Medizinische Genet 1-2009 (Vortrag, Tagung der GFH)
3. A.Venghaus, N. Ortiz Bruchle, K. Zerres, C. Bergmann **Validating an in-silico score to determine the nature of putative splice site variants on the basis of PKHD1 alterations**
Medizinische Genet 1-2010 (Poster, Tagung der GFH)
4. Bergmann C., Ortiz Bruchle N., von Bothmer J., Venghaus A., Zerres K. **Additional hypomorphic mutations in different PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease**
Medizinische Genet 1-2010 (Poster Tagung der GFH)
5. C. Bergmann, J. von Bothmer, N. Ortiz Bruchle, A. Venghaus, V. Frank, H. Fehrenbach, T. Hampel, L. Pape, A. Buske, J. Jonsson, N. Sarioglu, A. Santos, J. C. Ferreira, J. U. Becker, R. Cremer, J. Hoefele, M. R. Benz, L. T. Weber, R. Buettner, and K. Zerres **Mutations in Multiple PKD Genes May Explain Early and Severe Polycystic Kidney Disease** (JASN Nov 1, 2011 22: 2047-2056;
6. A.Venghaus, N. Ortiz Bruchle, C. Rottländer, C. Bergmann, K. Zerres **Update der PKHD1-Datenbank für die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD)** (Poster, Tagung der GPN 2011)

7. A. Venghaus, M. Begemann, J. von Bothmer, C. Bergmann, K. Zerres, N. Ortiz Brüche. **Estimation of *PKHD1* deletion frequencies in a patient cohort with one previously detected sequence alteration by MLPA analysis.** Medizinische Genet 1-2011 (Poster, Tagung der GFH)
8. Ortiz Brüche, N, Spengler, S, Venghaus, A, von Bothmer, J, Rudnik-Schöneborn, S, Eggermann T, Bergmann C, Zerres, K **Ciliopathies: Experiences with SNP array based homozygosity screening as a rational diagnostic approach in consanguineous families**
Medizinische Genet 1-2011 (Poster, Tagung der GFH)
9. J. von Bothmer, A. Venghaus, C. Bergmann, M. Blandfort, K. Zerres, N. Ortiz Brüche **Identification of an unusual *BBS4* two exon deletion**
Medizinische Genet 1-2011 (Poster, Tagung der GFH)
10. Andreas Venghaus; **Functional and structural characterisation of the *PKHD1* protein polyductin in the etiology of liver fibrosis**
Vortrag 1st Transregio Workshop SFB/TRR 57 2011 (nicht zitier fähig)
11. T. Eggermann, A. Venghaus and K. Zerres **Cystinuria: an inborn cause of urolithiasis**
Orphanet Journal of Rare Diseases 2012, 7:19
12. T. Eggermann, S. Spengler, A. Venghaus, B. Denecke, K. Zerres, M. Baudis, R. Ensenauer, **2p21 Deletions in hypotonia–cystinuria syndrome** European Journal of Medical Genetics, Volume 55, Issue 10, October 2012, Pages 561-563,
13. N. Ortiz Brüche, M. Begemann, A. Venghaus, J. von Bothmer, T. Eggermann, K. Zerres **Implementation of a next generation sequencing panel based approach in ciliopathy diagnostics**
Medizinische Genet 1-2012 (Poster, Tagung der GFH)
14. A. Venghaus, I. Rieck, J. von Bothmer, K. Zerres, N. Ortiz Brüche **Improvement of the *PKHD1* mutation database for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD)**
Medizinische Genet 1-2012 (Poster, Tagung der GFH)

Erklärung

Ich versichere diese Arbeit ohne Hilfe Fremder und nur mit Hilfe zugelassener Hilfsmittel geschrieben zu haben.

Erkelenz den 14.08.2013

M. Sc. Andreas Venghaus