
*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL*

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***IN-VIVO NACHWEIS DER INTERAKTION ZWISCHEN
POLYCYSTIN-1 UND POLYCYSTIN-2***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Karl Eugen Metzger

2016

*AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MOLEKULARE UND ZELLULÄRE ANATOMIE
PROF. DR. RALPH WITZGALL*

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

***IN-VIVO NACHWEIS DER INTERAKTION ZWISCHEN
POLYCYSTIN-1 UND POLYCYSTIN-2***

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Karl Eugen Metzger

2016

Dekan: Prof. Dr. Thomas Dresselhaus
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralph Witzgall
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Frank Schweda
Tag der mündlichen Prüfung: 14.04.2016

Die vorliegende Arbeit wurde angeleitet von Herrn Prof. Dr. Ralph Witzgall und Frau Dr. Karin Babinger im Zeitraum von Mai 2012 – November 2015.

1	Einleitung	1
1.1	Anatomische und physiologische Grundlagen	1
1.1.1	Die Niere	1
1.1.2	Das primäre Zilium	2
1.2	Autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung	4
1.2.1	Klinische Symptomatik und Pathogenese	4
1.2.2	Genetik	6
1.2.3	Polycystin-1	7
1.2.4	Polycystin-2	9
1.2.5	Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2	12
1.3	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation	14
1.4	Zielstellung.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Chemikalien und Reagenzien	17
2.2	Verbrauchsmaterial und Kits.....	18
2.3	Geräte und Software	19
2.4	Antikörper	21
2.5	Desoxyribonukleotide	23
2.5.1	Plasmide.....	23
2.5.2	Oligonukleotide.....	23
2.6	Enzyme	25
2.6.1	Restriktionsendonukleasen	25
2.6.2	Nukleinsäuren-modifizierende Enzyme	25
2.7	Zellen	26
2.7.1	Bakterien	26
2.7.2	Säugerzellen	26
2.8	Arbeit mit Bakterien	27
2.8.1	Messung der optischen Dichte	28
2.8.2	Herstellung der elektrokompetenten Zellen.....	28
2.8.3	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	28
2.9	Arbeit mit Säugerzellen.....	30
2.9.1	Kultivierung von Säugerzellen	30
2.9.2	Passagieren	30
2.9.3	Einfrieren und Auftauen.....	31
2.9.4	Transfektion mit Poly-L-Ornithin	32
2.9.5	Transfektion mit Polyethylenimin.....	33
2.9.6	Zelllyse zur Proteingewinnung	33

2.9.7	Immuncytochemie	34
2.9.8	Hämatoxylin-Eosin Färbung	35
2.10	Arbeiten mit DNA.....	36
2.10.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> („kleiner Maßstab“)	36
2.10.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> („mittlerer Maßstab“)	37
2.10.3	Konzentrationsbestimmung von DNA im Spektrophotometer	37
2.10.4	Phenol-Chloroform-Extraktion	38
2.10.5	DNA-Fällung	38
2.10.6	Gelelektrophorese mit Agarose-Gelen	38
2.10.7	Elution von DNA aus Agarose-Gelen	39
2.10.8	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	39
2.10.9	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
2.10.10	Dephosphorylierung von DNA mittels alkalischer Phosphatase	41
2.10.11	Ligation	41
2.10.12	Sequenzanalyse	42
2.11	Arbeiten mit Proteinen	42
2.11.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	42
2.11.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	43
2.11.3	Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Etablierung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation	47
3.2	Klonierung der Plasmide	50
3.2.1	Plasmid pVC210/PKD2,HA	51
3.2.2	Plasmid pUC-Trans/mPkd1,VN210	52
3.2.3	Plasmid pVN210-N1/Cystin	53
3.3	Generierung einer stabilen LLC-PK ₁ -Zelllinie	54
3.4	Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium.....	57
3.5	Negativkontrolle mit VN210/cystin.....	60
3.6	Negativkontrolle mit VN210/cofilin	62
4	Diskussion.....	64
4.1	Diskussion der verwendeten Methoden	65
4.1.1	Etablierung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation.....	65
4.1.2	Generierung einer stabilen LLC-PK ₁ -Zelllinie.....	67
4.2	Polycystin-1 interagiert mit Polycystin-2 im primären Zilium renaler Epithelzellen.....	68
4.3	Negativkontrollen	69
4.4	Ausblick.....	70

5	Zusammenfassung	71
6	Abkürzungsverzeichnis	73
7	Literaturverzeichnis	75
8	Lebenslauf	89
9	Danksagungen	90
10	Eidesstattliche Erklärung	91

1 Einleitung

1.1 Anatomische und physiologische Grundlagen

1.1.1 Die Niere

Die retroperitoneal paarig angelegten Nieren (lat. ren; gr. nephros) kommen in der Fossa lumbalis zu liegen und sind von bohnenförmiger Gestalt, wobei der konvexe Rand nach lateral und der konkave Rand nach medial zeigt. Hier findet sich als Einziehung das Hilum renale, die Ein- und Austrittspforte aller zu- und abführenden Leitungsbahnen. Jede Niere besitzt eine Größe von ca. 12 x 3 x 6 cm (ca. 200 ml) und eine Masse von 120-200 g. Über die Arteria renalis wird die Niere mit sauerstoffreichem Blut versorgt, während die Vena renalis sauerstoffarmes Blut drainiert. Über den Ureter ist die Niere mit der Harnblase verbunden. Lymphe wird über ein zartes Lymphkapillarnetz gesammelt und am Hilum renale über wenige Lymphgefäße abgegeben. Nerval wird die Niere über sympathische postganglionäre Fasern des Plexus coeliacus versorgt, die parasymphatische Versorgung entstammt dem Nervus vagus. Die Niere wird von drei Kapseln umhüllt. Von innen nach außen sind dies als dünne, aber feste Organkapsel die Capsula fibrosa, als Fettschicht die Capsula adiposa, welche die beiden am cranialen Nierenpol gelegenen Nebennieren mit einschließt, während all dies von der Fascia renalis umschlossen wird. Makroskopisch kann man im Schnittbild das Nierenparenchym in äußere Nierenrinde (Cortex renalis) und zum Hilum gerichtetes pyramidenförmiges Nierenmark (Medulla renalis) unterscheiden. Die Spitzen der Nierenmarkspapillen münden in den Hohlraum der Nierenkelche (Calix renalis), welche zusammen das Nierenbecken (Pelvis renalis) bilden, aus welchem der Ureter hervorgeht (Schünke et al., 2009; Benninghoff et al., 2008)

Die Hauptaufgabe der Niere ist die Homöostase und Zusammensetzung der Körperflüssigkeiten in Bezug auf Ionenkonzentration, pH-Wert, Osmolarität und Menge. Des Weiteren ist sie für die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten und körperfremden Stoffen zuständig und spielt durch die Bildung von

Renin, Erythropoetin und Calcitriol eine wichtige systemische Rolle als endokrines Organ (Schmidt et al., 2010; Hick et al., 2009).

Die mikroskopische Grundeinheit der Niere bildet das Nephron, von welchen je Niere ca. eine Million vorhanden sind. Ein Nephron gliedert sich in ein 200 µm großes Nierenkörperchen (Corpusculum renale) und daran anschließendes Nierenkanälchen (Tubulus renalis). Das Corpusculum renale besteht aus einem Kapillarknäuel, welches von der Bowman-Kapsel umgeben wird. Hierbei umschließt das viszerale Blatt das Kapillarknäuel, das parietale Blatt grenzt das Nierenkörperchen von der Umgebung ab. Zwischen beide Blätter der Bowman-Kapsel wird als Ultrafiltrat des Blutes der proteinarme Primärharn abgegeben (ca. 180l/d) und gelangt über den Harnpol des Glomerulus in seinen Tubulus renalis. In diesem wird ein Großteil des Filtrats selektiv rückresorbiert, ausscheidungspflichtige Stoffe werden sezerniert. Der Tubulus renalis mündet schließlich in Sammelrohre, welche den Harn in die Calices renalis des Nierenbeckens abgeben (Schmidt et al., 2010; Hick et al., 2009; Lüllmann-Rauch, 2009; Benninghoff et al., 2008;)

1.1.2 Das primäre Zilium

Als Zilien bezeichnet man schlanke apikale Zellfortsätze, die ein „Skelett“ aus Mikrotubuli enthalten und von einer Membran umgeben sind, welche in die Plasmamembran der Zelle übergeht. Grundsätzlich unterscheidet man primäre (nicht-motile) von sekundären (motilen) Zilien. Sekundäre Zilien zeichnen sich durch neun ringförmig angeordnete periphere Mikrotubulipaare und ein zentrales Mikrotubulipaar aus (9x2 + 2 Struktur), wohingegen bei primären Zilien das zentrale Mikrotubulipaar fehlt (9x2 + 0 Struktur). Darüber hinaus fehlen primären Zilien die radialen Speichen und Proteine des Dynein-Apparates, welche den sekundären Zilien die Motilität ermöglichen. (Praetorius und Spring, 2004; Wang und Dong, 2013). Die ziliären Mikrotubuli bestehen aus α- und β- Tubulin und können vielfach posttranslational modifiziert werden (Konno et al., 2012). Hierbei ist für ziliäres α-Tubulin unter anderem die Acetylierung typisch und wird als Epitop in der Immuncytochemie zur Detektion von primären Zilien verwendet (Sloboda, 2009). Das Mikrotubuliskelett der primären Zilien entwickelt sich aus

den Zentriolen und kann in Kultur bis zu 30 μm lang werden, *in vivo* beträgt ihre Länge jedoch ca. 2-3 μm (Wheatley und Bowser, 2000). Primäre Zilien kommen in Nieren von Säugetieren in der Bowman-Kapsel, proximalen und distalen Tubulus sowie den Hauptzellen des Sammelrohrs vor. Bei Schaltzellen konnten keine primären Zilien detektiert werden (Webber und Lee, 1975).

Das Wachstum der Zilien erfolgt von der Mutterzentriole ausgehend an der Spitze des Ziliums. Die hierfür benötigten Proteine werden über ein spezielles intraflagelläres Transportsystem (IFT) angeliefert (Praetorius und Spring, 2004). Dieses Transportsystem hat sich als unentbehrlich für die Ziliogenese erwiesen und ist evolutionär von *C. elegans* bis hin zu Säugern stark konserviert (Wang und Dong, 2013). Beim IFT handelt es sich um ein bidirektionales Transportsystem aus anterogradem Transport zur Spitze des Axonemas und entsprechendem retrograden Transport in Richtung Basalkörper. Bisher ist bekannt, dass am IFT über 20 Proteine beteiligt sind, welche sich in die Komplexe A und B aufteilen lassen (Wang und Dong, 2013). Treten an Genen, deren Translationsprodukte am IFT beteiligt sind, Mutationen auf, führt dies zu schweren funktionellen Defekten. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen in IFT88, welches Komplex B zuzurechnen ist, in *Chlamydomonas* die Ausbildung von Zilien verhindert. IFT88 ist homolog zu Tg737, einem beim Menschen und der Maus vorkommenden Gen. Mäuse mit Mutationen in Tg737 sterben kurz nach der Geburt an der polyzystischen Nierenerkrankung. Weiterhin konnten hier deutlich kürzere Zilien gefunden werden als normalerweise (Pazour et al., 2000). Dies lässt auf eine wichtige Rolle der primären Zilien in der Physiologie der Niere und der Pathogenese der polyzystischen Nierenerkrankung schließen (Pazour et al., 2000; Praetorius und Spring, 2004). Die Arbeitsgruppe um Schwartz et al. konnte 1997 die reversible Beugung primärer Zilien durch Scherkräfte infolge eines physiologischen Flüssigkeitsstromes an Nierenepithelzellen nachweisen und damit die bereits existierende Hypothese einer mechanosensorischen Funktion der Zilien bekräftigen. Ein Nachweis dieser Funktion konnte von Praetorius und Spring im Jahr 2001 erbracht werden, welche ein Ansteigen des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels nach Beugen des primären Ziliums an MDCK-Zellen (Nierenepithelzellen des Hundes) beobachteten. Später konnte gezeigt werden, dass die beiden im primären Zilium lokalisierten Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 am Ca^{2+} -Einstrom als Antwort auf einen physiologischen Flüssigkeits-

strom beteiligt sind. Verlust oder Dysfunktionen der Proteine Polycystin-1 oder Polycystin-2 führen zu einer eingeschränkten Signalweiterleitung. Dies lässt darauf schließen, dass mechanische Stimuli zur normalen Morphogenese des Gewebes aufgrund von Mutationen nicht korrekt verarbeitet werden und dies zum Bild der polyzystischen Nierenerkrankung führt (Nauli et al., 2003).

1.2 Autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung

1.2.1 Klinische Symptomatik und Pathogenese

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD; ICD-10: Q61) ist mit einer Inzidenz von 1:1000 eine der häufigsten monogenen Erbkrankheiten überhaupt und manifestiert sich klinisch im Alter zwischen der dritten und fünften Lebensdekade. ADPKD wird häufig über Mikro- und Makrohämaturie, Proteinurie, Polyurie (v.a. Nykturie), arterielle Hypertonie, rezidivierende Zysteninfektionen oder mittels radiologischer Bildgebung (Nephromegalie) diagnostiziert. Diese Symptome treten meist weit vor einem Absinken der glomerulären Filtrationsrate zu Tage. Oft erreichen die Nieren ein Volumen von über 1000 ml, bevor es zur eingeschränkten Nierenfunktion kommt. Das Stadium der terminalen Niereninsuffizienz wird meist im Alter von 50 bis 60 Jahren erreicht (Schermer und Benzing, 2010), die ADPKD stellt mit einem Anteil von 10% eine der Hauptursachen hierfür (Gallagher et al., 2002).

Phänotypisch zeigt sich eine progrediente Akkumulation von Zysten im Nierenparenchym, eine Anhäufung im Bereich der Sammelrohre und proximalen Nierentubuli ist bekannt (Heggö et al., 1966; Verrani und Silva, 1988; Gallagher et al., 2002). Die Zysten entwickeln sich aus einigen wenigen kortikalen und medullären Tubuli. Durch eine erhöhte Proliferationsrate der Nierentubulusepithelzellen vergrößert sich der Durchmesser einzelner Tubuli initial auf ca. 100 µm. Im histologischen Querschnitt kann eine Verdopplung der umlaufenden Epithelzellen auf über 12 Stück beobachtet werden (Madsen und Brenner, 1994; Gallagher, 2006; Grantham et al., 2011). Das Zystenlumen bleibt mit Primärharn und transepithelial sezernierter Flüssigkeit gefüllt (Grantham, 1993).

Solange Zystenlumen und Nierentubulus in Verbindung stehen, kann der Primärharn weiter stromabwärts fließen. Es verändern sich Elektrolytgehalt und pH-Wert, welche nun eher dem Urin im Bereich der Sammelrohre entsprechen (Gardner, 1969; Huseman et al., 1980). Abbildung 1 zeigt eine solche initiale Zyste.

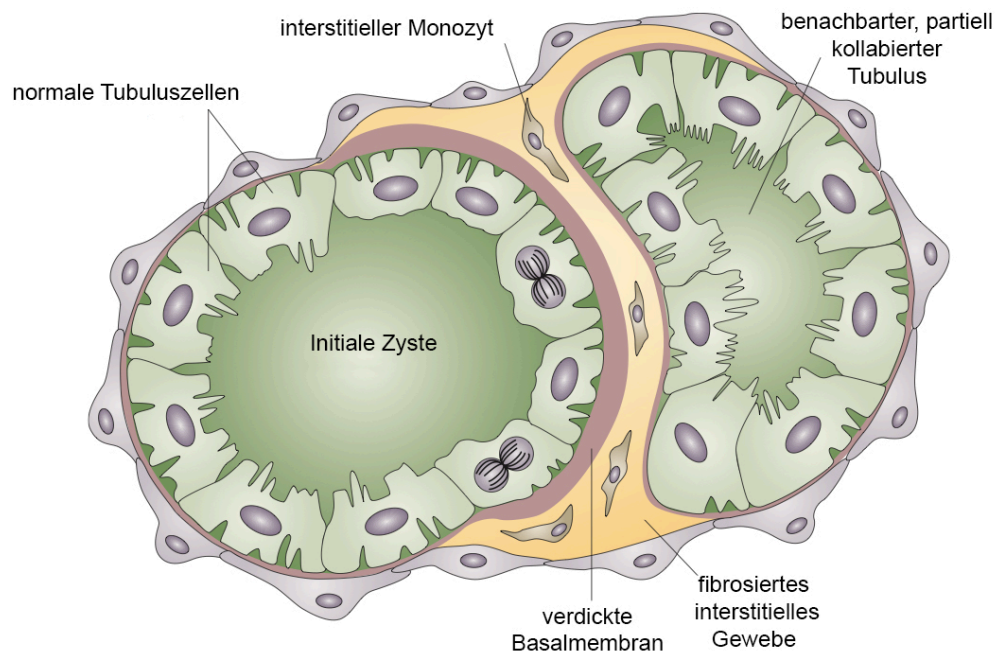


Abbildung 1: Initiale Zyste mit Hyperproliferation des Nierentubulusepithels. Modifiziert nach Grantham et al, 2011

Da die Sekretion von Chlorid in das Zystenlumen hinein größer ist als die Resorption der Solute, wachsen die Zysten durch den Flüssigkeitseinstrom kontinuierlich (Sullivan et al, 1998). Durch Hyperproliferation der Nierentubulusepithelzellen und Hypersekretion in das Zystenlumen kommt es zur mechanischen Kompression des umliegenden Nierenparenchyms (Grantham et al., 1987, 2011). Expandierende Zysten verdrängen Blut- und Lymphgefäße sowie Tubuli und unterbrechen deren Strömung. In Abbildung 1 ist ein benachbarter, partiell kollabierter Tubulus gezeigt. Die Apoptose, Atrophie und Fibrose des noch funktionierenden Nierenparenchyms wird durch Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren durch die Zysten gefördert (Gran-

tham et al., 2011). Die sich ausbreitende Obstruktion der Nephronen führt, zusammen mit den interstitiellen inflammatorischen und fibrosierenden Prozessen, zur weitgehenden Zerstörung des verbliebenen Parenchyms und zum Funktionsverlust der Niere. Trotz des progredienten Verlustes von gesundem Nierenparenchym sinkt die glomeruläre Filtrationsrate aufgrund von Kompensationsmechanismen nicht erkrankter Abschnitte erst im späteren Krankheitsverlauf stark ab (Grantham et al., 2011). Die Expansion der Zysten geht mit einer enormen Zunahme des Nierenvolumens und -gewichts einher, welches auf bis zu 4 kg je Niere ansteigen kann (Martinez und Grantham, 1995)

Bei Patienten mit ADPKD sind stets beide Nieren betroffen, häufig ist eine Zystenbildung in anderen Organen (Leber, Pankreas) zu beobachten. Weitere extrarenale Manifestationen wie Mitralklappenprolaps und -insuffizienz, Aortenklappenanomalien sowie intrakranielle Aneurysmen sind seltener (Martinez und Grantham, 1995; Gallagher et al., 2002; Pirson, 2010; Schermer und Benzing, 2010).

Symptomatisch kann mittels verschiedener Dialyseverfahren (durch Brescia-Cimino-Fistel, Demerskatheter, Peritonealdialyse etc.) therapiert werden, kausal bleibt zur Heilung lediglich die allogene Nierentransplantation.

1.2.2 Genetik

Genetisch gesehen ist die ADPKD eine monogenetische Erkrankung, bei welcher die Mutation in einem der beteiligten Gene zum entsprechenden Phänotyp führt. Mutationen des Gens *PKD1* [„Polycystic Kidney Disease“], welches für das Protein Polycystin-1 kodiert, zeichnen für 85% der Fälle verantwortlich. Der überwiegende Anteil der restlichen Fälle wird durch Mutationen im Gen *PKD2*, kodierend für das Protein Polycystin-2, ausgelöst. Des Weiteren wird die Existenz eines dritten Genlokus vermutet (Sutters, 2006), da bei einigen Patienten keine Mutationen in *PKD1* und *PKD2* nachgewiesen werden konnten. Eine erneute Analyse der Betroffenen unterstützt diese Hypothese jedoch nicht (Paul et al., 2013). Obwohl Patienten mit Mutationen in einem der beiden bekannten Genloci ähnliche Phänotypen zeigen, ist der Krankheitsverlauf aufgrund von Mutationen im Gen *PKD2* meist milder und die Zeit bis zum terminalen Nieren-

versagen der Patienten etwa 16 Jahre länger (53 bzw. 69 Jahre) (Veldhuisen et al., 1997; Hateboer et al., 1999). Dies ist auf ein früheres Auftreten und eine erhöhte Anzahl an Zysten, jedoch nicht auf eine erhöhte Wachstumsgeschwindigkeit der Zysten im Fall von Mutationen des Gens *PKD1* zurückzuführen (Harris et al., 2006).

Obwohl ADPKD autosomal-dominant vererbt wird, ist es auf zellulärer Ebene rezessiv. Da sich die Nieren normal entwickeln, lange Zeit völlig normal funktionieren und sich in nur 5% der Nephrone Zysten bilden, wurde eine sogenannte „second hit“- Hypothese formuliert. So muss es, damit es zum Funktionsverlust des entsprechenden Proteins kommt, neben der Keimbahnmutation zu einer zweiten, somatischen Mutation des entsprechenden Allels kommen. Folgt man dieser Hypothese, wird klar, dass jede Zyste für sich auf der Grundlage einer somatischen Mutation entsteht. Dies erklärt unter anderem auch die langsame Progression der Krankheit über Jahrzehnte hinweg (Qian et al., 1996; Brasier und Henske, 1997; Qian und Germino, 1997; Chapin und Caplan, 2010). Die „second hit“- Hypothese konnte für *PKD1* an menschlichen Zystennieren (Qian et al., 1996; Brasier und Henske, 1997) und für *PKD2* zuerst am Tiermodell (Wu et al., 1998) und später an Humanmaterial bekräftigt werden (Koptides et al., 1999).

1.2.3 Polycystin-1

Das in ADPKD Typ 1 mutierte Gen *PKD1* kodiert für das Protein Polycystin-1 und ist auf Chromosom 16p13.3 lokalisiert (European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Das *PKD1* Gen umfaßt 46 Exone, welche einen Bereich von ungefähr 52 kbp genomischer Sequenz umfassen und in eine ca. 14 kb lange mRNA transkribiert werden (Gallagher et al., 2002; Bastos und Onuchic, 2011). *PKD1* wird außer in den Epithelzellen der Nierentubuli auch in einer Vielzahl anderer Gewebe, darunter Herz, Leber, Knochen und endokrinen Drüsen, exprimiert (Ward et al., 1996; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Markowitz et al., 1999; Peters et al., 1999; Chapin und Caplan, 2010). Die Synthese des Proteins ist in embryonalem Nierengewebe am höchsten und nimmt ab der 20. bis 24. Schwangerschaftswoche deutlich ab. In adultem Nierengewebe ist

Polycystin-1 in geringen Mengen zu detektieren, hier vor allem im Bereich der distalen Tubuli und Sammelrohre (Chauvet et al., 2002; Yoder et al., 2002). Auf zellulärer Ebene kann Polycystin-1 vorwiegend im primären Zilium und der lateralen Domäne der Plasmamembran gefunden werden (Yoder et al., 2002; Nauli et al., 2003; Chapin und Caplan, 2010).

Polycystin-1 ist ein 4302 Aminosäuren großes, mehrfach glykosyliertes, elf Transmembranhelices umfassendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 460 kDa. Während das N-terminale Ende von Polycystin-1 nach extrazellulär orientiert ist, befindet sich der C-Terminus intrazellulär (Nims et al., 2003). Am über 3000 Aminosäuren langen, extrazellulären N-Terminus finden sich zwei Cystin-flankierte, Leucin-reiche Wiederholungen, eine low-density-lipoprotein (LDL-A)-Domäne, eine C-Typ-Lektin ähnliche Domäne sowie 16 Wiederholungen von Immunglobulin-ähnlichen PKD-Domänen (Wilson, 2004). Ein über 1000 Aminosäuren langes, extrazelluläres REJ (receptor for egg jelly) Modul lässt eine mögliche Rolle im Kalziumtransport vermuten. Bisher ist jedoch wenig über Struktur oder Funktion dieses Moduls bekannt (Xu et al., 2013). C-terminal finden sich mehrere Phosphorylierungsstellen und eine Prolin-reiche Domäne, welche als Protein-Protein-Interaktionsstelle von Bedeutung sein soll (Wilson, 2004). Ebenso beinhaltet der C-Terminus eine coiled-coil Domäne (AS 4193 bis 4248), welche entscheidend beim Membrantransport und der Interaktion mit Polycystin-2 beteiligt ist. Diese Interaktion konnte 1997 unabhängig voneinander von Qian et al. und Tsiokas et al. *in vitro* gezeigt werden. Von Parnell et al. konnte 1998 eine 74 AS lange G-Protein aktivierende Domäne ausgemacht werden, eine Funktion als G-Protein gekoppelten Rezeptor wird daher diskutiert.

Aufgrund der komplexen Struktur scheint Polycystin-1 eine Rolle als Oberflächenmechanorezeptor sowohl bei Zell-Zell- als auch bei Zell-Matrix-Interaktionen zu spielen. Hierbei werden grundsätzlich extrazelluläre mechanische Stimuli in eine intrazelluläre Reaktion umgewandelt. Bei Polycystin-1 könnte der extrazelluläre Teil gewisse Stimuli aufnehmen und diese mittels des intrazellulären Anteils und einer möglichen Interaktion mit Polycystin-2 weiterleiten (Dalagiorgou et al., 2010). Weiterhin aktiviert Polycystin-1 einen G-Protein gekoppelten Signalweg über die direkte Bindung an ein heterotrimeres G-Protein, wodurch eine Modulation von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und

GIRK K^+ -Kanälen über die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins erfolgt (Parnell et al., 1998, Zhou 2009). Ob diese Aktivierung des Signalweges durch Polycystin-1 jedoch auch unter physiologischen Bedingungen *in vivo* anzutreffen ist, ist derzeit ungeklärt (Zhou, 2009). Weiterhin ähneln die letzten sechs Transmembranhelices TRP-Kanälen und Domänen von Na^+ und Ca^{2+} Kanälen. Eine alleinige Expression von *PKD1* zeigt jedoch keine messbare Kanalaktivität, was darauf schließen lässt, dass Polycystin-1 alleine keinen Ionenkanal darstellt (Hanaoka et al., 2000).

In Verbindung zur ADPKD sind bisher eine Vielzahl an unterschiedlichen Mutationen in *PKD1* beschrieben, welche zur Pathogenese der ADPKD führen können (Gallagher et al., 2002). So führt beispielsweise eine Keimbahnmutation nach Aminosäure 4226 zum Stopp der Translation in jenem Bereich, welcher die coiled-coil Domäne von Polycystin-1 enthält und an der Interaktion mit Polycystin-2 entscheidend beteiligt ist (Peral et al., 1996; Qian et al., 1997).

1.2.4 Polycystin-2

Natürlicherweise auftretende Mutationen in *PKD2*, welche den C-Terminus von Polycystin-2 betreffen, führen zum klinischen Bild der ADPKD (Mochizuki et al., 1996). Das mutierte Gen *PKD2* ist auf Chromosom 44q21-q23 lokalisiert und kodiert für das Protein Polycystin-2 (Kimberling et al., 1993). Es umfasst ca. 68 kbp genomischer DNA, ist auf 15 Exone verteilt (Mochizuki et al., 1996) und wird in eine 2,1 kb lange mRNA transkribiert (NCBI Referenzsequenz: XR_244632.1). *PKD2* wird in fast allen embryonalen und adulten Geweben exprimiert, vor allem jedoch in Niere, Ovar, Hoden, Darm und embryonalem Lungengewebe. Eine Ausnahme bilden hier Leukozyten, in ihnen konnte eine Expression von *PKD2* nicht nachgewiesen werden (Mochizuki et al., 1996). Das Protein Polycystin-2 ist 968 Aminosäuren lang und besitzt 6 Transmembranhelices, wobei die zweite und vierte Schleife ebenso wie der N- und C-Terminus intrazellulär zu liegen kommen (Mochizuki et al., 1996; Hoffmeister, 2008). Polycystin-2 konnte 1999 von Cai et al. als 110 kDa großes, mehrfach glykosyliertes Protein beschrieben werden. C-terminal der letzten Transmembranhelix gelegen befindet sich eine funktionell überaus wichtige Region mit einer EF-Hand-

Domäne, einer für Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtigen coiled-coil-Domäne sowie ein ER-Retentionssignal (Mochizuki et al., 1996; Cai et al., 1999; Celić et al., 2008). Die Helix-Loop-Helix-Struktur der EF-Hand-Domäne bindet Ca^{2+} -Ionen und löst damit Konformationsänderungen des Proteins aus, was eine Rolle in der Signalweiterleitung von veränderten Ca^{2+} -Konzentrationen spielt (Mochizuki et al., 1996; Gifford et al., 2007). Aufgrund ähnlicher Topologie sowie bekannter Sequenzhomologie mit TRP-Kanälen wird Polycystin-2 diesen zugerechnet (Tsiokas et al., 1999). TRP-Kanäle (transient receptor potential) besitzen eine für Kationen wenig selektive Porenregion im Bereich zwischen der fünften und sechsten Transmembranhelix sowie typischerweise intrazellulär gelegene N- und C-Termini (Clapham et al., 2001). Ebenso besitzt Polycystin-2 Sequenzhomologien mit Polycystin-1 und mit spannungsabhängigen Ca^{2+} und Na^{+} -Kanälen (Mochizuki et al., 1996). Polycystin-2 fungiert als Ca^{2+} regulierter, nicht-selektiver Kationenkanal, welcher aufgrund der Steigerung der lokalen Ca^{2+} -Konzentration Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern freisetzt (González-Perrett et al., 2001, Vassilev et al., 2001, Koulen et al., 2002). Hierbei wird die Ca^{2+} durchlässige Pore von der Schleife zwischen den Transmembranhelices fünf und sechs unter Mitwirkung der dritten Transmembranhelix gebildet (Clapham et al., 2001; Koulen et al., 2002).

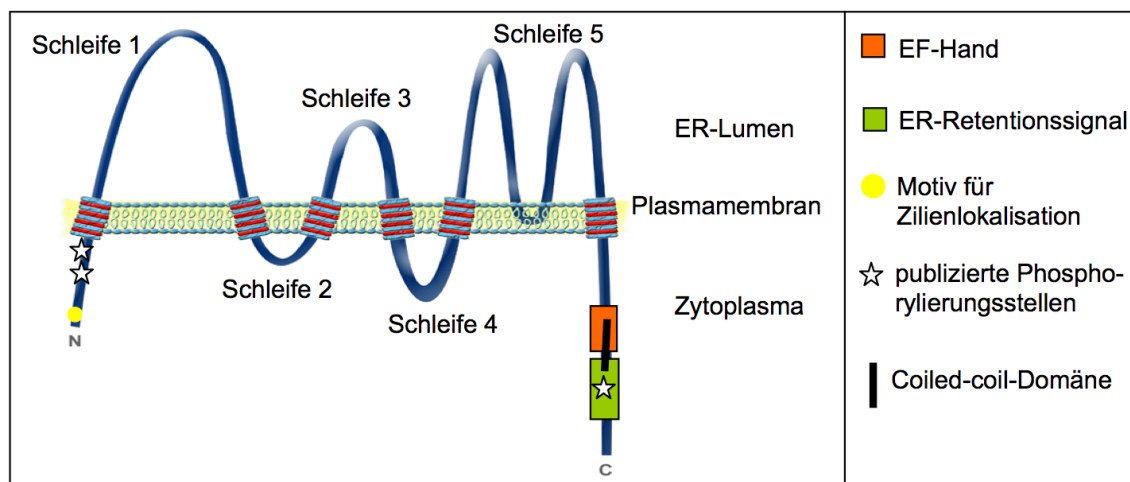


Abbildung 2: Topologie-Modell von Polycystin-2, nach Hoffmeister (2008).

Bisher konnten mehrere Signalmotive identifiziert werden, welchen eine wichtige Rolle beim Exportprozess zukommt. So findet sich C-terminal eine 34 Aminosäuren lange Sequenz, die für die Lokalisation des Proteins am endoplasma-

tischen Retikulum zuständig ist (Cai et al., 1999). Die Arbeitsgruppe um Geng et al. konnte 2006 ein stark konserviertes, sogenanntes RVxP-Motiv in den ersten 15 Aminosäuren nachweisen, welches für die Zilienlokalisierung benötigt wird. Wann dieses jedoch in den Transport eingreift, ist ungeklärt (Hoffmeister et al., 2011). Ein weiteres Exportmotiv, zuständig für die Lokalisation von Polycystin-2 in der somatischen Plasmamembran, wurde später auf die Aminosäuren 572-577 eingegrenzt (Hoffmeister et al., 2011).

Der Großteil von Polycystin-2 findet sich im endoplasmatischen Retikulum und cis-Golgi-Netzwerk, wo es eine entscheidende Rolle in der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen spielt (Cai et al., 1999; Koulou et al., 2002; Hoffmeister et al., 2011). Der intrazelluläre Transport vom endoplasmatischen Retikulum zur ziliären Plasmamembran wurde durch Hoffmeister und Babinger 2011 beschrieben. Hierbei postuliert die Arbeitsgruppe, dass der Großteil des Polycystin-2 Proteins in Abhängigkeit von COP-II das ER verlässt und anschließend vom cis-Golgi-Netzwerk mittels der 34 Aminosäuren umfassenden C-terminalen Sequenz wieder zurückgeschickt wird. Ein wesentlich kleinerer Anteil aber wird vom cis-Golgi-Netzwerk direkt, ohne Umweg über die somatische Plasmamembran, zum primären Zilium umgelenkt und dort Rab8a-abhängig integriert. Die Anwesenheit von Polycystin-2 in der somatischen Plasmamembran wird kontrovers diskutiert. Am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg wird davon ausgegangen, dass Polycystin-2 unter pathophysiologischen Bedingungen mittels des KLFKFI-Motiv das Golgi-Netzwerk passieren und die somatische Plasmamembran erreichen kann.

Im primären Zilium ist Polycystin-2 mit Polycystin-1 kolokalisiert (Yoder et al., 2002) und scheint Teil eines gemeinsamen Signalweges zu sein (siehe 1.2.5). Neben den genannten Interaktionen tritt Polycystin-2 mit einer Reihe weiterer Proteine in Wechselwirkung, diese sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Da die Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 jedoch im Fokus dieser Arbeit steht, soll im Folgenden darauf näher eingegangen werden.

Bindungspartner	Bindungsposition in Polycystin-2	Quelle
α -Aktinin	AS 1-215 (N-Terminus) und AS 821- 878 (C-Terminus)	Li et al., 2005b
Id2	AS 741-968	Li et al., 2005a
CD2AP	AS 836-968	Lehtonen et al., 2000
Hax-1	Schleifenregion 5	Gallagher et al., 2000
IP3R	AS 680-872	Li et al., 2005c
KIF3B	AS 1-215 (N-Terminus) und AS 682- 968 (C-Terminus)	Wu et al., 2006
KIF3A	AS 872-927	Li et al, 2006
TRPC1	TM-Bereich 2-5 und AS 822-895	Tsiokas et al., 1999
Tropomyosin-1	AS 821-878	Li et al., 2003a
Troponin I	AS 872-927	Li et al. 2003b
mDia1	AS 851-969	Rundle et al., 2004
PACS-1 und PACS-2	AS 741-871: saurer Cluster des ER- Retentionssignals	Köttgen et al., 2005
PIGEA-14	AS 833-923	Hidaka et al., 2004
Polycystin-1	AS 687-968 bzw. 742-968	Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997
Polycystin-2	AS 687-968 bzw. 742-871	Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Gallagher et al., 2006

Tabelle 1: Übersicht der Bindungspartner von Polycystin-2, nach Hoffmeister (2008).

1.2.5 Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2

Da Mutationen sowohl in *PKD1* als auch in *PKD2* zur Pathogenese der ADPKD mit ähnlichen Phänotypen führen (vgl. 1.2.2.), erscheint es sinnvoll, von einer gemeinsamen Signalkaskade oder einem heteromeren Proteinkomplex auszugehen, durch welchen die Proteine direkt in Interaktion treten (Arnaout, 2001). Störungen führen hierbei offenbar zu einer veränderten Signalweiterleitung vom primären Zilium mit entsprechend veränderter Epithelentwicklung und –funktion.

Bisher konnten Polycystin-1 und Polycystin-2 in primären Zilien renaler Epithelien nachgewiesen werden (Yoder et al., 2002; Zhou et al., 2009). Weiterhin wurde unabhängig voneinander in Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen gezeigt, dass beide Proteine zur Bildung von Heterodimeren mittels ihrer coiled-coil Domänen der zytoplasmatischen C-Termini in der Lage sind (Tsiokas et al., 1997, Qian et al., 1997). An CHO (**C**hinese **h**amster **o**vary) - Zellen konnte der Nachweis einer Kanalaktivität des Heterodimers erbracht werden. So führte die Co-Expression von *PKD1* und *PKD2* zu einer messbaren, 20-fach stärkeren Kanalaktivität im Vergleich zur Kontrolle (Hanaoka et al., 2000). Dabei erreicht das Polycystin-like Protein (PCL), ein dem Polycystin-2 zu 50% identisches und zu 71% ähnliches Protein, bei alleiniger Expression in *Xenopus* Oozyten ähnliche Werte für die Durchlässigkeit von Kationen (Chen et al., 1999; Hanaoka et al., 2000). Dies lässt darauf schließen, dass im Polycystin-Komplex die durchlässige Pore von Polycystin-2 gebildet wird (Hanaoka et al., 2000). Weiter konnte nachgewiesen werden, dass der durch die Interaktion entstandene Kanal unselektiv gegenüber Kationen ist, wobei er gegenüber Ca^{2+} -Ionen eine bis zu sechsfach höhere Permeabilität im Vergleich zu einwertigen Kationen wie Na^+ oder Cs^+ -Ionen zeigt (Hanaoka et al., 2000). Darüber hinaus scheint die Interaktion der beiden Proteine Polycystin-2 zu stabilisieren und die Kanalaktivität zu erhöhen (Xu et al., 2003).

Neben der Bildung eines Ionenkanals durch den Polycystin-Komplex wird eine Rolle als G-Protein-gekoppelter Rezeptor diskutiert, wobei Polycystin-1 als Oberflächenrezeptor fungieren und die Aktivität des Komplexes von Polycystin-2 reguliert werden soll (Delmas et al., 2002; Delmas et al., 2004). Ebenso wird dem Proteinkomplex eine Rolle in der Regulation des Zellwachstums über eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges zugeschrieben, welche den Einfluss von Mutationen in einem der beiden Proteine auf das Zellwachstum erklärt (Bhunja et al., 2002).

Durch Yoder und Mitarbeiter konnte 2002 gezeigt werden, dass die an der Entstehung von ADPKD beteiligten Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 mit Polaris und Cystin, beide unmittelbar an der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung beteiligt, im primären Zilium kolokalisiert sind. Dies lässt vermuten, dass dieses Zellkompartiment generell eine wichtige Rolle in physio-

logischen Funktionen renaler Epithelien und der Pathogenese dieser Erkrankungsgruppe spielt.

1.3 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation

Die Interaktion von Proteinen spielt in der Ausführung und Koordination biologischer Prozesse eine entscheidende Rolle. Proteininteraktionen in lebenden Zellen zu beobachten ist deshalb von großer Bedeutung, da die Interaktion selbst grundsätzlich von der Anwesenheit weiterer Proteine und externer Stimuli abhängig ist. So können beispielsweise Einblicke in die subzelluläre Lokalisation der Interaktion gewonnen werden (Kerppola, 2008; Kerppola 2009). Deshalb wird zur Untersuchung der Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 auf eine Methode zurückgegriffen, welche die direkte Beobachtung der Proteininteraktion in Zellen ermöglicht. Die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation ermöglicht die Beobachtung solcher Interaktionen und basiert auf der Komplementation zweier nicht fluoreszierender Fragmente eines fluoreszierenden Proteins, wenn diese mittels der Interaktion zweier weiterer Proteine in enge räumliche Nähe gebracht werden (Kerppola, 2008; Kerppola 2009). Abbildung 3 zeigt dies schematisch.

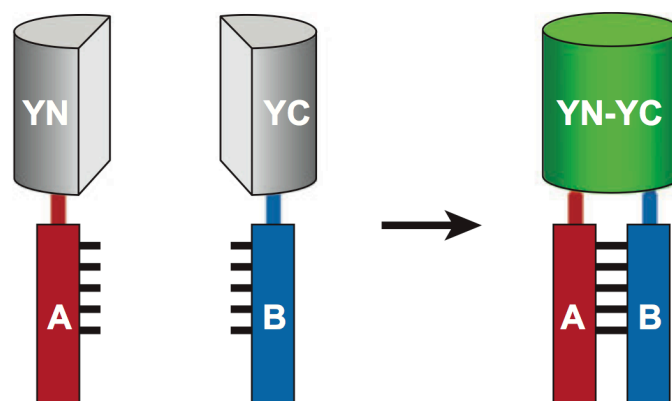


Abbildung 3: Schematische Darstellung der BiFC. Zwei nicht fluoreszierende Fragmente des gelb-fluoreszierenden Proteins (YN+YC) werden mit potentiellen Interaktionspartnern (A+B) fusioniert. Findet die Interaktion von A und B statt, bildet sich der fluoreszierende Komplex.
Nach Kerppola (2008)

Neben der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation stehen noch andere Methoden, z.B. über die Nutzung des Förster-Resonanzenergietransfers (Förster, 1948), zur Untersuchung von Proteininteraktionen zur Verfügung. Nachteilig ist hierbei die geringe Sensitivität, da nur ein Bruchteil der Interaktionspartner eine Emission zeigen (Kerppola, 2008). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass Änderungen der Interaktion sofort detektiert werden können (Majoul et al, 2002; Kerppola, 2009). Da im Rahmen dieser Arbeit eine zeitliche Auflösung jedoch nicht von Bedeutung ist und die BiFC aufgrund starker Fluoreszenz eine direkte Beobachtung ohne das Einbringen exogener chromogener und fluorogener Substrate erlaubt (Kerppola, 2008), wird in dieser Arbeit die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als geeignete Methodik zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 verwendet. Als fluoreszierendes Protein wird eine verbesserte Variante des gelb-fluoreszierenden Proteins verwendet. Diese im Folgenden „Venus“ genannte Mutante bietet eine höhere Stabilität, stärkere Fluoreszenz und ist weniger sensitiv gegenüber pH-Wert und Cl⁻-Ionen-Konzentration als andere bisher bekannte Proteine (Nagai et al., 2002, Shyu et al., 2006).

1.4 Zielstellung

Mutationen in *PKD1* oder *PKD2* führen zur autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung. Bisher konnten die Genprodukte sowohl von *PKD1* als auch von *PKD2* im primären Zilium lokalisiert werden (Yoder et al., 2002). Die für den C-Terminus von Polycystin-1 publizierte Interaktion mit dem C-Terminus von Polycystin-2 (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997; Hidaka et al., 2004) konnte durch Arbeiten von Bosk (2007) und Hoffmeister (2008) mittels Quarzmikrowaagemessungen bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Interaktion der beiden Proteine vollständig reversibel zu sein scheint (Hoffmeister, 2008). Hierbei lässt die Stärke der Interaktion beider Proteine auf eine physiologische Relevanz dieser Interaktion schließen (Hoffmeister, 2008). Um nun die Lokalisation der Interaktion auf zellulärer Ebene *in vivo* zu ergründen, bedarf es weiterer Experimente. Hierfür erscheint die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation aufgrund der hohen Sensitivität äußerst hilfreich. Da diese Methode am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg bisher keine Verwendung findet, ist zunächst deren Etablierung an der hier verwendeten Zelllinie angezeigt.

Im Verlauf kann dann als Ziel dieser Arbeit der Nachweis der Lokalisation der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 *in vivo* formuliert werden. Hierzu werden zuerst geeignete Plasmide kloniert, welche sowohl für eines der beiden Proteine als auch jeweils für ein Fragment eines fluoreszierenden Proteins kodieren. Die erzeugten Plasmide werden nun mittels dauerhafter und transienter Transfektion in Nierentubulusepithelzellen (LLC-PK₁) eingebracht und exprimiert. Nach erfolgter Expression der Plasmide erfolgt die Fixierung der Zellen mit anschließender Immuncytochemie, Mikroskopie und Dokumentation.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Roth, Karlsruhe, D.
Ampicillin	Roth, Karlsruhe, D.
APS	Sigma, St. Louis, USA
Bis-Benzimide H33258	Sigma, St. Louis, USA
BSA	Roth, Karlsruhe, D.
DMEM high Glucose	Sigma, St. Louis, USA
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
EDTA	Roth, Karlsruhe, D.
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D.
Ethanol	Sigma, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
FCS	PAN Biotech, Aidenbach, D.
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D.
HCl	Roth, Karlsruhe, D.
Kanamycin	Sigma, St. Louis, USA
KOAc	Merck, Darmstadt, D.
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, D.
Methanol	Merck, Darmstadt, D.
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	Merck, Darmstadt, D.
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	Merck, Darmstadt, D.
NaCl	VWR, Darmstadt, D.
NaOH	Merck, Darmstadt, D.
Natriumacetat	Sigma, St. Louis, USA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D.
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, D.
Poly-L-Ornithin	Sigma, St. Louis, USA
Polyethylenimin	Polysc. Inc., Warrington, USA
Puromycin	PAA Lab., Pasching, Ö.
RotiQuant	Roth, Karlsruhe, D.
SDS	Applichem, Gatersleben, D.

Tris	Sigma, St.Louis, USA
Triton-X-100	Serva, Heidelberg, D.
Trypsin	PAA Lab., Pasching, Ö.
Tween	Roth, Karlsruhe, D.

2.2 Verbrauchsmaterial und Kits

Deckgläschen, Glas, 12 mm	VWR, Darmstadt, D.
Deckgläschen, Glas, 22 mm	VWR, Darmstadt, D.
Deckgläschen, Glas, 24 x 60 mm	Roth, Karlsruhe, D.
Dialyseplättchen	Millipore GmbH, Eschborn, D.
Gel-Extraktionskit für Agarosegele	VWR, Darmstadt, D.
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Fermentas, St. Leon-Rot, D.
Glaspipetten	VWR, Darmstadt, D.
Glaspipetten 10 ml	Brandt, Wertheim, D.
Glaspipetten 2 ml	Brandt, Wertheim, D.
Glaspipetten 20 ml	Brandt, Wertheim, D.
Glaspipetten 5 ml	Brandt, Wertheim, D.
Handschuhe, Latex	Kimberley-Clark, Irving, USA
Kryovial-Cups	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Küvetten für Elektroporator, Plastik	
<i>E. coli</i> PulserCuvette, 1mm	BioRad, Hercules, USA
Küvetten, Plastik, 1 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Mikrotiterplatte, Plastik, 24-Napf	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Mikrotiterplatte, Plastik, 6-Napf	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Neubauer-Zählkammer mit Deckglas	Brand, Wertheim, D.
Objektträger, Glas, 76 x 26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, D.
PCR-Cups	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Petrischalen, Plastik, 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Petrischalen, Plastik, 6 cm	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Pipettenspitzen, Plastik	Sarstedt, Nümbrecht, D.

Pipettenspitzen, Plastik, mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Plasmid Plus Midi Kit	Qiagen, Venlo, NL.
Immobilon-P Transfermembran	
PVDF-Membran, 0,45 µm Porengröße	Millipore, Billerica, USA
Reaktionscups 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Reaktionscups 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Reaktionsgefäß, 15 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Reaktionsgefäß, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Serologische Pipetten, Plastik, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Serologische Pipetten, Plastik, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Serologische Pipetten, Plastik, 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Sterilfilter, 0,22 µm	VWR, Darmstadt, D.
Zellkulturflaschen, Plastik, 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Zellkulturflaschen, Plastik, 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, D.
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, D.

2.3 Geräte und Software

Agarose-Gelelektrophorese Dokumentationssystem „Gel Max“	Intas, Göttingen, D.
Agarose-Gelelektrophorese Midisystem „Easy cast“	OWL, Waltham, USA
Agarose-Gelelektrophorese Minisystem	
Horizon 58	Gibco, Darmstadt, D.
Autoklav Tuttnauer 5050ELV	Tuttnauer, Breda, NL.
Brutschrank APT.line™ CB	Binder, Tuttlingen, D.
Drehrad für Eppendorf-Cups	Werkstatt Univ. Regensburg
Eismaschine AF-10	Scotsman, Vernon Hills, USA
Elektroporator GenePulserXCell	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer Mini-PROTEAN TetraCell	BioRad, Hercules, USA
Heizblock MR 3001	Heidolph, Schwabach, D.
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D.
Inkubationsschrank Kelvitron t	Heraeus, Hanau, D.

Inkubationsschüttler Unitron	Infors, Einsbach, D.
Mikropipette LABMate 100 - 1000 µl	LABMATE, Hertfordshire, UK.
Mikropipette LABMate 2 - 20 µl	LABMATE, Hertfordshire, UK.
Mikropipette LABMate 20 - 200 µl	LABMATE, Hertfordshire, UK.
Mikropipette PIPETMAN 0,2 - 2 µl	Gilson, Middleton, USA
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon, Tokio, J.
PCR-Cycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D.
pH-Meter „766 Calimatic“	Knick, Berlin, D.
Quarzküvette QS 1.000	Hellma, Müllheim, D.
Schüttler für SDS-Gele und Membranen	Oehmen, Essen, D.
SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese-System	
Mini Protean® II Electrophoresis Cell	BioRad, Hercules, USA
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	
SE 600 Series Electrophoresis Unit	Hoefer, Holliston, USA
Spannungsgeber Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, D.
Spektrometer U2000	Hitachi, Chiyoda, J.
Thermostat “Polystat cc1”	Huber, Offenburg, D.
Transferzelle TransBlot SD	BioRad, Hercules, USA
Vortex VF2	Janke + Kunkel, Staufen, D.
Waage BL1500S	Sartorius, Göttingen, D.
Wasseraufbereitungsanlage Seralpur pro 90 CN	Seral, Celle, D.
Zellkulturarbeitsbank Lamin Air HA 2448 GS	Heraeus, Hanau, D.
Zentrifuge CT15RE	HIMAC, Ontario, Canada
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Electron, München, D.
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau, D.

2.4 Antikörper

Tabelle 2 zeigt die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Primärantikörper.

Name	anti-GFP	Verwendung: IC
Epitop	Grünfluoreszierendes Protein (GFP)	
Spezies	Kaninchen, polyklonal	
Verdünnung	1:300	
Hersteller	Molecular Probes	
Name	anti-HA	Verwendung: IC, WB
Epitop	Hämagglutinin (Aminosäuren 98-106)	
Spezies	Kaninchen, polyklonal	
Verdünnung	1:200	
Hersteller	Molecular Probes	
Name	anti-acetyliertes Tubulin	Verwendung: IC
Epitop	Acetyliertes Tubulin	
Spezies	Maus, monoklonal	
Verdünnung	1:600	
Hersteller	Sigma	
Name	anti-HA	Verwendung: IC
Epitop	Hämagglutinin	
Spezies	Maus, monoklonal	
Verdünnung	1:50	
Hersteller	Santa Cruz Biotech	

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper.

Die Tabelle 3 zeigt die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Sekundärantikörper.

Name	anti-Rabbit DyLight 405	Verwendung: IC
Epitop	Erkennung von IgG des Kaninchens	
Spezies	Esel, polyklonal	Verdünnung 1:600
Hersteller	Rockland	
Name	anti-Mouse DyLight 405	Verwendung: IC
Epitop	Erkennung von IgG der Maus	
Spezies	Esel, polyklonal	Verdünnung 1:600
Hersteller	Rockland	
Name	anti-Rabbit Alexa 488	Verwendung: IC
Epitop	Erkennung der schweren Ketten von IgG sowie den leichten Ketten der anderen Immunglobuline des Kaninchens	
Spezies	Ziege, polyklonal	Verdünnung 1:600
Hersteller	Invitrogen	
Name	anti-Mouse Alexa 633	Verwendung: IC
Epitop	Erkennung der schweren Ketten von IgG sowie den leichten Ketten der anderen Immunglobuline der Maus	
Spezies	Ziege, polyklonal	Verdünnung 1:600
Hersteller	Invitrogen	
Name	anti-Rabbit Alexa 633	Verwendung: IC
Epitop	Erkennung der schweren Ketten von IgG sowie den leichten Ketten der anderen Immunglobuline des Kaninchens	
Spezies	Ziege, polyklonal	Verdünnung 1:600
Hersteller	Invitrogen	
Name	anti-Rabbit HRP	Verwendung: WB
Epitop	Erkennung von IgG des Kaninchens	
Spezies	Ziege, polyklonal	Verdünnung 1:15000
Hersteller	Sigma	

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

2.5 Desoxyribonukleotide

2.5.1 Plasmide

Tabelle 4 zeigt die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Plasmide.

Bezeichnung	Herkunft
pUC-trans/PKD1,HA	Aus Institutsbestand
Venus-Vektoren	K. Mizuno, Tohoku Universität Sendai, Japan
pJOE	J. Altenbuchner, Uni Stuttgart
pcDNA/PKD2,HA	Aus Institutsbestand
pUHD10-3/cystin	Aus Institutsbestand

Tabelle 4: Übersicht über die Herkunft der verwendeten Plasmide

2.5.2 Oligonukleotide

Tabelle 5 zeigt die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
Sp6	TATTTAGGTGACACTATAG	Sequenzierung
pkd2 HA_Xbal	ATTATCTAGAAGCGTAATCTG GAACATCGTATG	PCR
NheI pkd2	TTGCCGTACCTGACTTAGCC	PCR
PKD1 uni	CAGTGGACCCGTTTCGTGCGC	PCR
PKD1 Xbal	TCGTCTCTAGAAGTCGTGCTG CTGGGGTGGAC	PCR
PKD1 5' rev	TGGGAGACGTCTAGCGCTGTG	PCR
PKD1 BglII rev	CCCGTTGCCAGGGAAGATCTC	PCR
EcoRI PKD1	GCGCTGCCCTGAATTCGCCGCCC	PCR
EcoRI PKD1_2	CCCTGAATTCGCCGCCCCGCG CGCCC	PCR
EcoRI PKD1_3	GCGCTGCCCTGAATTCGCCG CCCGC	PCR
VN210 rev (NotI)	GCGGCCGCTCAGTCTTTGCTCA GGGC	PCR
SacII pkd2 (1/30) R28A	CCGCGGCCATCAGCGCGCCC GGGTCC	PCR
VN210 uni (MluI)	AAACGCGTATGGTGAGCAAGG GCG	PCR
VN210 rev (PmeI)	AGTTTAAACTCAGTCTTTGCTCA GGGC	PCR
Cystin (XhoI) uni	CTCGAGATGGGCAGCGGCAGCAG	PCR
Cystin (AgeI) rev	ACCGGTAAGCGGCAGTACTCCC GCTC	PCR
Cystin (XhoI) uni	CTCGAGATGGGCAGCGGCAGCAG	PCR
Cystin (AgeI) rev	ACCGGTAAGCGGCAGTACTCCCG CTC	PCR

Tabelle 5: Im Rahmen dieser Dissertation verwendete Oligonukleotide

2.6 Enzyme

Zu den jeweiligen Enzymen wurden stets die dazugehörigen 10-fach konzentrierten Puffer und Reaktionszusätze verwendet, die von den entsprechenden Firmen für das jeweilige Produkt empfohlen wurden.

2.6.1 Restriktionsendonukleasen

<i>AflII</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>AseI</i>	10 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>BamHI</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>BglII</i>	10 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>Eco147I</i>	20 U/μl	Fermentas, St.Leon-Rot, D.
<i>EcoRI</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>HpaI</i>	5 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>NdeI</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>NheI-HF</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>NotI-HF</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>SmaI</i>	20 U/μl	Fermentas, St.Leon-Rot, D.
<i>SpeI</i>	10 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>XbaI</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
<i>XhoI</i>	20 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA

2.6.2 Nukleinsäuren-modifizierende Enzyme

T4 DNA-Ligase	400 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
Antarctic Phosphatase	5 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
Phusion DNA-Polymerase	2 U/μl	NEB Inc., Ipswich, USA
RNAse A	100 U/mg	Applichem, Gatersleben, D.

2.7 Zellen

2.7.1 Bakterien

Der in Tabelle 6 angezeigte Bakterienstamm wurde im Rahmen dieser Dissertation zur Transformation und Amplifikation von DNA verwendet.

Name	Selektion	Bezeichnung	Herkunft
ElektroMax DH10B	keine	Elektrokompetente <i>Escherichia coli</i> vom Stamm DH10B	Invitrogen

Tabelle 6: Bakterienstamm DH10B

2.7.2 Säugerzellen

Die in Tabelle 7 angezeigte Zelllinie wurde im Rahmen dieser Dissertation für transiente oder stabile Transfektion mit den unter 2.5.1 aufgeführten Plasmiden verwendet.

Name	Selektion	Bezeichnung	Herkunft
LLC-PK ₁	keine	Nierentubulusepithelzellen des Schweins	Joseph V. Bonventre, HMS, Boston, USA

Tabelle 7: Säugerzelllinie LLC-PK₁

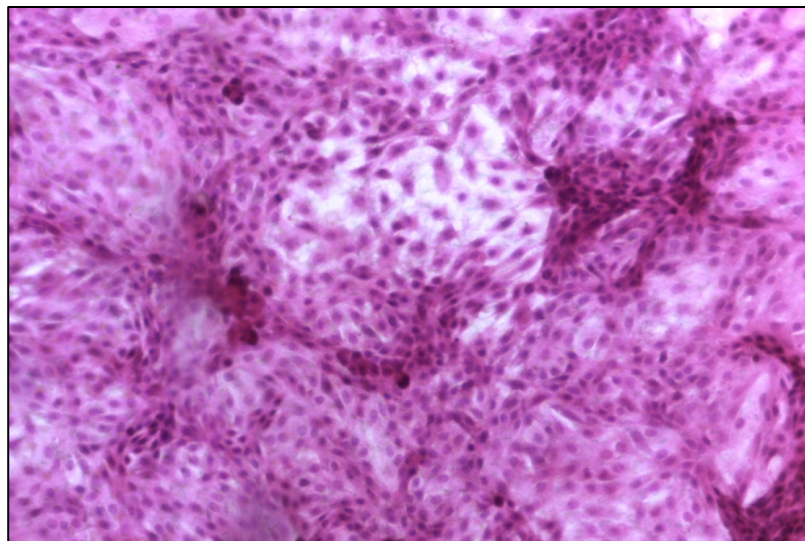


Abbildung 4: LLC-PK₁ -Zellen in 20-facher Vergrößerung und Hämatoxylin-Eosin Färbung

2.8 Arbeit mit Bakterien

Während der Arbeit mit Bakterien wird auf sterile Kautelen geachtet. Verwendete Materialien werden autoklaviert, respektive mittels eines 0,22 µm Filters sterilfiltriert. Die Anzucht von Bakterien erfolgt über Nacht bei 37°C und 250 U/min im Inkubationsschüttler ausgehend von einer Glyzerin Stammkultur beziehungsweise von auf LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien. Das hierfür verwendete Kulturmedium enthält das für den jeweiligen Bakterienstamm notwendige Antibiotikum in entsprechenden Konzentrationen. Zur Transformationsselektion werden LB-Amp-Agarplatten sowie LB-Kana-Agarplatten verwendet. Agarplatten werden in temperaturkonstanten Brutschränken bei 37°C bebrütet.

Lösung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl ad 1000 ml A. bidest.; autoklaviert
Kanamycin	25 mg/ml; sterilfiltriert; Endkonz. 30 µg/ml
Ampicillin	50 mg/ml; sterilfiltriert; Endkonz. 500 µg/ml

Tabelle 8: Zusammensetzung der Lösungen für die Aufzucht von Bakterien.

2.8.1 Messung der optischen Dichte

Für die Messung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen wird 1 ml der entsprechenden Kultur in eine Plastikküvette überführt und im Spektralphotometer bei 600 nm vermessen. Werden Absorptionswerte über 1,0 erreicht, erfolgt eine Verdünnung der Proben mit entsprechendem Medium und die erneute Ermittlung der optischen Dichte. Als Referenzwert dient das jeweilige Kulturmedium. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht einer Kulturdichte von 8×10^8 *E. coli* Bakterien pro ml Nährmedium.

2.8.2 Herstellung der elektrokompetenten Zellen

Von einer 50 ml Übernachtskultur der entsprechenden Bakterien werden 500 ml des LB-Mediums auf eine optische Dichte von 0,1 beimpft und bei 30°C bis zu einer optischen Dichte von 0,6 bebrütet. Jeweils 50 ml der Lösung werden aliquotiert und 30 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation bei 1.500 g und 4°C für 10 min werden die Pellets mit je 50 ml eiskaltem Aqua bidest. gewaschen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Pellets mit 20 ml eiskaltem Aqua bidest. gewaschen und jeweils zwei Pellets zusammengefasst und für 15 min auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation werden die Pellets in 10 ml Aqua bidest. zusammengefasst und für 15 min auf Eis gestellt, erneut zentrifugiert und in 1 ml 90% Aqua bidest.-10% Glyzerin Lösung resuspendiert. Die 40 µl Aliquots dieser Lösung werden bei -80°C gelagert.

2.8.3 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Zur Elektroporation von *E. coli* werden 20 µl eines Ligationsansatzes für 45 min auf Dialyseplättchen gegen Aqua bidest. bei Raumtemperatur dialysiert. Die elektrokompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und die Transformationsküvetten auf Eis gekühlt. Am Elektroporator wird das entsprechende Programm vorgewählt (*E. coli*, 2 mm, 2,5 kV). Zu den Zellen werden 7 µl der dialysierten

DNA gegeben und die DNA-Zell-Suspension in die Küvette pipettiert. Durch leichtes Klopfen gegen die Küvette werden eventuelle Luftblasen entfernt, die Küvette in den Elektroporator gestellt und der Puls gestartet. Nun wird 1 ml des vorgehaltenen LB-Mediums zugegeben und die Zellen in ein Mikroreaktionsgefäß überführt. Nach 40 min Inkubation bei 37°C werden die Zellen für 20 s bei 10.000 g zentrifugiert und 900 µl des Überstandes verworfen. Das Pellet wird resuspendiert und auf die entsprechenden LB-Agar-Platten mit Antibiotikum ausgestrichen. Diese werden über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.9 Arbeit mit Säugerzellen

2.9.1 Kultivierung von Säugerzellen

LLC-PK₁ wachsen adhärent und werden im Inkubator bei einer Temperatur von 37°C und einer CO₂ Begasung von 5% kultiviert. Die Arbeit an dieser Zelllinie wird in sterilem Umfeld an dafür geeigneten Arbeitsbänken durchgeführt, wobei vor und nach Arbeitsbeginn alle verwendeten Hilfsmittel mit 70%igem Ethanol behandelt oder abgeflammt werden. Pro 25 cm² Flasche wird stets 5 ml Medium verwendet. Werden abweichende Flaschen benutzt, so errechnet sich die Menge an verwendetem Medium aus den jeweiligen Größenverhältnissen der Grundflächen. LLC-PK₁ werden etwa alle drei Tage 1:10 gesplittet. Als Medium wird DMEM mit einer Endkonzentration von 10% FCS (siehe Tabelle 9) verwendet.

Substanz	Konzentration und Lagerung
DMEM 4,5 g Glucose/Liter	verdünnt mit 10% FCS, Lagerung bei 4°C
Fetales Kälberserum (FCS)	unverdünnt; -20°C in 50 ml Aliquots
Puromycin	1 µg/ml Medium, sterilfiltriert; -20°C

Tabelle 9: Arten, Konzentration und Lagerung der in der Zellkultur benutzten Substanzen

2.9.2 Passagieren

Zunächst wird das Medium von den Zellen abgesaugt. Anschließend werden die Zellen mit PBS (siehe Tabelle 10) zweifach gewaschen, um für das Trypsin störende Proteinreste zu entfernen. Hierbei wird pro 25 cm² Zellkulturflasche jeweils 5 ml PBS verwendet. Nach Absaugen des PBS wird 1 ml der Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Danach werden die Zellkulturgefäße bis zum vollständigen Ablösen der Zellen vom Gefäßboden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Medium wird der Lysevorgang gestoppt und anschlie-

ßend werden die Zellen vorsichtig resuspendiert. Nun können die Zellen in entsprechender Menge neu ausgesät werden, wobei je 25 cm² Zellkulturflasche 5 ml Medium verwendet werden.

Lösung	Herkunft
Einfach konzentriertes PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O 20 mM Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O 100 mM NaCl
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
DMEM 4,5 g Glucose/Liter	verdünnt mit 10% FCS, Lagerung bei 4°C

Tabelle 10: Bei der Passage der Zellen verwendete Substanzen

2.9.3 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren der Zellen wird eine konfluent gewachsene 75 cm² Zellkulturflasche wie unter Kapitel 2.9.2 beschrieben trypsinisiert. Nach Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 900 U/min für 5 min wird das Zellpellet in 90%iger FCS/10%iger DMSO-Lösung resuspendiert, wobei für eine 75 cm² Flasche 7,5 ml verwendet werden. Pro Kryovial werden ca. 1,5 ml Zellsuspension verwendet. Zunächst werden die Kryovial-Cups bei -80°C eingefroren, um ein langsames und zellschonendes Absinken der Temperatur zu gewährleisten. Nach ein bis zwei Wochen werden die Kryovial-Cups in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Zum Auftauen der Zellen werden die Kryovial-Cups aus den Gefrierschränken respektive den Stickstofftanks genommen und einige Minuten auf Eis gestellt, um die Zellen zu schonen. Anschließend werden auf die noch gefrorenen Zellen einige Tropfen des entsprechenden kalten Mediums gegeben, die Zellen vorsichtig resuspendiert und in insgesamt 15 ml Medium aufgenommen. Nun werden die Zellen 5 min bei 900 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet wird sodann in 5 ml Medium aufgenommen und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

2.9.4 Transfektion mit Poly-L-Ornithin

Grundsätzlich kann zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden werden. Während bei der stabilen Form das transfizierte Plasmid mittels Selektionsmarkern stabil in das Empfänger-genom integriert wird und somit eine ständige Expression dieser DNAs erfolgt, ist bei der transienten Vorgehensweise nur eine vorübergehende Proteinsynthese möglich.

Für die transiente Transfektion mittels Poly-L-Ornithin werden zunächst Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, sodass diese am Folgetag visuell kontrolliert eine Konfluenz zwischen 60 und 70% erreichen. Bei erreichter Zelldichte wird das Medium durch eine Lösung bestehend aus 3 ml Medium, 3 µl Poly-L-Ornithin und 8 µg Plasmid-DNA ersetzt. Anschließend werden die Zellen für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und die Transfektionslösung abgesaugt. Nun wird eine 30%ige DMSO-70%ige Medium-Lösung für 210 s auf die Zellen gegeben, abgesaugt und zweimalig mit PBS gewaschen, bevor die Zellen erneut mit entsprechendem Medium versorgt werden. Weitere 24 h später werden die transfizierten Zellen auf Deckgläschen ausgesät, sodass sie am Folgetag konfluent sind (Methode nach Dong et al., 1993). Soll das transfizierte Plasmid stabil in das Empfänger-genom integriert werden, so werden 0,8 µg des Selektionsplasmids pWE3 hinzugefügt, welches eine Puromycinresistenz vermittelt. Anstatt die Zellen nun jedoch auf Deckgläschen auszusäen, werden diese in 10 cm große Zellkulturschalen verbracht und nach 48 h mit der Selektion über Puromycin begonnen, welches im Medium eine Endkonzentration von 1 µg/ml besitzt. Hierbei wird das Medium täglich gewechselt. Sobald einzelne Zellkolonien zu erkennen sind, werden diese mittels einer Pipettenspitze von der Unterlage abgekratzt, aufgesaugt und in eine 24-Loch-Platte verbracht. Nun erfolgt die weitere Kultivierung in puromycinhaltigem Medium.

Wird Zelllysate für einen Western-Blot (siehe Kapitel 2.11.3) benötigt, so werden die Zellen nach zwei Tagen lysiert, um eine maximale Proteinmenge gewinnen zu können. Sollen jedoch primäre Zilien untersucht werden, wird mit der Fixierung und Immunocytochemie drei bis vier Tage gewartet. Tabelle 11 gibt einen Überblick über die bei der transienten Transfektion mit Poly-L-Ornithin verwendeten Lösungen.

Lösung	Herkunft und Verwendung
Poly-L-Ornithin-Lösung	10 mg/ml in Aqua bidest.; sterilfiltriert
DMEM-Medium mit Zusätzen	Siehe Kapitel 2.9.1
Einfaches PBS	Siehe Kapitel 2.9.2
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Tabelle 11: Lösungen zur transienten Transfektion mittels Poly-L-Ornithin

2.9.5 Transfektion mit Polyethylenimin

Für die transiente Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI) werden zunächst Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, sodass diese am Folgetag visuell kontrolliert eine Konfluenz zwischen 60 und 70% erreichen. Nun werden 170 µl DMEM mit 7,5 µg Plasmid-DNA und 30 µl PEI für 10 s auf dem Vortexschüttler gut durchmischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wird das Medium von den Zellen abgesaugt, durch die DMEM/DNA/PEI-Lösung ersetzt und 20 min auf den Zellen belassen. Anschließend wird das Medium abgesaugt und durch DMEM/10%FCS ersetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C werden die Zellen in 6-Loch-Platten mit 22 mm große Deckgläsern überführt, sodass diese am Folgetag konfluent gewachsen sind. Sollen die Zellen später einer Immuncytochemie zur Untersuchung primärer Zilien unterzogen werden, so erfolgt die Fixierung mittels 4%iger PFA-Lösung nach drei bis vier Tagen, um eine möglichst hohe Differenzierungsrate und somit Ziliendichte zu garantieren.

2.9.6 Zelllyse zur Proteingewinnung

Für Western-Blot Analysen ist Zelllysat aus einer 70-100% konfluent gewachsenen, 6 cm großen Zellkulturschale ausreichend. Hierfür werden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem hierfür

geeigneten Zellschaber abgekratzt und aufgenommen. Nun erfolgt die Zentrifugation bei 1.500 g für 5 min bei Raumtemperatur. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet in 50 µl 1% TritonX-100-PBS-Lösung resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 16.000 g für 5 min und 4°C wird der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und entweder weiteren Analysemethoden zugeführt oder bei -80°C eingefroren.

2.9.7 Immuncytochemie

Zunächst werden die konfluent auf Deckgläschen gewachsenen Zellen für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur mittels der 4%igen PFA-Lösung fixiert und anschließend dreimalig mit PBS gewaschen. Erfolgt die Färbung am nächsten Tag, so werden die Zellen bei 4°C in PBS gelagert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran werden die Zellen für 45 Minuten bei Raumtemperatur in der TritonX-100-BSA-Lösung inkubiert. Danach erfolgt ein Waschschriff mit PBS und die Inkubation mit dem Primärantikörper für zwei Stunden. Dieser wird entsprechend den herstellerepezifischen Angaben in BSA-PBS-Lösung verdünnt. Doppelfärbungen werden zeitgleich ausgeführt. Nach einfachem Waschen in Hochsalz-PBS-Lösung und dreifachem Waschen in PBS wird mit dem ebenfalls in BSA-PBS-Lösung verdünnten Sekundärantikörper für eine Stunde inkubiert. Auch hier erfolgen Doppelfärbungen zeitgleich. Anschließend folgt dreifaches Waschen in PBS. Wird eine DAPI-Kernfärbung durchgeführt, so wird das Bis-Benzimid aus der Stammlösung mittels Aqua bidest. auf 1:500 verdünnt, mit dieser Lösung werden die Deckgläschen für eine Minute im Dunkeln inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS erfolgt das Eindeckeln in Glycerin-PBS-Lösung, wobei die Deckgläschen mit ihrer Unterseite auf einen mit einem Tropfen der Glycerin-PBS-Lösung benetzten Objektträger gelegt und mit 200 µl der Lösung überschichtet wurden. Dann erfolgte das luftblasenfreie Auflegen eines Deckglases auf den Objektträger. Diese werden in dafür vorgesehenen Mappen bei 4°C gelagert.

Im Rahmen der Immuncytochemie werden die im Kapitel 2.4 beschriebenen Primär- und Sekundärantikörper verwendet. Tabelle 12 zeigt die für die Immuncytochemie verwendeten Puffer und Lösungen.

Name der Lösung	Zusammensetzung
Einfach konzentriertes (1x) PBS	80 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 20 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 100 mM NaCl
Hochsalz-PBS	1x PBS 350 mM NaCl
BSA-PBS	1x PBS 2% BSA
TritonX-100-PBS	1x PBS 2% BSA 0,25% TritonX-100
Hoechst	25 mg Hoechst 33258 ad 5 ml Aqua bidest.
Glycerin-PBS	1x PBS 40% Glycerin
PFA	4 g Paraformaldehyd in 100 ml 1x PBS

Tabelle 12: Herstellung und Konzentration der zur Immuncytochemie verwendeten Substanzen.

2.9.8 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Zur Übersichtsfärbung der Nierentubulusepithelzellen dienen als Farbstoffe Eosin G, ein saurer Xanthenfarbstoff, der acidophile Strukturen (z.B. Zellplasma-proteine) rot färbt, und Hämatoxylin, ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, der basophile Zellbestandteile (z.B. DNA, rER) blau färbt.

Die auf Deckgläschen konfluent gewachsenen Nierentubulusepithelzellen (in diesem Fall LLC-PK₁-Zellen) werden nach Fixation mittels 4%iger Paraformaldehydlösung dreifach mit PBS gewaschen und für 3 min in Mayers Hämalaun gelegt. Nach gründlichem Abspülen mit fließendem Leitungswasser erfolgt die einminütige Färbung mit Eosin G 0,5%, welches ebenso unter fließendem Leitungswasser abgespült wird. Anschließend erfolgt das Eintauchen in aufsteigende Alkoholbäder (70%ig für 3 s; 80%ig für 3 s; 96%ig für 60 s; zweifach

100%ig für 120 s) und ein zweimaliges Abschlussbad in Xylol für je 3 min. Die fertigen Färbungen werden eingedeckelt und in entsprechenden Mappen bis zur Mikroskopie gelagert.

2.10 Arbeiten mit DNA

2.10.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* („kleiner Maßstab“)

Für die Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken werden 5 ml LB-Medium mit Bakterien aus Glyzerin-Kulturen oder aus Plattenkolonien angeimpft und über Nacht bei 37°C und 250 U/min inkubiert. Anschließend wird die Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 13.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 200 µl Puffer A und 5 µl RNase A resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer B wird die Probe durch Invertieren gemischt und exakt 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 300 µl Puffer C zugegeben und nach erneutem Invertieren die Probe für 10 min auf Eis gestellt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 15.000 g und 4°C wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit 500 µl eiskaltem Isopropanol gemischt und bei -20°C für 20 min inkubiert. Erneut wird die Probe bei 15.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wird das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet 45 min bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wird es in 50 µl 5mM Tris pH 8,0 gelöst. Tabelle 13 zeigt die Zusammensetzung der angewendeten Pufferlösungen.

Pufferlösung	Zusammensetzung
A	50 mM Glukose 10 mM EDTA pH8,0 25 mM Tris/HCl pH8,0 Die Pufferlösung A wurde vor Anwendung sterilfiltriert.
B	200 mM NaOH 1% SDS
C	3M KAcetat Die Pufferlösung C wurde vor Anwendung autoklaviert.

Tabelle 13: Zusammensetzung der Pufferlösungen zur analytischen Plasmidpräparation

2.10.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* („mittlerer Maßstab“)

Die Präparation von Plasmid-DNA zur Gewinnung größerer Mengen DNA aus *Escherichia coli* erfolgt mittels des Plasmid Plus Midi Kits von Qiagen nach der beiliegenden Anleitung. Hierfür werden Bakterien aus Glyzerin-Kulturen oder aus Plattenkolonien über Nacht bei 37°C und 250 U/min in 50 ml des entsprechenden Mediums kultiviert.

2.10.3 Konzentrationsbestimmung von DNA im Spektrophotometer

Zur photometrischen DNA-Konzentrationsbestimmung wird die zu untersuchende DNA-Lösung mit Aqua bidest. 1:20 verdünnt und in eine schwarze Quarzküvette überführt. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Küvette frei von Luftblasen ist und sich im Strahlengang keine Verunreinigungen befinden. Anschließend wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Als Leerwert dient Aqua bidest. Eine Absorption von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger DNA (Methode nach Chargaff, 1955).

2.10.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA wird der Lösung die gleiche Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [50% (v/v) Phenol/50% (v/v) Chloroform/1% Isoamylalkohol] zugegeben und gemischt. Bei DNA-Molekülen kleiner 10 kbp erfolgt dies auf dem Vortexschüttler, bei DNA-Moleküle zwischen 10 kbp und 30 kbp durch leichtes Schütteln per Hand, und bei DNA-Molekülen größer 30 kbp auf dem Drehrad. Nun erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 g und Raumtemperatur für 1 min. Die wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Zentrifugation wird mit der gleichen Menge Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wiederholt, falls keine saubere Schichttrennung erfolgt ist. Anschließend wird der Zentrifugationsschritt mit der identischen Menge Chloroform wiederholt und die DNA aus der wässrigen Phase mit zweifacher Menge Ethanol gefällt (vgl. 2.10.5).

2.10.5 DNA-Fällung

Nach Vermessung des zu fällenden Volumens mit der Pipette wird der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und die dreifache Menge Ethanol zugesetzt, diese für 15 min bei -20°C inkubiert und bei 4°C und 15.000 g für 15 min zentrifugiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 70% Ethanol und 2 min Zentrifugation wird das Pellet getrocknet und in Aqua bidest. aufgenommen.

2.10.6 Gelelektrophorese mit Agarose-Gelen

Die Gelelektrophorese mit Agarose-Gelen dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten. Eine Abschätzung der DNA-Konzentration in der Probe ist im Vergleich zu einem aufgetragenen Marker möglich. Je nach Fragestellung kommen Gele mit Agarosekonzentrationen von 0,8 - 2,0% (w/v) zum Einsatz. Hierbei wird die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst, nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt und durchmischt. Anschlie-

ßend wird die Gellösung in die Gelkammer gegossen und das Gel bei Raumtemperatur bis zur Aushärtung abgekühlt. Zur Durchführung der Elektrophorese wird die benötigte Menge TAE-Puffer in die Kammer eingegossen und die Gele beladen. Je nach Gelkammertyp werden herstellerspezifisch 130 V bzw. 150 V Spannung angelegt. Nach erfolgter Auftrennung werden die mittels Ethidiumbromid angefärbten DNA-Fragmente unter einem UV-Leuchtschirm sichtbar gemacht und fotografiert. Zur Bestimmung von Größe und Konzentration wird ein geeigneter Marker verwendet. Die DNA-Fragmente können mittels Skalpell ausgeschnitten und zur weiteren Verwendung der Elution unterzogen werden. Tabelle 14 zeigt die Zusammensetzung der hierfür verwendeten Lösungen.

Lösung	Zusammensetzung
50x TAE	2 M Tris; 0,1 mM EDTA pH 8,0
1x TAE	1:50 Verdünnung aus 50x TAE
Ethidiumbromid	1 mg/ml in A. bidest.
Molekulargewichtsstandard	2-log DNA ladder von NEB

Tabelle 14: Zusammensetzung der Lösungen zur Gelelektrophorese von Agarosegelen

2.10.7 Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose-Gelen erfolgt mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Ex-traktion-Kit von Omega nach den herstellerspezifischen Angaben der beiliegen-den Anleitung.

2.10.8 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur enzymatischen Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen werden pro µg DNA mindestens 2 U Enzym verwendet und mit den jeweiligen Puffern und Reaktionszusätzen mittels A. bidest auf das gewünschte Reaktionsvolumen

verdünnt. Hierbei werden standardmäßig 20 µl Endvolumen gewählt. Die Verdaureaktion erfolgt gemäß den herstellerspezifischen Temperaturangaben für 90 min bei analytischen Verdaureaktionen respektive 180 min bei präparativen Verdaureaktionen. Sind die Reaktionsansätze zweier Enzyme miteinander vereinbar, so wird der sog. „Doppelverdau“ zeitgleich ausgeführt. Ist dies nicht der Fall, erfolgen die Verdaureaktionen hintereinander.

2.10.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Abschnitten zur späteren Klonierung erfolgt im Rahmen dieser Arbeit stets mit Hilfe der Phusion-Polymerase von NEB, wobei die jeweiligen Annealing-Temperaturen primerspezifisch gewählt werden. Tabelle 15 zeigt die für die PCR benötigten Lösungen.

Lösung	Volumen
Template-DNA	5 ng je 50 µl Ansatz
0,5 µM Forward Primer	1 µl
0,5 µM Reverse Primer	1 µl
12,5 mM dNTPs	1 µl
5x Phusion HF-Puffer	10 µl
Phusion-Polymerase 2 U/µl	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Tabelle 15: Zur PCR verwendete Lösungen

I.	Vordenaturierung	30 s bei 98°C
II.	Denaturierung Annealing (primerspezifisch) Elongation (templatespezifisch)	15 s bei 98°C 10 s bei 71°C 20 s bei 72°C
III.	Abschluss	7 min bei 72°C
IV.	Kühlung	∞ bei 4°C

Tabelle 16: Schema zur Durchführung einer PCR

Beim Zusammenführen der einzelnen Komponenten wird auf stetige Kühlung auf Eis geachtet, die Polymerase selbst wird als letztes hinzugefügt. Die Reaktion selbst erfolgt nach in Tabelle 16 dargestelltem Schema.

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wird der Reaktionsansatz einer Agarose-Gelelektrophorese unterzogen. Bei entsprechender Bandengröße und Bandenintensität erfolgt die Gelextraktion (vgl. 2.10.07). Das gereinigte PCR-Produkt wird in einen mit *EcoRV* verdauten pJOE-Vektor kloniert, mittels elektrischer Transformation in *E. coli* eingebracht und auf LB-Amp-Agarplatten respektive LB-Amp/X-gal/IPTG-Agarplatten ausgebracht. Positive Klone werden weiter kultiviert, deren Plasmid-DNA extrahiert und durch geeignete Restriktionsverdauereaktionen auf Richtigkeit überprüft. Anschließend folgt die Sequenzierung im Auftragslabor. Hierzu werden die im Plasmid bindenden Oligonukleotide T7 und Sp6 verwendet.

2.10.10 Dephosphorylierung von DNA mittels alkalischer Phosphatase

Um eine Religation von präparativ verdauter Vektor-DNA zu verhindern, kann diese mit dem Enzym Antarctic Phosphatase dephosphoryliert werden. Hierzu wird im Anschluss an den letzten Restriktionsverdau 1 µl Antarctic Phosphatase zu 1-5 µg DNA gegeben, wobei auf die Kompatibilität der Puffer geachtet werden muss. Nach 15 min Inkubation bei 37°C erfolgt die Inaktivierung des Enzyms bei 70°C für 5 min. Im Anschluss wird die DNA mittels einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt.

2.10.11 Ligation

Die Ligationsreaktion wird in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Zur Ligation von Fragmenten mit überhängenden Enden sollte das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-Menge ca. 1:5 betragen. Die DNA-Fragmente werden hierzu in entsprechenden Mengenverhältnissen zusammengefasst und mit 1 µl T4-

Ligase und 2 µl T4-Ligasepuffer in einem Endvolumen von 10 µl vermischt. Die Ligationsreaktion wird über Nacht im Kühlraum in einem auf 15-17°C temperierten Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgt die elektrische Transformation der DNA in *E. coli*.

2.10.12 Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse wird als Auftragssequenzierung über die Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Die hierfür benötigten Oligonukleotide und Plasmide werden nach Angaben der Firma Seqlab in geeigneten Volumina zusammengefasst.

2.11 Arbeiten mit Proteinen

2.11.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die kolorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976) beruht auf der Interaktion von Coomassie BrilliantBlue G250 mit hydrophoben, nicht-polaren und kationischen Seitenketten von Proteinen, insbesondere mit der Aminosäure Arginin (Bradford, 1976). Die hierfür verwendeten Lösungen und Puffer werden in Tabelle 17 aufgeführt.

Lösung	Konzentration
BSA-Eichlösungen	0; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,5 µg/µl
RotiQuant	1:5 Verdünnung
Aqua bidest.	autoklaviert

Tabelle 17: Lösungen zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford et al. (1976)

Zur Erstellung der Eichkurve werden je 10 µl der BSA-Eichlösungen mit je 1 ml der verdünnten RotiQuant-Lösung vereint und gut durchmischt. Ebenso wird mit den zu vermessenden Proteinproben verfahren. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden alle Proben bei 450 nm und 590 nm am Spektralphotometer vermessen, wobei gegen Aqua bidest. geeicht wird. Nach Bildung des Quotienten aus beiden Messwerten einer Probe (A_{590}/A_{450}) wird die Messkurve erstellt. Dabei wird der bei der BSA-freien Probe ermittelte Quotient von den anderen Werten subtrahiert (korrigierter Quotient). Nach Division der Proteinmengen der BSA-Eichlösungen durch den korrigierten Quotienten erfolgt die Bildung des Mittelwertes. Um die Konzentrationen der vermessenen Proben in µg/µl zu erhalten, werden deren korrigierte Quotienten mit dem Mittelwert der BSA-Standardkurve multipliziert und anschließend durch das Probenvolumen dividiert.

2.11.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die SDS-Page dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem spezifischen Molekulargewicht. Im Rahmen dieser Arbeit werden SDS-Polyacrylamid-Gele mit Konzentrationen von 6-12% verwendet. Tabelle 18 zeigt die bei der SDS-Page verwendeten Substanzen, Tabelle 19 die für jeweils 10 ml Gelvolumen benötigte Zusammensetzung der Trenngele und des Sammelgels.

Substanz	Zusammensetzung
Acrylamid - Bisacrylamid-Lösung	30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid (w/w) Firma Serva
4x Lower Tris	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% SDS
4x Upper Tris	0,625 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% SDS
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin Firma Serva
APS	10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H ₂ O
5x SDS-Probenpuffer	625 mM Tris pH 6,8 50% Glyzerin 12,5% SDS 0,05% (w/v) Bromphenolblau 12,5% β -Mercaptoethanol
10x Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glycin 1% SDS
Molekulargewichtsstandard	175 kDa MBP- β -Galaktosidase 83 kDa MBP-Paramyosin 62 kDa Glutamat-Dehydrogenase 47,5 kDa Aldolase 32,5 kDa Triosephosphat-Isomerase 25 kDa β -Lactoglobulin A 16,5 kDa Lysozym 6,5 kDa Aprotinin

Tabelle 18: Lösungen zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Gele

Je 10 ml Gelvolumen	6%	8%	10%	12%	Je 3 ml Sammelgel
Aqua bidest.	5,3 ml	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	1,3 ml
Acrylamid-Lösung	2,0 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	0,5 ml
1,5 M Tris (pH8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,625% Tris (pH 6,8)	-	-	-	-	0,6 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	-
0,5% SDS	-	-	-	-	0,6 ml
APS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	15 µl
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	3 µl

Tabelle 19: Zusammensetzung der Trenngele verschiedener Konzentrationen und des Sammelgels zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Beim Gießen des Gels wird auf saubere und entfettete Glasplatten, Spacer und Probenkämme geachtet. Die Trenngellösung wird luftblasenfrei in die Vorrichtung gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 60 Minuten Polymerisation wird das Isopropanol abgenommen, das Sammelgel ebenso luftblasenfrei überschichtet und abschließend der Kamm eingesteckt. Weitere 60 Minuten später ist das Gel gebrauchsfertig und kann bei 4°C bis zu einer Woche feucht gelagert werden. Vor Auftragen der Proben auf das Gel werden diese mittels des 5x-SDS-Probenpuffers auf eine Endkonzentration von 1xSDS gebracht und für 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Als Marker wird der Prestained Protein Marker Broad Range von NEB verwendet, wobei für den größeren Geltyp jeweils 15 µl und für den kleineren Geltyp jeweils 8 µl eingesetzt werden. Die Elektrophorese für den Geltyp der Größe 14 cm x 12 cm x 1,5 mm erfolgte bei 450 V und 10°C. Für den kleinen Geltyp (8 cm x 4 cm x 1 mm) wurden 120 V und Raumtemperatur gewählt. Als Laufpuffer diente der 1:10 verdünnte 10x Laufpuffer. Die Abschätzung der Proteingrößen erfolgte über den Abgleich mit dem aufgetragenen Marker.

2.11.3 Immunodetektion von Proteinen mittels Western-Blot

Beim Western-Blot erfolgt der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran.

Vor Zusammenbau der Transfereinheit wird die PVDF-Membran für 60 Sekunden in Methanol benetzt und das Whatman-Papier in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau erfolgt nun von der Anode in Richtung Kathode in folgender Weise: Schaumstoffpolster, drei Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, Trenngel, drei Lagen Whatman-Papier, Schaumstoffpolster. Eventuell entstandene Luftblasen zwischen Gel und Membran werden mittels eines Glasstabes entfernt. Anschließend erfolgt der Einbau in die mit Transferpuffer gefüllte Vorrichtung. Der Transfer der Proteine auf die Membran selbst erfolgt bei 1 A und 10°C unter ständiger Umwälzung des Transferpuffers mittels Rührfisch. Die Membran wird nach erfolgreichem Transfer über Nacht bei 4°C in Blocking-Puffer aufbewahrt und anschließend dreifach für jeweils 10 min in PBS-Tween (0,5%) unter leichtem Schütteln inkubiert. Unterdessen wird der primäre Antikörper mit Blocking-Puffer 1:1.000 verdünnt und für 120 min bei Raumtemperatur im Schüttler mit der Membran inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit PBS-Tween (0,5%) erfolgt die Inkubation mit dem 1:15.000 in Blocking-Puffer verdünnten sekundären Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur. Abschließend erfolgt ein dreifacher Waschschrift mit PBS-Tween (0,5%). Zur Detektion wird das ECL Western Blotting Analysis System verwendet. Dazu wird nach Anleitung des Herstellers zu gleichen Teilen Lösung 1 mit Lösung 2 vermischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 60 s wird die Lösung abgekippt und die Lumineszenz dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation

Bisher wurde die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation mit dem Venus-System (Ohashi et al., 2012) weder an den zur Verfügung stehenden LLC-PK₁-Zellen erprobt noch wurde diese im Labor des Lehrstuhls für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg verwendet. Daher war zunächst die Überprüfung der Funktionalität des Systems und die Ermittlung geeigneter Parameter zur Transfektion der Ausgangsplasmide h- β -actin/VC210 und VN210/cofilin-wt in die verwendete Zelllinie (LLC-PK₁) nötig. Hierzu wurden beide Plasmide gleichzeitig jeweils mit Polyethylenimin und Poly-L-Ornithin transfiziert. Für die transiente Transfektion mittels Polyethylenimin wurden zunächst Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, so dass diese am Folgetag, visuell kontrolliert, eine Konfluenz zwischen 60 und 70% erreichten. Anschließend wurden 170 μ l DMEM mit 7,5 μ g Plasmid-DNA und 30 μ l PEI für 10 s auf dem Vortexschüttler gut durchmischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, durch die DMEM/DNA/PEI-Lösung ersetzt, 20 min auf den Zellen belassen, anschließend abgesaugt und durch DMEM/10% FCS ersetzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in 6-Loch-Platten mit 22 mm Deckgläser überführt, sodass diese am Folgetag konfluent gewachsen waren.

Für die transiente Transfektion mittels Poly-L-Ornithin wurden zunächst Zellen in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät, sodass diese am Folgetag visuell kontrolliert eine Konfluenz zwischen 60 und 70% erreichten. Bei erreichter Zelldichte wurde das Medium durch eine Lösung bestehend aus 3 ml Medium, 3 μ l Poly-L-Ornithin und 8 μ g Plasmid-DNA ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und die Transfektionslösung abgesaugt. Nun wurde eine 30%ige DMSO-70%ige Medium-Lösung für 210 s auf die Zellen gegeben, abgesaugt und zweimalig mit PBS gewaschen, bevor die Zellen erneut mit entsprechendem Medium versorgt wurden. Weitere 24 h später wurden die transfizierten Zellen auf Deckgläschen ausgesät, so dass sie am Folgetag konfluent gewachsen waren.

Nach 72 h Expression wurden die Zellen mittels PFA fixiert und der entsprechenden Immuncytochemie unterzogen. Sollte nur jeweils ein Plasmid expriert werden, wurde mit der Expressionsdauer in beiden Systemen auf 48 h zurückgegangen. Unter diesen Bedingungen ließ sich in beiden Systemen mikroskopisch eine vergleichbare Komplementation mit entsprechend ähnlicher Transfektionseffizienz beobachten. Während der Hauptversuche wurde auf den Polyethylenimin-Ansatz zurückgegriffen, da bei diesem eine geringere Menge an DNA benötigt wird.

Dargestellt ist die starke Komplementation beider Venusfragmente (Abbildung 5) durch transiente Transfektion von LLC-PK₁-Zellen mit PEI und den Plasmiden h- β -actin/VC210 und VN210/cofilin-wt nach 72 Stunden Expression. Als Kontrolle wurden LLC-PK₁-Zellen nur mit VN210/cofilin-wt transfiziert, da hierfür ein geeigneter Anti-GFP-Antikörper zur Verfügung steht, welcher das Venus-Fragment VN210 aufgrund hoher AS-Identität erkennt, nicht aber das Fragment VC210. Eine Immuncytochemie mit einem gegen h- β -actin/VC210 gerichteten Primärantikörper war nicht möglich, da das vorhandene Plasmid keine Sequenz für eine entsprechende Epitopmarkierung aufwies. Eine Färbung mittels Anti-Aktin-Primärantikörper war aufgrund des intrazellulär ubiquitär vorkommenden Aktins ebenfalls nicht zielführend. Bei alleiniger Expression von VN210/cofilin-wt konnte im entsprechenden Kanal kein Signal beobachtet werden (Abbildung 6).

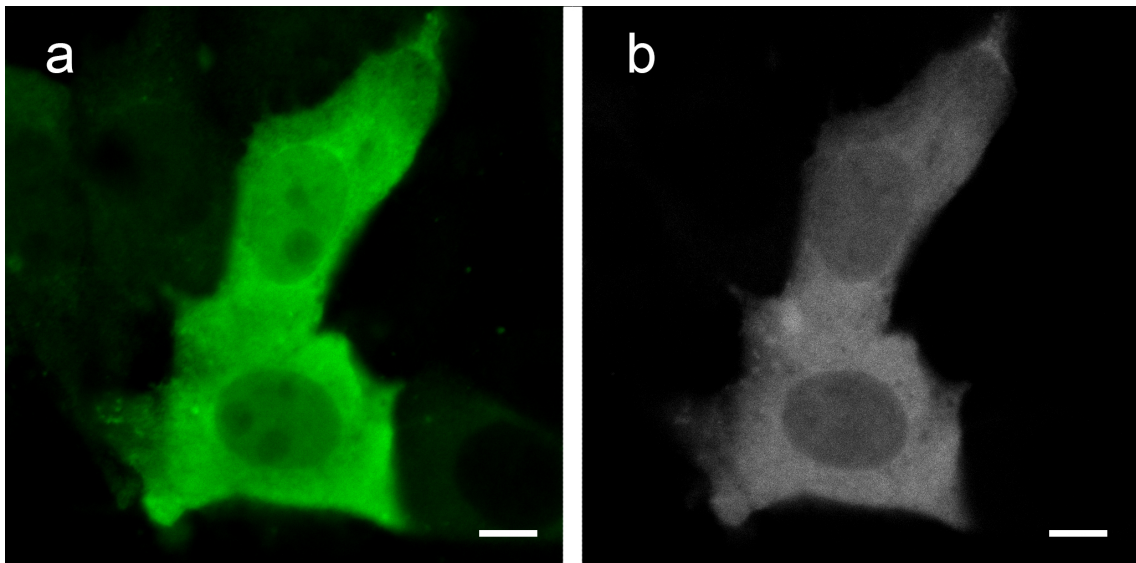


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopie von mit h-β-actin/VC210 und VN210/cofilin-wt transient transfizierten LLC-PK₁-Zellen. Immuncytochemie (a) und Fluoreszenzkomplementation (b). Mit h-β-actin/VC210 und VN210/cofilin-wt transient transfizierte LLC-PK₁-Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit PFA fixiert. (a) Gegen das GFP-Epitop von VN210/cofilin-wt gerichteter Primärantikörper sowie Alexa 488-gekoppelter anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper, (b) Venus-Fluoreszenzkomplementation bei Co-Expression der beiden Plasmide, dargestellt bei 545 nm Wellenlänge. Maßstabsbalken = 5 µm.

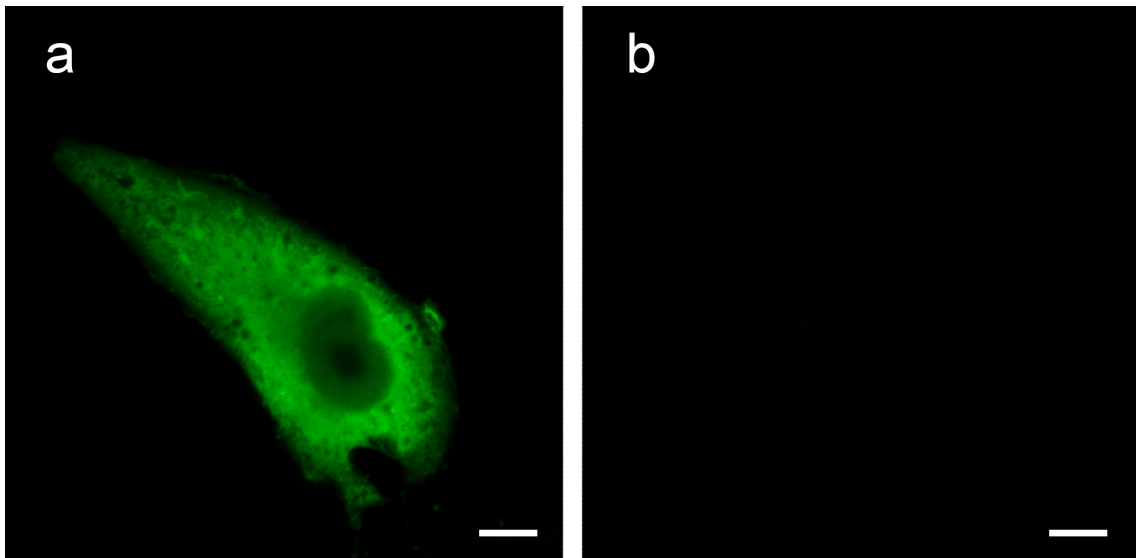


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie von mit VN210/cofilin-wt transient transfizierten LLC-PK₁-Zellen. Immuncytochemie (a) und Fluoreszenzkomplementation (b). Mit VN210/cofilin-wt transient transfizierte LLC-PK₁-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion mit PFA fixiert. (a) Nachweis der Expression von VN210/cofilin-wt mittels Anti-GFP-Primärantikörper sowie Alexa 488-gekoppelter anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. Eine Venus-Fluoreszenzkomplementation bei 545 nm ist bei alleiniger Expression von VN210/cofilin-wt nicht detektierbar (b). Maßstabsbalken = 5 µm.

3.2 Klonierung der Plasmide

Nach erfolgreicher Etablierung des Systems in der verwendeten LLC-PK₁-Zelllinie wurde mit der Klonierung der Plasmide zur Untersuchung der Lokalisation der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 begonnen, da der Nachweis der Interaktion *in vivo* als ein wesentliches Ziel dieser Arbeit formuliert wurde.

Zur Klonierung eigener Konstrukte standen die unter 2.5.1 genannten Plasmide zur Verfügung. Um nun die Interaktion der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation untersuchen zu können, war es entscheidend, dass beide Fragmente des fluoreszierenden Proteins im gleichen Zellkompartiment zu liegen kommen. Da Polycystin-2 intrazelluläre N- und C-Termini besitzt, musste das Expressionskonstrukt von Polycystin-1 mit C-terminal gelegentlichem Venusfragment versehen werden, damit diese Voraussetzung erfüllt werden konnte. Um die methodenseitig notwendige enge räumliche Nähe der Venusfragmente sicherzustellen, wurde das zweite Fragment bei Polycystin-2 C-terminal angefügt, da hier die postulierte Interaktionsstelle mit Polycystin-1 in Form der coiled-coil-Domäne liegen soll (Cai et al., 1999).

Die verwendeten Venusfragmente VN210 (AS 1-210) und VC210 (AS 210-238) besitzen deutlich unterschiedliche Proteingrößen (210 AS vs. 28 AS). Dies war insofern von Vorteil, da zu große Proteinfragmente, wie sie beispielsweise bei der Untersuchung der Interaktion mittels des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) nötig gewesen wären, das Trafficking von Polycystin-2 ins Zilium stören können (Pers. Mitteilung Dr. K. Babinger). Um die Einflüsse der Fragmente auf das Trafficking so gering wie möglich zu halten, wurde daher das kleinere der beiden Venusfragmente (VC210) an das C-terminale Ende von Polycystin-2 angefügt. Als Negativkontrolle wurde das vorhandene Konstrukt VN210/cofilinwt verwendet, da Cofilin bei Überexpression ubiquitär in der Zelle zu finden ist und eine mögliche räumliche Nähe zu Polycystin-2 wahrscheinlich zu sein scheint. Bisher wurden keine Interaktionen der beiden Proteine beschrieben. Darüber hinaus wurde eine zweite Negativkontrolle mit Cystin als sinnvoll erachtet, da dieses ebenso wie Polycystin-2 im primären Zilium lokalisiert werden konnte (Yoder et al., 2002), jedoch nicht mit Polycystin-2 interagiert.

3.2.1 Plasmid pVC210/PKD2,HA

Als Ausgangsplasmide dienten h- β -actin/VC210 und pcDNA3/PKD2,HA (Institutsbestand). Zunächst wurde die PKD2,HA-Sequenz durch PCR mit Hilfe entsprechender Primer (pkd2 HA_XbaI und NheI_pkd2; vgl. 2.5.3) mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *NheI* und *XbaI* versehen und amplifiziert. Anschließend fand die Klonierung in einen linearisierten pJOE-Vektor statt. Erfolgte die Ligation des pJOE-Vektors hierbei ohne Insert, wird die Replikation des Plasmids durch die Ausbildung eines Hairpins verhindert. Hierdurch erzielt man potentiell mehr Klone mit der Gewissheit einer gelungenen Insertion, welche nun einem entsprechenden Restriktionsverdau oder einer Sequenzierung unterzogen werden können.

Die für h- β -actin codierende Sequenz wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *XbaI* ausgeschnitten und durch die PKD2-Sequenz ersetzt, sodass die für VC210 kodierende Sequenz 3' von PKD2 und dem Hämagglutinin-Tag zu liegen kam (Abbildung 7).

Created with SnapGene®

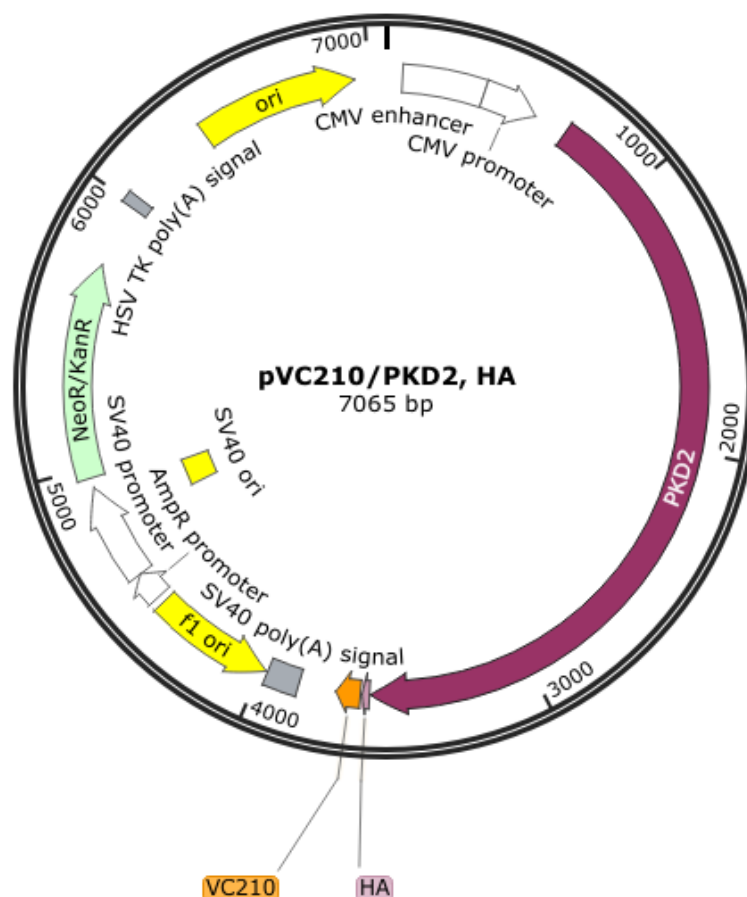


Abbildung 7: Genkarte des pVC210/PKD2,HA Plasmids.

3.2.2 Plasmid pUC-Trans/mPkd1,VN210

Zur Klonierung des Plasmids pUC-Trans/mPkd1,VN210 wurden die Ausgangs-plasmide pUC-Trans/mPkd1,HA und pVN210-N1 verwendet. Zunächst wurde mittels PCR (Primer VN210uni *Mlu*I und VN210 rev *Pme*I, vgl. 2.5.3) die für VN210 kodierende Sequenz mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Mlu*I und *Pme*I versehen und amplifiziert, um anschließend in den pJOE-Vektor eingefügt zu werden. Es wurden beide Plasmide mit *Mlu*I und *Pme*I zweizeitig verdaut. Bei der Ligation dient die für VN210 codierende Sequenz als Insert und wurde 3' der PKD1-Sequenz in pUC-Trans/Pkd1,HA eingefügt.

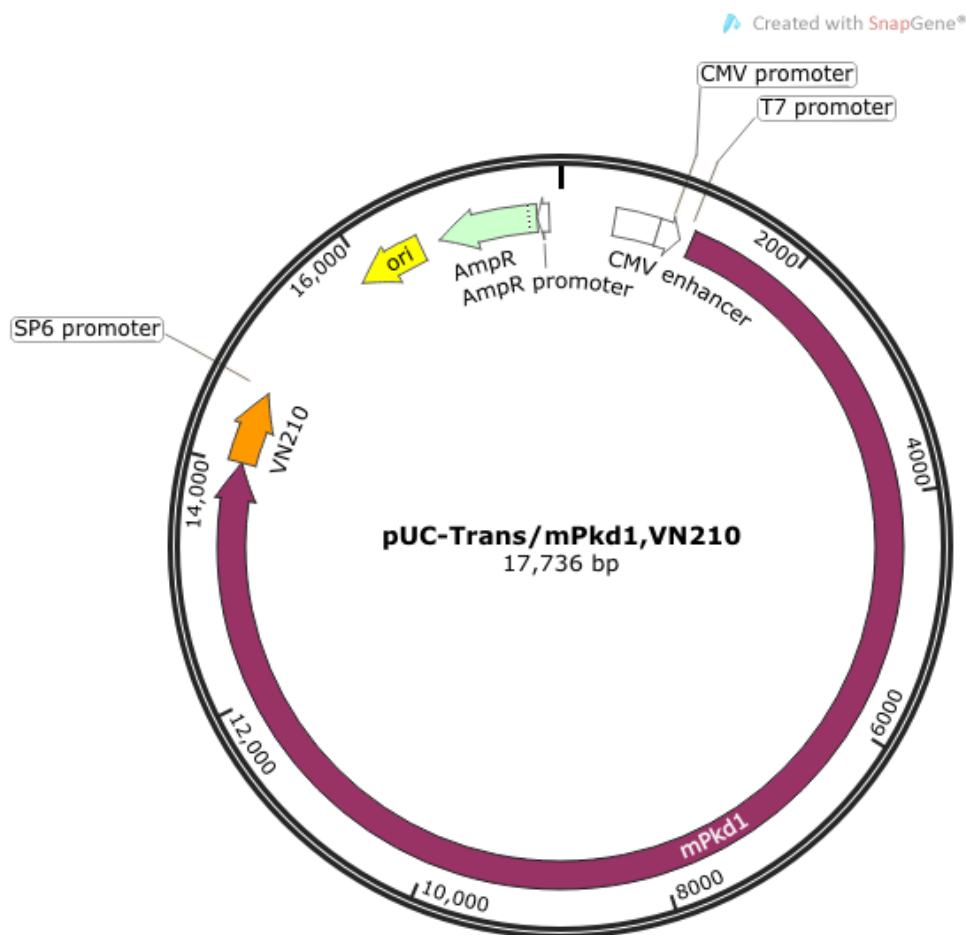


Abbildung 8: Genkarte des pUC-Trans/mPkd1,VN210 Plasmids

3.2.3 Plasmid pVN210-N1/Cystin

Als Ausgangsvektoren dienten pVN210-N1 (Hergestellt von Dr. Babinger) und pUHD-Cystin. Analog der Klonierung des Plasmids pVC210/PKD2,HA wurde mittels PCR [Cystin (*Xho*I) uni und Cystin (*Age*I) rev, vgl. 2.5.3] die für Cystin kodierende Sequenz mit Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Age*I versehen, amplifiziert und in den linearisierten pJOE-Vektor eingefügt. Anschließend wurden die Vektoren pJOE/Cystin und pVN210-N1 mit den Restriktionsendonukleasen *Xho*I und *Age*I verdaut und die für Cystin kodierende Sequenz als Insert 5' der für VN210 kodierenden Sequenz in pVN210-N1 eingefügt.

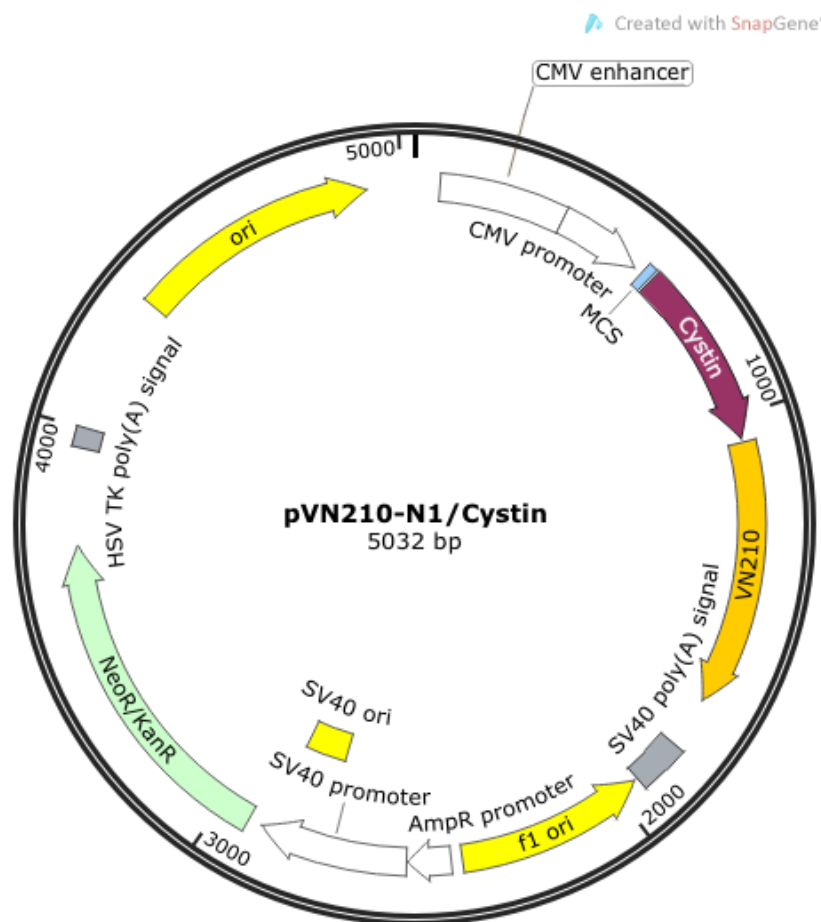


Abbildung 9: Genkarte des pVN210-N1/Cystin Plasmids.

3.3 Generierung einer stabilen LLC-PK₁-Zelllinie

Um die Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 *in vivo* mittels der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation darzustellen, war es nötig, die beiden Plasmide pUC-Trans/mPkd1,VN210 und pVC210/PKD2,HA zeitgleich in derselben Zelle zu exprimieren. Der Versuch, beide Plasmide in einem Ansatz zeitgleich mittels transienter Transfektion in den LLC-PK₁-Zellen zu exprimieren, führte in nicht gezeigten Versuchsansätzen zu einer geringen Anzahl an doppelt transfizierten Zellen. Hierbei stellte sich besonders das Auffinden der entsprechenden Zellen als schwierig heraus, da in der Großzahl der Fälle nur jeweils eines der beiden Proteine von den Zellen synthetisiert wurde. Darüber hinaus war als weiteres Kriterium für den Nachweis der Interaktion im primären Zilium die Ausbildung dieses Zellkompartiments entscheidend. Da jedoch nicht alle Zellen zum Zeitpunkt der Fixierung die Ausbildung von Zilien zeigten, verringerte sich die Anzahl jener Zellen, welche sowohl die beiden Plasmide pUC-Trans/mPkd1,VN210 und pVC210/PKD2,HA exprimierten als auch primäre Zilien bildeten. Um nun ein zuverlässigeres Modell zur Darstellung der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 *in vivo* zu erhalten, wurde eine stabile Zelllinie generiert.

Hierbei wurde das Plasmid pVC210/PKD2,HA dauerhaft in eine LLC-PK₁-Zelllinie integriert. Nun exprimierten primär alle Zellen der stabilen Zelllinie das Plasmid pVC210/PKD2,HA. Mittels transienter Transfektion sollte nun in einem zweiten Schritt das zweite Plasmid pUCtrans/mPkd1,VN210 eingebracht werden. So konnte der Fokus bei der Suche nach den gewünschten Zellen auf jene Zellen gelegt werden, in welchen mittels Immuncytochemie der Nachweis des Polycystin-1-Konstruktes gelungen war. Um dies zu erreichen, wurde pVC210/PKD2,HA zusammen mit einem für eine Puromycinresistenz codierenden Plasmides im Verhältnis 10:1 (w/w) mit Poly-L-Ornithin in LLC-PK₁-Zellen transfiziert. Nach zwei Wochen Selektion unter Puromycin (1 µg/ml Medium) wurden einzelne Kolonien ausgewählt und herangezogen. Nach erfolgter Untersuchung der Zelllinien mittels Western-Blot und Immuncytochemie auf die positive Expression des Plasmids pVC210/PKD2,HA wurde diejenige Zelllinie ausgewählt, bei welcher im Gegensatz zu den anderen, ebenso stabil transfizierten LLC-PK₁-pVC210/PKD2,HA-Zelllinien als Besonderheit eine regelhafte

Ausbildung von primären Zilien zu erkennen war. Diese Fähigkeit der Zilienbildung ist aufgrund der nachgewiesenen Co-Lokalisation (Yoder et al., 2002) und der postulierten Bildung eines Heterodimers (Tsiokas et al., 1997, Qian et al., 1997) der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium von herausragender Bedeutung, da die Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 in diesem Zellkompartiment nun erstmals *in-vivo* nachgewiesen werden sollte.

Nach Auftrennung der Proteinfraction des Zelllysates der stabil transfizierten Zelllinien durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Transfer auf eine PVDF-Membran (vgl. Kapitel 2.11.2 und 2.11.3) konnte durch semiquantitative Analyse mittels Anti-HA Primärantikörper und HRP-konjugiertem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper für eine ausgewählte Zelllinie (#61) eine stärkere Expression des transfizierten Plasmids nachgewiesen werden.

In Abbildung 10 ist die ausgewählte Zelllinie nach erfolgter Immuncytochemie mit gegen das HA-Epitop und gegen acetyliertes Tubulin gerichteten Primärantikörpern dargestellt. Zu erkennen ist die positive Expression des klonierten pVC210/PKD2,HA-Plasmids in (a) sowie die regelmäßige Ausbildung von primären Zilien in (b), welche mittels des gegen anti-acetyliertes Tubulin gerichteten Antikörpers dargestellt werden konnten.

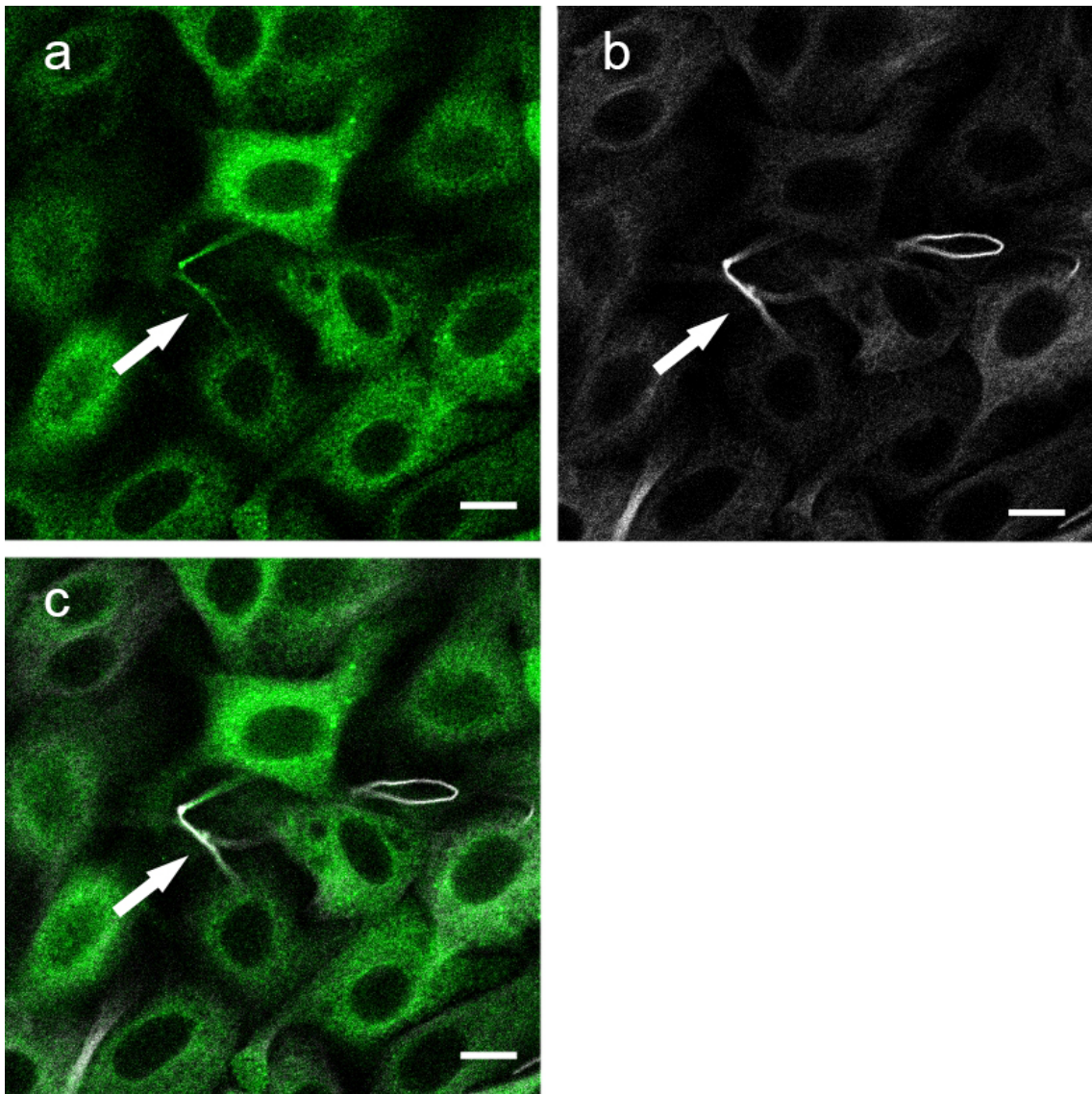


Abbildung 10: Immuncytochemie von mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierten LLC-PK₁-Zellen. Nachweis der Expression von pVC210/PKD2,HA mittels Anti-HA-Primärantikörper und Dylight 405-konjugiertem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. Darstellung primärer Zilien mittels anti-acetyliertem Tubulin-Primärantikörper und Alexa 633-konjugiertem anti-Mouse IgG Sekundärantikörper. a) Nachweis der Expression von pVC210/PKD2,HA in mehreren Zellkörpern und einem zentral fokussierten potentiellen primären Zilium. b) In der gegen acetyliertes Tubulin gerichteten Färbung sind mehrere Zellen und einige primäre Zilien erkennbar. c) In der Projektion zeigt sich die eindeutige Übereinstimmung des in a) zu sehenden potentiellen primären Ziliums mit dem durch die Färbung gegen acetyliertes Tubulin identifizierten primären Zilium in b). Maßstabsbalken = 10 μ m.

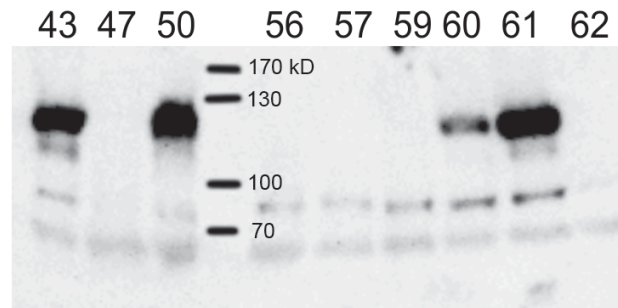


Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierten LLC-PK₁-Zelllinien. Abgebildet ist beispielhaft die semiquantitative Analyse mittels Anti-HA-Primärantikörper. Die Bandendetektion erfolgte mittels HRP-konjugiertem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. Aufgetragen sind die stabil transfizierten Zelllinien Nr. 43, 47, 50, 56, 57, 59, 60, 61 und 62. Deutlich zu sehen ist die bei gleicher applizierter Proteinmenge stärkere Bande bei den Zelllinien Nr. 43, 50 und 61. Da sich lichtmikroskopisch für die Zelllinie Nr. 61 ein häufigeres Auftreten von primären Zilien zeigte, wurde zum Nachweis der Interaktion der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium diese Zelllinie verwendet.

3.4 Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung ist eine monogenetische Erkrankung. Aufgrund ähnlicher Phänotypen bei Mutationen in den betroffenen Genen *PKD1* und *PKD2* wird derzeit von einer gemeinsamen Signalkaskade bzw. einem heteromeren Proteinkomplex ausgegangen, wobei Störungen hierbei offenbar zu einer veränderten Signalweiterleitung mit entsprechend veränderter Epithelentwicklung und -funktion führen (Arnaout, 2001). Die Bildung von Heterodimeren beider Proteine in Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Tsio-
kas et al., 1997; Qian et al., 1997). Der Interaktionsbereich selbst wird von Tsio-
kas et al. (1997) bei Polycystin-2 auf die AS 742-968 eingegrenzt. Qian et al. (1997) beschreiben für Polycystin-1 den Minimalbereich einer Coiled-coil-Domäne, welcher für die Wechselwirkung mit Polycystin-2 ausreichend sein soll und sich auf die AS 4214-4248 erstreckt.

Aufgrund von Sequenzhomologien mit TRP-Kanälen wird Polycystin-2 diesen zugeordnet und ist als nicht-selektiver Kationenkanal durchlässig für Ca^{2+} -Ionen (González-Perrett et al., 2001; Koulen et al., 2002). Die Rolle der Ca^{2+} -Ionen ist hierbei aber nicht vollkommen verstanden (Casuscelli et al., 2009). Es ist jedoch bekannt, dass die Ca^{2+} -Ionenkonzentration die Durchlässigkeit von Poly-

cystin-2 reguliert (Cai et al. 2004). Eine weitere Regulation der Kanalaktivität findet durch Polycystin-1 statt, so steigert die gleichzeitige Expression von Polycystin-1 und Polycystin-2 die Kanalaktivität um das 20-fache (Hanaoka et al., 2000). Veränderungen der Ca^{2+} -Durchlässigkeit von Polycystin-2 werden bei der ADPKD beobachtet, wobei insbesondere der Zusammenbruch der Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Erkrankung spielt. So ist die Mutation Q4224P in Polycystin-1 identifiziert, welche ADPKD beim Menschen auslöst (Badenas et al., 1999). Untersuchungen der äquivalenten Mutation bei Mäusen (Q4215P) zeigen, dass diese Mutation die Interaktion der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 außer Kraft setzt. Ebenso kann gezeigt werden, dass die Überexpression des C-terminalen Teils von Polycystin-1 die Leitfähigkeit des Polycystin-1-Polycystin-2-Komplexes verändert, wohingegen bei Polycystin-1-Mutanten, welche keine Interaktion mit Polycystin-2 eingehen, keine Änderung der Leitfähigkeit detektiert werden kann (Casuscelli et al., 2009).

Da die beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 besonders in primären Zilien von renalen Epithelzellen des proximalen Tubulus und Sammelrohr co-lokalisiert sind (Yoder et al., 2002) und darüber hinaus die Bildung von Heterodimeren gezeigt werden konnte (Tsiokas et al., 1997; Qian et al., 1997), sollte nun mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation der Nachweis der Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium gelingen. Zur Darstellung der Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 wurde das Plasmid pUC-Trans/mPkd1,VN210 mittels transienter Transfektion in die mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierte LLC-PK₁-Zelllinie (siehe Kapitel 3.3) eingebracht. In der gegen das HA-Epitop gerichteten Färbung (Abbildung 12a) sind exemplarisch mehrere pVC210/PKD2,HA-positive Zellen sichtbar. In der Bildmitte zeigt sich beispielhaft ein einzelnes primäres Zilium einer Zelle mit deutlicher Akkumulation des Proteinproduktes von pVC210/PKD2,HA. Der Nachweis der Expression des Polycystin-1-Konstruktes konnte mittels Anti-GFP-Antikörper erbracht werden (c). Auch hier zeigte sich eine Akkumulation im primären Zilium. In (b) ist die Venus-Fluoreszenzkomplementation der beiden Proteine gezeigt, welche sich ausschließlich auf den Bereich des primären Ziliums erstreckt.

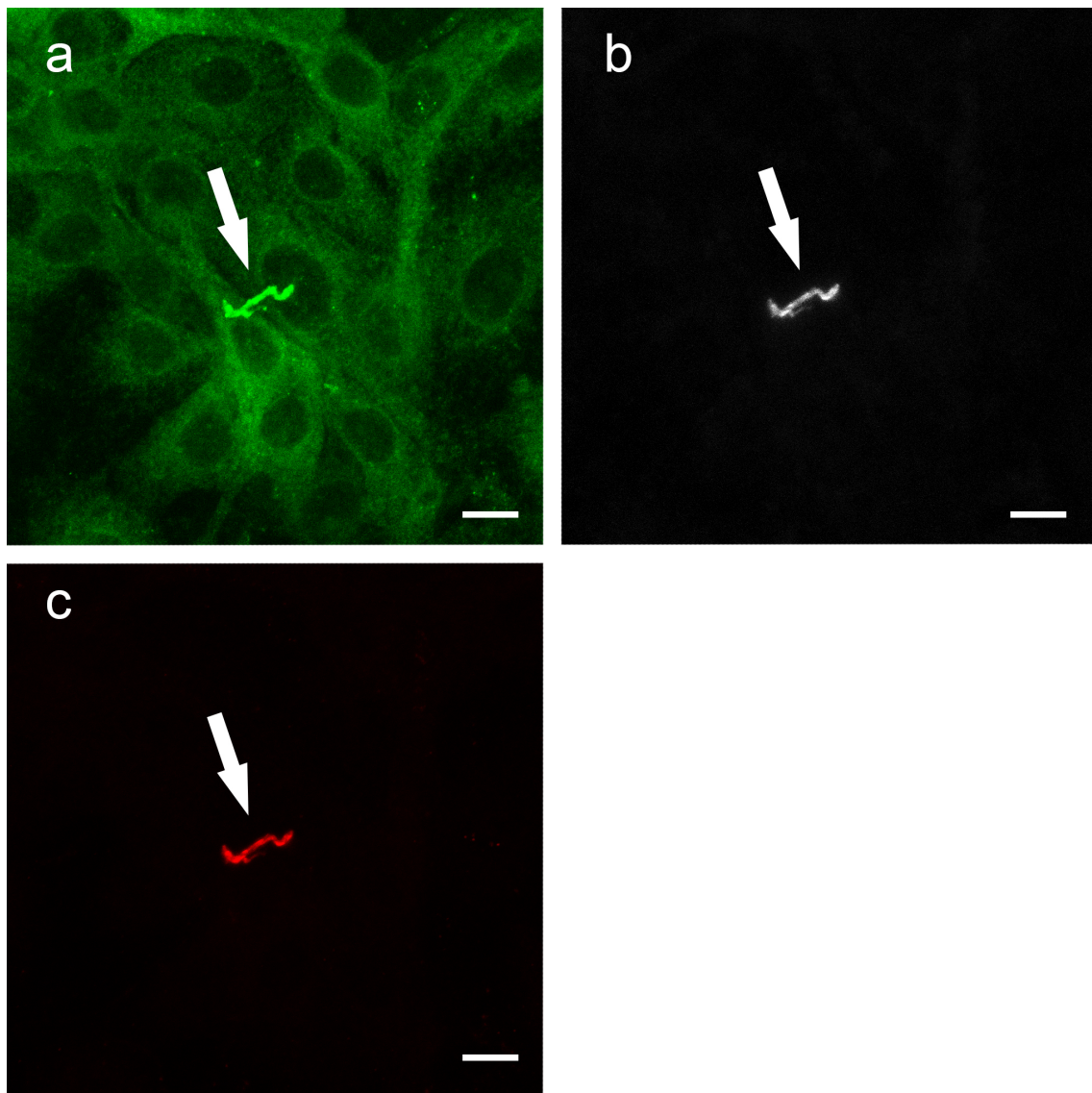


Abbildung 12: Nachweis der Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium von LLC-PK₁-Zellen. Immuncytochemie (a und c) und Fluoreszenzkomplementation (b). Die mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierte LLC-PK₁-Zelllinie wurde transient mit pUC-Trans/mPkd1,VN210 transfiziert und 48 Stunden später mit PFA fixiert. Nachweis der Expression von pVC210/PKD2,HA mittels anti-HA-Primärantikörper und Dylight 405-konjugiertem anti-Mouse IgG Sekundärantikörper. Nachweis der Expression von pUC-Trans/mPkd1,VN210 mittels anti-GFP-Primärantikörper und Alexa 633-konjugiertem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. a) Zu sehen sind mehrere pVC210/PKD2,HA-positive LLC-PK₁-Zellkörper mit zentral fokussiertem primären Zilium in der gegen das HA-Epitop gerichteten Färbung. b) Venus-Fluoreszenzsignal beruhend auf der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 im fokussierten primären Zilium. c) Gegen VN210 gerichteter Antikörper zum Nachweis der Expression des Polycystin-1-Konstruktes. Der Messbalken entspricht jeweils 5 µm.

3.5 Negativkontrolle mit VN210/cystin

Bei einer Mauslinie mit kongenitalen, polyzystischen Nieren (cpk), die der Erforschung der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung dient, konnte *Cys1* als das verantwortliche Gen, welches zur Pathogenese der Erkrankung führt, ausgemacht werden. *Cys1* wird in Niere und Leber exprimiert und kodiert für das Protein Cystin, welches bei dieser Mauslinie einen Funktionsverlust erfährt. Cystin selbst wird als 145 AS langes, hydrophiles Protein beschrieben, das im primären Zilium lokalisiert wurde (Hou et al., 2002; Tao et al., 2009). Für den Transport in das primäre Zilium ist sowohl eine N-terminale Myristylierung als auch ein AxEGG-Transportmotiv notwendig (Tao et al., 2009). Weiter konnte an mCCD-Zellen die Co-Lokalisation von Cystin mit den an der Pathogenese der ADPKD beteiligten Proteinen Polycystin-1 und Polycystin-2 nachgewiesen werden (Yoder et al., 2002). Mit der vorliegenden Negativkontrolle soll nachgewiesen werden, dass ohne Interaktion zweier Proteine bei dennoch enger räumlicher Nähe im primären Zilium der LLC-PK₁-Zellen keine Komplementation der Venus-Fragmente detektierbar ist.

Hierzu wurde das Plasmid VN210/cystin transient in die stabil transfizierten pVC210/PKD2,HA-Zellen eingebracht. Die Fixation der Zellen mittels PFA-Lösung erfolgte nach 48 Stunden. Zu sehen ist beispielhaft ein primäres Zilium in der gegen das HA-Epitop des Polycystin-2-Konstruktes gerichteten Färbung (a). Im Kanal zur Beobachtung der Komplementation ist kein entsprechendes Signal detektierbar (b). Der Nachweis von VN210/cystin mittels Anti-GFP-Antikörper zeigt deutlich das Vorkommen im eingestellten primären Zilium (c).

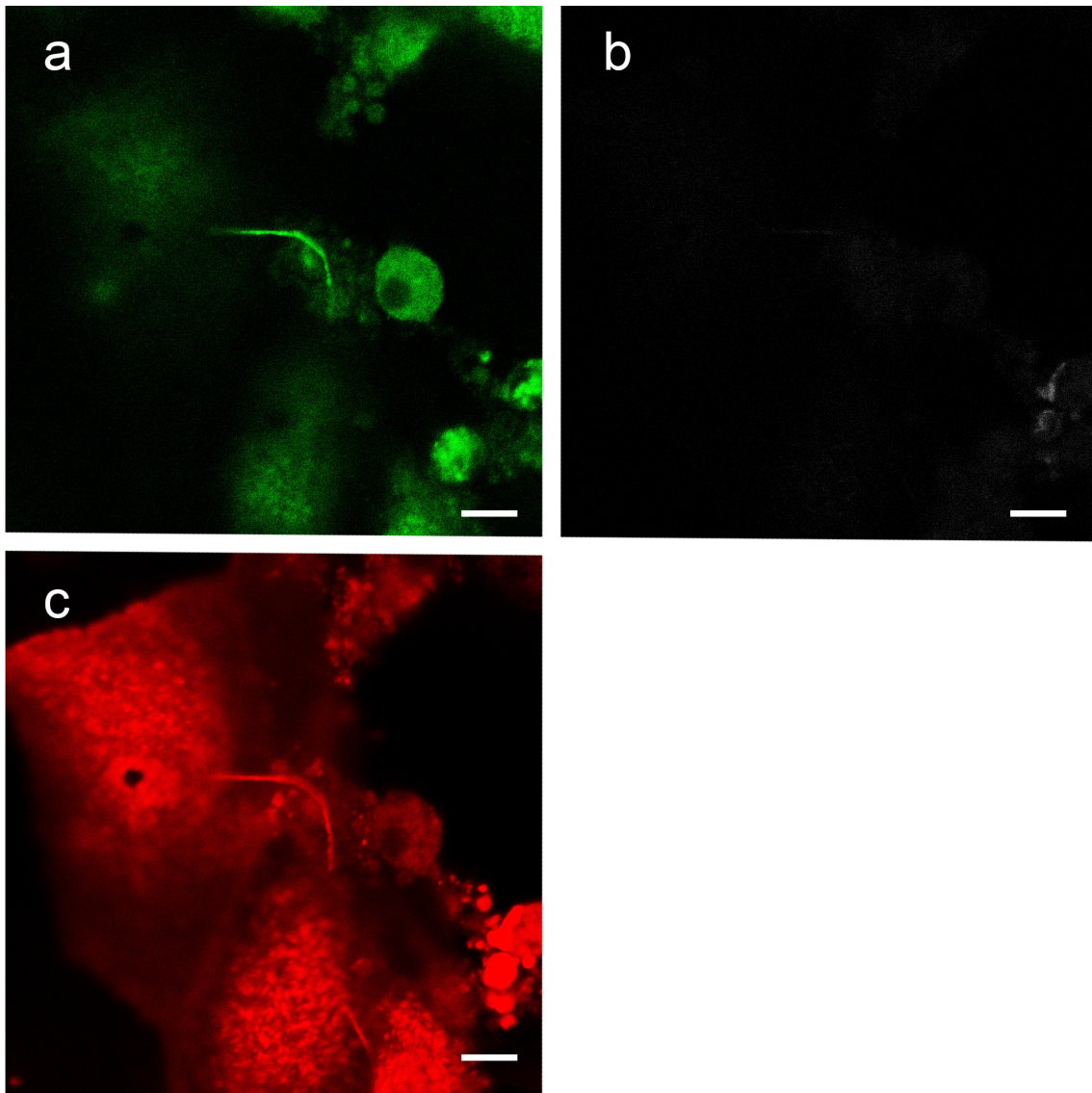


Abbildung 13: Negativkontrolle mit gleichzeitiger Expression von VN210/cystin und pVC210/PKD2,HA in LLC-PK₁-Zellen. Die mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierte LLC-PK₁-Zelllinie wurde transient mit VN210/cystin transfiziert und 48 Stunden später mit PFA fixiert. Nachweis der Expression von pVC210/PKD2,HA mittels anti-HA-Primärantikörper und Dylight 405-gekoppeltem anti-Mouse IgG Sekundärantikörper. Nachweis der Expression von VN210/cystin mittels anti-GFP-Primärantikörper und Alexa 633-gekoppeltem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. a) Zu sehen sind mehrere pVC210/PKD2,HA-positive LLC-PK₁-Zellkörper mit primärem Zilium in der gegen das HA-Epitop gerichteten Färbung. b) Im Kanal für die Venus-Fluoreszenzkomplementation ist kein Signal detektierbar. c) Gegen VN210/cystin gerichteter Antikörper zum Nachweis der Expression des VN210/cystin-Konstruktes. Der Messbalken entspricht 5 μ m

3.6 Negativkontrolle mit VN210/cofilin

Eine weitere potentielle Negativkontrolle stellt die zeitgleiche Expression der Plasmide VN210/cofilin und pVC210/PKD2,HA dar, da Cofilin als Aktinbindepotein ubiquitär in der Zelle vorhanden ist und bisher keine Interaktion zwischen Cofilin und Polycystin-2 publiziert wurde. Hierzu wurde das Plasmid VN210/cofilin transient in die stabile Zelllinie eingebracht. Die Fixation der Zellen mittels PFA-Lösung erfolgte nach 48 Stunden. In der gegen das HA-Epitop des Polycystin-2-Konstruktes gerichteten Färbung zeigen sich beispielhaft mehrere Zellen positiv für pVC210/PKD2,HA (a). Einige dieser Zellen sind ebenso positiv für VN210/cofilin (c). Weiter zeigt sich eine starke Komplementationsreaktion im entsprechenden Kanal (b). Hierbei ist die gleichmäßige Verteilung der Intensität im Zytoplasma zu beobachten, wohingegen im Zellkern aller drei Zellen eine deutlich stärkere Fluoreszenz detektierbar ist, obwohl sich die entsprechenden Proteine in der Immuncytochemie schwächer präsentieren.

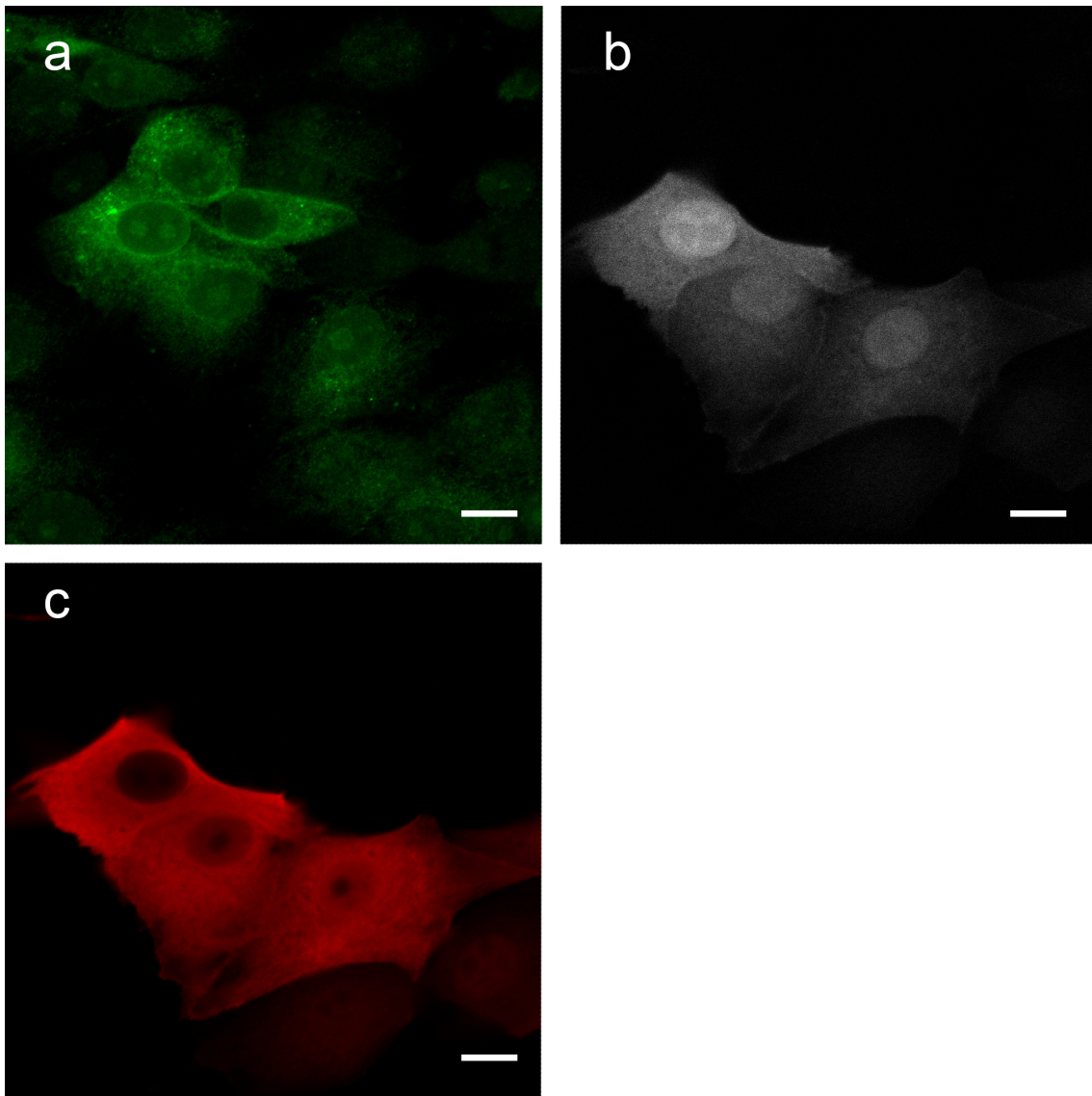


Abbildung 14: Gleichzeitige Expression von VN210/cofilin und pVC210/PKD2,HA in LLC-PK₁-Zellen. Die mit pVC210/PKD2,HA stabil transfizierte LLC-PK₁-Zelllinie wurde transient mit VN210/cofilin transfiziert und 48 Stunden später mit PFA fixiert. Nachweis der Expression von pVC210/PKD2,HA mittels anti-HA-Primärantikörper und Dylight 405-gekoppeltem anti-Mouse IgG Sekundärantikörper. Nachweis der Expression von VN210/cofilin mittels anti-GFP-Primärantikörper und Alexa 633-gekoppeltem anti-Rabbit IgG Sekundärantikörper. a) Zu sehen sind mehrere pVC210/PKD2,HA-positive LLC-PK₁-Zellkörper in der gegen das HA-Epitop gerichteten Färbung. b) detektiertes Signal aufgrund einer positiven Fluoreszenzkomplementation der beiden Venus-Fragmente c) Gegen VN210/cofilin gerichteter Antikörper zum Nachweis der Expression des VN210/cofilin-Konstruktes. Der Messbalken entspricht 10µm

4 Diskussion

Bei der autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung kommt es durch die Ausbildung von multiplen renalen Zysten langfristig zur terminalen Niereninsuffizienz. Mit einem Anteil von 10% stellt die ADPKD eine der Hauptursachen hierfür dar (Gallagher et al., 2002). Da bisher symptomatisch lediglich mittels verschiedener Dialyseverfahren therapiert werden kann und als kausale Therapie allein die allogene Nierentransplantation verbleibt, ist für das Verständnis der Erkrankung und die Entwicklung neuer Therapieansätze die Aufklärung der pathophysiologischen Prozesse auf molekularer Ebene von entscheidender Bedeutung.

Die ADPKD ist eine monogenetische Erkrankung, welche durch Mutationen in einem der zwei beteiligten Gene ausgelöst wird. *PKD1* ist hierbei für ca. 85% der Fälle verantwortlich und kodiert für Polycystin-1, ein Transmembranprotein, welches vorwiegend im primären Zilium und der lateralen Domäne der Plasmamembran gefunden werden kann. Aufgrund der komplexen Struktur scheint Polycystin-1 eine Rolle als Oberflächenmechanorezeptor sowohl bei Zell-Zell- als auch bei Zell-Matrix-Interaktionen zu spielen. Mutationen im Gen *PKD2* führen ebenso zur Manifestation der Erkrankung mit ähnlichen Symptomen. *PKD2* kodiert für Polycystin-2, ein Protein mit sechs Transmembranhelices und Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, cis-Golgi-Netzwerk und primären Zilium. Aufgrund ähnlicher Phänotypen bei Mutationen in den betroffenen Genen wird derzeit von einer gemeinsamen Signalkaskade bzw. einem heteromeren Proteinkomplex ausgegangen, wobei Störungen hierbei offenbar zu einer veränderten Signalweiterleitung mit entsprechend veränderter Epithelentwicklung und -funktion führen (Arnaout, 2001). Die Bildung von Heterodimeren beider Proteine in Hefe-Zwei-Hybrid-Systemen ist von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen worden (Tsiokas et al., 1997; Qian et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg etabliert, zum anderen erfolgte damit der Nachweis der Lokalisation der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 *in vivo*.

4.1 Diskussion der verwendeten Methoden

4.1.1 Etablierung der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation

Da Protein-Protein-Interaktionen in Zellen grundsätzlich von der Gesamtzahl aller in der Zelle vorkommenden Proteine und den lokalen Gegebenheiten, bspw. des pH-Wertes, aber auch von externen Stimuli, welche in intrazellulären Signalkaskaden weitergeleitet werden, abhängig sind, konnte auf den Nachweis dieser Interaktionen *in vivo* im Hinblick auf das Verständnis der komplexen Funktionsweise der Signalverarbeitung nicht verzichtet werden. Darüber hinaus war der Nachweis der subzellulären Lokalisation der Interaktion ebenso entscheidend, um die Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang einzuordnen. Hierbei standen grundsätzlich der nach Förster benannte Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation zur Verfügung, um Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachweisen zu können.

FRET beruht auf einem physikalischen Prozess der Energieübertragung, bei welchem die Energie eines Donor-Moleküls strahlungsfrei auf einen Akzeptor übertragen wird (Förster, 1948). In der vorliegenden Arbeit wurde nicht auf die von Förster beschriebene Methode zurückgegriffen, da ein Anbringen des Donor- oder Akzeptormoleküls an den C-Terminus von Polycystin-2 den Transport an die vermutete Interaktionsstelle verhindern würde (Pers. Mitteilung Dr. Karin Babinger). Eine N-terminale Verbindung der für den FRET notwendigen Moleküle mit den beiden Proteinen wiederum liegt außerhalb der Möglichkeiten der Methode, da hierfür Donor- und Akzeptormolekül auf einen Abstand von weniger als 10 nm angenähert werden müssen. Dies ist aufgrund der Proteingrößen und der jeweils C-terminal gelegenen Interaktionsstellen von Polycystin-1 und Polycystin-2 nicht zu erreichen. Weiterhin sind zur Darstellung von Interaktionen mit dieser Methode höhere Proteinkonzentrationen erforderlich, um den Energietransfer beobachten zu können, als dies bspw. bei der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation nötig ist. Jedoch kann mittels des FRET die Darstellung der Interaktion in Echtzeit erreicht werden (Kerppola, 2008).

Eine weitere Möglichkeit, Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* darzustellen, bietet die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation. Diese Methode ermöglicht das direkte Beobachten der subzellulären Lokalisation einer spezifischen Protein-Protein-Interaktion. Sie basiert auf der Komplementation zweier nicht fluoreszierender Fragmente eines fluoreszierenden Proteins, wenn diese mittels der Interaktion zweier weiterer Proteine in enge räumliche Nähe gebracht werden. Vorteilhaft ist hierbei die starke intrinsische Fluoreszenz der gebildeten Komplexe, welche den Nachweis selbst bei geringen Konzentrationen der Interaktionspartner ermöglicht. Eine Beobachtung der Komplexbildung und Komplexdissoziation in Echtzeit ist mit dieser Methode jedoch nicht realisierbar, da die Fragmente des fluoreszierenden Proteins irreversibel binden (Hu et al., 2002). In Bezug auf die Plasmamembran konnten frühere Untersuchungen zeigen, dass der Nachweis von Interaktionen integraler Membranproteine trotz deren besonderen topologischen Grenzen möglich ist (de Virgilio et al., 2004; Lopez-Gimenez et al., 2007).

Bevor mit dem Nachweis der Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 begonnen wurde, musste das von Ohashi et al. 2012 beschriebene Verfahren zum Nachweis der Aktin-Cofilin Interaktion mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation auf die verwendeten LLC-PK₁-Zellen und die am Lehrstuhl vorhandenen Transfektionsreagenzien angewandt und auf korrekte Funktion überprüft werden. Hierbei wurde auf die von Ohashi VN210 (AS 1-210) bzw. VC210 (AS 211-238) genannten Venus-Fragmente zurückgegriffen, da diese bei alleiniger Expression keine Selbstassemblierung und keine nachweisbare Fluoreszenz zeigten. Dies war von Bedeutung, da falsch-positive Ergebnisse durch die Komplementation der beiden Fragmente ohne Interaktion der zu untersuchenden Proteine nicht wünschenswert sind. Weiterhin war die von Ohashi publizierte Eigenschaft des Fragmentpaares wichtig, bei alleiniger Expression eines Venus-Fragmentes im Zellsystem keine Fluoreszenz zu verursachen. Die Ergebnisse von Ohashi et al. zeigen, dass das h- β -actin/VC210 und VN210/cofilin-wt Paar eine gute Möglichkeit darstellt, mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation die spezifische Interaktion der beiden Proteine Aktin und Cofilin in lebenden Zellen nachzuweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden nun die publizierten Eigenschaften des Venus-Fragmentpaares auf die verwendeten LLC-PK₁-Zellen mit den zur Verfügung stehenden Transfektionsreagen-

zien übertragen. Hierbei gelang es, die für HeLa und COS-7 Zellen publizierte starke Fluoreszenz auch mit LLC-PK₁-Zellen zu erreichen (siehe Abbildung 5). Bei alleiniger Expression eines Plasmides war jeweils keine entsprechende Fluoreszenz nachweisbar. Dies ließ den Schluss zu, dass auch im vorliegenden Zellsystem der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation möglich ist.

4.1.2 Generierung einer stabilen LLC-PK₁-Zelllinie

Um die Protein-Protein-Interaktion zwischen Polycystin-1 und Polycystin-2 mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation nachzuweisen, wurde eine stabile LLC-PK₁-Zelllinie generiert, welche pVC210/PKD2,HA konstitutiv exprimiert. Hierzu wurden LLC-PK₁-Zellen mit pVC210/PKD2,HA und einem für eine Puromycinresistenz kodierenden Plasmid transfiziert. Nach Selektion unter Puromycin wurden entsprechende Klone ausgewählt (vgl. 3.3). Hierbei bestand der Vorteil der stabilen Zelllinie darin, dass die Plasmid-DNA bei bestehendem Selektionsdruck langfristig in den transfizierten Zellen verbleibt, da sie in deren Genom integriert wird. Hierdurch wurde die Variabilität verringert, da bei transienter Transfektion zwangsläufig Schwankungen innerhalb des Expressionssystems zustande kommen (Hollon und Yoshimura, 1989). Die Verwendung stabiler Zelllinien sorgte für reproduzierbare Untersuchungen und ermöglichte es, Negativkontrollen im direkten Vergleich durchzuführen. Außerdem können im Verlauf weitere Interaktionen von Polycystin-2 mit anderen Proteinen mittels derselben Methode dargestellt werden.

In der Immunocytochemie (Abbildung 10) konnte gezeigt werden, dass in den stabilen Linien das Genprodukt von pVC210/PKD2,HA produziert wurde. Weiterhin war die regelhafte Ausbildung von Epitop-positiven Zilien in einer der Linien zu beobachten. Der Transport des Proteins ins Zilium war aufgrund der nachgewiesenen Co-Lokalisation (Yoder et al., 2002) und der postulierten Bildung eines Heterodimers (Tsiokas et al., 1997, Qian et al., 1997) der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium von herausragender Bedeutung, da die Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 in diesem Zellkompartiment nun erstmals *in vivo* nachgewiesen wurde.

4.2 Polycystin-1 interagiert mit Polycystin-2 im primären Zilium renaler Epithelzellen

Aufgrund ähnlicher Symptomatik bei Mutationen in den Genen *PKD1* und *PKD2* wird derzeit von einem heteromeren Proteinkomplex oder einer gemeinsamen Signalkaskade ausgegangen, an welcher die beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 in Interaktion treten. Störungen führen hierbei offenbar zu einer veränderten Signalweiterleitung mit nachfolgend veränderter Epitheldifferenzierung (Arnaout, 2001). Die Bildung von Heterodimeren durch Polycystin-1 und Polycystin-2 konnte unabhängig von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden (Tsikokas et al., 1997; Qian et al., 1997). Ebenso wurde die Co-Lokalisation der beiden Proteine im primären Zilium nachgewiesen (Yoder et al., 2002). Funktionell wird davon ausgegangen, dass Polycystin-2 als nicht-selektiver Kationenkanal eine Rolle im Ca^{2+} -Signaling spielt. Hierbei gelten die genauen pathophysiologischen Auswirkungen noch als weitgehend nicht erforscht (Casuscelli et al., 2009). Bei gleichzeitiger Expression der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 kann jedoch eine deutlich höhere Durchlässigkeit von Polycystin-2 für Ca^{2+} -Ionen gemessen werden (Hanaoka et al., 2000). Es wird davon ausgegangen, dass Polycystin-1 als Mechanorezeptor fungiert, welcher externe Stimuli, bspw. die Strömungsgeschwindigkeit des Primärharns, detektiert und mittels Protein-Protein-Interaktion intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Dalagiorou et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion der beiden Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium von Nierentubulusepithelzellen nachgewiesen. Hierzu wurde mit der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation eine etablierte Methode verwendet, mit welcher in der Vergangenheit bereits andere Protein-Protein-Interaktionen gezeigt werden konnten. In Bezug auf die Plasmamembran zeigten frühere Untersuchungen, dass der Nachweis von Interaktionen integraler Membranproteine trotz deren besonderen topologischen Grenzen mit dieser Methode möglich ist (de Virgilio et al., 2004; Lopez-Gimenez et al., 2007). Zum Nachweis der Interaktion von Polycystin-1 und Polycystin-2 im primären Zilium wurden beide Proteine C-terminal mit jeweils einem Venus-Fragment fusioniert. Nach erfolgter Transfektion und Expression der Plasmide wurde zum Nachweis der Co-Lokalisation der beiden Proteine eine Immunocytochemie durchgeführt. Es zeigte sich hier deutlich das Vorkommen von Polycys-

tin-1 und Polycystin-2 in primären Zilien. Dieses Ergebnis stimmt mit den von Yoder et al. 2002 publizierten Ergebnissen überein. Ebenso deutlich erkennbar ist das Venus-Fluoreszenzsignal im entsprechenden Kanal. Da für die Detektion der Fluoreszenz die Interaktion der beiden Proteine nötig ist, kann hierbei vom Nachweis der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 ausgegangen werden. Weiterhin kann durch den Nachweis der Komplexbildung der beiden Proteine davon ausgegangen werden, dass Polycystin-1 und Polycystin-2 Bestandteil der bereits vermuteten gemeinsamen Signalkaskade sein müssen. Dies liefert wichtige Informationen zum Verständnis der Funktion der beiden Proteine bzw. des gebildeten Komplexes. Weiter entscheidend ist die Lokalisation der Interaktion im primären Zilium der verwendeten Nierentubulusepithelzelllinie LLC-PK₁. Dies unterstützt die These der Einordnung der ADPKD als „Ciliopathie“, welche bisher als Konsens diverser Arbeitsgruppen getragen wird.

4.3 Negativkontrollen

Durch die Konstruktion entsprechender Negativkontrollen konnte eine Spontanassemblierung der beiden Venus-Fragmente aufgrund enger räumlicher Nähe im primären Zilium ohne Interaktion der zu untersuchenden Proteine ausgeschlossen werden. Hierzu wurde die vorhandene stabile Zelllinie, welche das Plasmid pVC210/PKD2,HA konstitutiv exprimiert, mit VN210/cystin transient transfiziert. Cystin ist im primären Zilium mit Polycystin-1 und Polycystin-2 colokalisiert (Yoder et al., 2002) und bisher ist keine Interaktion zwischen Polycystin-2 und Cystin publiziert. Auch mit dem dargestellten Versuchsaufbau konnte kein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Dies spricht zum einen dafür, dass die beiden Proteine Polycystin-2 und Cystin nicht miteinander interagieren, zum anderen zeigen diese Ergebnisse, dass die enge räumliche Nähe im primären Zilium nicht für eine Spontanassemblierung des verwendeten Venus-Fragmentpaares ausreicht.

Zunächst als Negativkontrolle gedacht, zeigte die Transfektion der stabilen Zelllinie mit VN210/cofilin ein Fluoreszenzsignal sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern. Die Arbeitsgruppe um Gallagher publizierte 2000 eine Interaktion von Polycystin-2 mit HAX-1. HAX-1 wiederum ist mit dem F-Aktin-Bindeprotein

Cortaktin assoziiert, welches die Verbindung zum Aktin-Zytoskelett der Zelle herstellt. Berücksichtigt man die Interaktion zwischen Aktin und Cofilin, so kann dies eine Erklärung für die detektierbare Komplementation der Venus-Fragmente in der vermeintlichen Kontrolle darstellen. Um den Gesamtzusammenhang jedoch aufzuklären, sind weitere Untersuchungen nötig. Beispielsweise könnte eine mögliche direkte Interaktion zwischen Polycystin-2 und Cofilin mittels eines Hefe-Zwei-Hybridsystems näher untersucht werden. Hierzu könnte Polycystin-2 als Bait-Protein und Cofilin als Prey-Protein konstruiert werden. Ebenso könnte Cofilin als Bait-Protein gegen Proteine einer cDNA-Datenbank untersucht werden, die bisher nicht als Interaktionspartner bekannt sind und die positive Fluoreszenzkomplementation zwischen VN210/cofilin und pVC210/PKD2,HA erklären können.

4.4 Ausblick

Da nun die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg etabliert ist, können hiermit grundsätzlich weitere Protein-Protein-Interaktionen im verwendeten Zellsystem nachgewiesen werden. Besonders im Fokus stehen hierbei sicherlich Interaktionspartner und -orte von Polycystin-2, um die physiologischen Regelkreise, an welchen Polycystin-2 beteiligt ist, aufzuklären und das Krankheitsbild der autosomal-dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung besser zu verstehen.

Darüber hinaus kann im speziellen die Zusammensetzung des Proteinkomplexes, an welchem Polycystin-2 und Cofilin miteinander in Wechselwirkung treten, im Zentrum zukünftiger Bemühungen stehen.

Weiter ist die Generierung einer weiteren stabilen Linie denkbar, bei welcher das VC210-Fragment N-terminal mit Polycystin-2 fusioniert wird, um entsprechende Interaktionsstellen mit Molekülen des ziliären Transportsystems IFT zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Die autosomal-dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD; ICD-10: Q61) ist mit einer Inzidenz von 1:1.000 eine der häufigsten monogenen Erbkrankheiten. Sie ist charakterisiert durch eine progrediente Akkumulation von Zysten im Nierenparenchym, eine Anhäufung im Bereich der Sammelrohre und proximalen Nierentubuli ist bekannt (Heggö et al., 1966; Verrani und Silva, 1988; Gallagher et al., 2002). Bei Patienten mit ADPKD sind stets beide Nieren betroffen. Symptomatisch kann mittels Dialyseverfahren therapiert werden, kausal bleibt zur Heilung lediglich die allogene Nierentransplantation. Die ADPKD ist eine monogenetische Erkrankung, welche durch Mutationen in mindestens zwei Genen ausgelöst wird. Durch Mutationen in *PKD1* oder *PKD2* kommt es zur Ausbildung des Krankheitsbildes mit ähnlichen Symptomen. Derzeit wird von einer gemeinsamen Signalkaskade bzw. einem heteromeren Proteinkomplex ausgegangen, wobei Störungen hierbei offenbar zu einer veränderten Signalweiterleitung mit entsprechend veränderter Epithelentwicklung und –funktion führen (Arnaout, 2001).

Ziel dieser Arbeit war es zum einen, die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation am Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie der Universität Regensburg zu etablieren, zum anderen sollte damit der Nachweis der Lokalisation der Interaktion der Proteine Polycystin-1 und Polycystin-2 *in vivo* erfolgen. Im einzelnen konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- 1) Die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation ist mit dem von Ohashi et al. 2012 beschriebenen Venus-Fragmentpaar auch in der zur Verfügung stehenden LLC-PK₁-Zelllinie verwendbar.
- 2) Es konnte eine stabile Zelllinie etabliert werden, welche pVC210/PKD2,HA konstitutiv exprimiert. Diese steht dem Lehrstuhl für Molekulare und Zelluläre Anatomie für weitere Interaktionsstudien zur Verfügung.
- 3) Polycystin-1 interagiert mit Polycystin-2 im primären Zilium renaler Epithelzellen. Dies bestätigt die Vermutung eines Proteinkomplexes, an welchem beide Proteine in Wechselwirkung treten und kann eine

Erklärung für das Auftreten ähnlicher Symptome bei Mutationen in *PKD1* und *PKD2* sein.

- 4) Ein interessanter Seitenaspekt der vorliegenden Arbeit ist, dass Polycystin-2 mit Cofilin, einem Aktin-Bindeprotein, in Interaktion zu treten scheint. Die Untersuchung dieser Interaktion kann durchaus im Zentrum künftiger Forschung stehen.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BA	Bisacrylamid
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	circa
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny broth Medium
M	Molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
N-Terminus	Aminoternus
ng	Nanogramm

nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>PKD1</i>	polycystic kidney disease 1 Gen
<i>PKD2</i>	polycystic kidney disease 2 Gen
Prof.	Professor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRP	„transient receptor potential“
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar

7 Literaturverzeichnis

Arnaout, M.A. (2001). Molecular genetics and pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 52, 93-123.

Badenas, C., Torra, R., San Millan, J.L., Lucero, L., Mila, M., Estivill, X., Darnell, A. (1999). Mutational analysis within the 3' region of the PKD1 gene. *Kidney Int* 55, 1225–1233.

Bastos, A.P. und Onuchic, L.F. (2011) Molecular and cellular pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 44, 606-617.

Bhunja, A.K., Piontek, K., Boletta, A., Liu, L., Qian, F., Xu, P.N., Germino, F.J., Germino, G.G. (2002). PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109, 157-68.

Bosk S. (2007). Quantifizierung der Wechselwirkung von Polycystin-2 mit seinen spezifischen Interaktionspartnern mittels Quarzmikrowaagetechnik (Diplomarbeit am Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Georg-August-Universität Göttingen unter Prof. Dr. C. Steinem).

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248-254.

Brasier, J.L., und Henske, E.P. (1997). Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J. Clin. Invest* 99, 194–199.

Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R. und Somlo, S. (1999). Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. *J. Biol. Chem* 274, 28557-28565.

Cai, Y., Anyatonwu, G., Okuhara, D., Lee, K.B., Yu, Z., Onoe, T., Mei, C.L., Qian, Q., Geng, L., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., Somlo, S. (2004). Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. *J Biol Chem* 279, 19987–19995.

Casuscelli, J., Schmidt, S., DeGray, B., Petri, E.T., Celić, A., Folta-Stogniew, E., Ehrlich, B.E., Boggon, T.J. (2009). Analysis of the cytoplasmic interaction between polycystin-1 and polycystin-2. *Am J Physiol Renal Physiol* 297, F1310-5.

Celić, A., Petri, E.T., Demeler, B., Ehrlich, B.E. und Boggon T.J. (2008). Domain mapping of the polycystin-2 C-terminal tail using de novo molecular modeling and biophysical analysis. *J. Biol. Chem* 283, 28305–28312.

Chapin, H.C., Caplan, M.J. (2010). The cell biology of polycystic kidney disease. *J Cell Biol* 191, 701-10.

Chauvet, V., Qian, F., Boute, N., Cai, Y., Phakdeekitacharoen, B., Onuchic, L.F., Attié- Bitach, T., Guicharnaud, L., Devuyst, O., Germino, G.G., und Gubler, M.C. (2002). Expression of PKD1 and PKD2 transcripts and proteins in human embryo and during normal kidney development. *Am. J. Pathol* 160, 973–983.

Chen, X. Z. et al. (1999). Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401, 383-386.

Clapham, D.E., Runnels, L.W. und Strübing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nature Reviews Neuroscience* 2, 387-396.

Dalagiorgou, G., Basdra, E.K., Papavassiliou, A.G. (2010). Polycystin-1: Function as a mechanosensor, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42, 1610-1613.

Delmas, P., Nomura, H., Li, X.G., Lakkis, M., Luo, Y., Segal, Y., Fernández-Fernández, J.M., Harris, P., Frischauf, A.M., Brown, D.A. and Zhou, J. (2002). Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J. Biol. Chem* 277, 11276–11283.

Delmas, P., Nauli, S.M., Li, X., Coste, B., Osorio, N., Crest, M., Brown, D.A. and Zhou, J. (2004). Gating of the polycystin ion channel signaling complex in neurons and kidney cells. *FASEB J* 18, 740–742.

de Virgilio, M., Kiosses, WB., Shattil, SJ. (2004). Proximal, selective, and dynamic interactions between integrin alpha II beta 3 and protein tyrosine kinases in living cells. *Journal of Cell Biology* 165, 305.

Dong Y., Skoultchi A.I., Pollard J.W. (1993). Efficient DNA transfection of quiescent mammalian cells using poly-L-ornithine. *Nucleic Acids Res* 21, 771-772.

European Polycystic Kidney Disease Consortium (1994) The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16. *Cell* 77, 881–894.

Förster, T.(1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz *Ann. Phys* 2, 57–75.

Gallagher, A.R., Cedzich, A., Gretz, N., Somlo S. und Witzgall, R. (2000). The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci* 97, 4017-4022.

Gallagher, A.R., Hidaka, S., Gretz, N., and Witzgall, R. (2002). Molecular basis of autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 682-693.

Gallagher, A.R., Hoffmann, S., Brown, N., Cedzich, A., Meruvu, S., Podlich, D., Feng, Y., Könecke, V., de Vries, U., Hammes, H.P., Gretz, N. und Witzgall, R. (2006). A Truncated Polycystin-2 Protein Causes Polycystic Kidney

Disease and retinal Degeneration in Transgenic Rats. *J. Am. Soc. Nephrol* 17, 2719-2730.

Gardner, K. D. Jr. (1969). Composition of fluid in twelve cysts of a polycystic kidney. *N. Engl. J. Med* 281, 985–988.

Geng L., Okuhara D., Yu Z., Tian X., Cai Y., Shibazaki S. und Somlo S. (2006). Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *Journal of Cell Science* 119, 1383-1395.

Gifford, J.L., Walsh, M.P und Vogel, H.J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca²⁺-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem. Journal* 405, 199–221.

González-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A. und Cantiello, H.F. (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc. Natl. Acad. Sci* 98, 1182–1187.

Grantham, J. J. (1993) Fluid secretion, cellular proliferation, and the pathogenesis of renal epithelial cysts. *J. Am. Soc. Nephrol* 3, 1841–1857.

Grantham, J. J. et al. (1987) Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 31, 1145–1152.

Grantham, J. J. et al. (2011). Why kidneys fail in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol* 7, 556–566.

Hanaoka, K., Qian, F., Boletta, A., Bhunia, AK., Piontek, K., et al. (2000). Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408, 990–994.

Harris, PC., Bae, KT., Rossetti, S., Torres, VE., Grantham, JJ., Chapman, AB., Guay-Woodford, LM., King, BF., Wetzel, LH., Baumgarten, DA., Kenney, PJ., Consugar, M., Klahr, S., Bennett, WM., Meyers, CM., Zhang, QJ., Thompson, PA., Zhu, F., Miller, JP. (2006). Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 3013-3019.

Hateboer, N., Dijk, von, M.A., Bogdanova, N., Coto, E., Saggar-Malik, A.K., San Millan, J.L., Torra, R., Breuning, M., and Ravine, D. (1999). Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. European PKD1-PKD2 Study Group. *Lancet* 353, 103–107.

Heggö, O. (1966). A microdissection study of cystic disease of the kidneys in adults. *J Pathol Bacteriol* 91, 311–315.

Hick C., Hick A. (2009). Intensivkurs Physiologie. Elsevier Verlag München (6. Auflage).

Hidaka, S., Könecke, V., Osten, L. und Witzgall, R. (2004). PIGEA-14, a novel coiled-coil protein affecting the intracellular distribution of polycystin-2. *J Biol Chem* 279, 35009–35016.

Hoffmeister, H.A. (2008). Struktur- und Funktionsanalyse von Polycystin-2. Dissertation, Universität Regensburg.

Hoffmeister, H., Babinger, K., Gürster, S., Cedzich, A., Meese, C., Schandendorf, K., Osten, L., de Vries, U., Rascle, A., Witzgall, R. (2011). Polycystin-2 takes different routes to the somatic and ciliary plasma membrane. *J Cell Biol* 192, 631-45.

Hollon, T. und Yoshimura, FK. (1989). Variation in enzymatic transient gene expression assays. *Anal Biochem* 182, 411-8.

Hou, X., Mrug, M., Yoder, BK., Lefkowitz, EJ., Kremmidiotis, G., D'Eustachio, P., Beier, DR., Guay-Woodford, LM. (2002). Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 109, 533-540.

Hu, C.D., Chinenov, Y., Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9, 789.

Huseman, R., Grady, A., Welling, D. & Grantham, J. (1980). Macropuncture study of polycystic disease in adult human kidneys. *Kidney Int* 18, 375–385.

Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J. (1997). Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci* 94, 6397–6402.

Karlson P., Doenecke D. und Koolmann J. (1994). Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme Verlag (14. Auflage)

Kerppola, TK. (2008). Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* 37, 465-487.

Kerppola, TK. (2009). Visualization of molecular interactions using bimolecular fluorescence complementation analysis: characteristics of protein fragment complementation. *Chem Soc Rev* 38, 2876-2886.

Kimberling W.J., Kumar S., Gabow P.A., Kenyon J.B., Connolly C.J. and Somlo S. (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease: Localization of the second gene to chromosome 4q13-q23. *Genomics* 18, 467-472.

Konno, A., Setou, M. und Ikegami, K. (2012). Ciliary and flagellar structure and function-their regulations by posttranslational modifications of axonemal tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 294, 133–170.

Koptides, M., Hadjimichael, C., Koupepidou, P., Pierides, A. und Deltas, CC. (1999). Germinal and Somatic Mutations in the PKD2 Gene of Renal Cysts in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Hum Mol Genet* 8, 509-513.

Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B.E., und Somlo, S. (2002). Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel. *Nat Cell Biol* 4, 191–197.

Köttgen, M., Benzing, T., Simmen, T., Tauber, R., Buchholz, B., Feliciangeli, S., Huber, T.B., Schermer, B., Kramer-Zucker, A., Höpker, K., Simmen, K.C., Tschuke, C.C., Sandford, R., Kim, E., Thomas, G. und Walz G. (2005). Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *The EMBO Journal* 24, 705-716.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lehtonen, S., Ora, A., Olkkonen, V.M., Geng, L., Zerial, M., Somlo, S. und Lehtonen, E. (2000). In Vivo Interaction of the Adapter Protein CD2-associated Protein with the Type 2 Polycystic Kidney Disease Protein, Polycystin-2. *J Biol Chem* 275, 32888-32893.

Li, Q., Dai, Y., Guo, L., Liu, Y., Hao, C., Wu, G., Basora, N., Michalak, M. und Chen, X.-Z. (2003)a. Polycystin-2 Associates with Tropomyosin-1, an Actin Microfilament Component. *J Mol Biol* 325, 949-962.

Li, Q., Montalbetti, N., Shen, P.Y., Dai, X.Q., Cheeseman, C.I., Karpinsky, E., Wu, G., Cantiello, H.F. und Chen X.Z. (2005)b. Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity. *Human Molecular Genetics* 14, 1587-1603.

Li, Q., Montalbetti, N., Wu, Y., Ramos, A., Raychowdhury, M.K., Chen, X.-Z. und Cantiello, H.F. (2006). Polycystin-2 Cation Channel Function Is under the Control of Microtubular Structures in Primary Cilia of Renal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 281, 37566-37575.

Li, Q., Shen, P.Y., Wu, G. und Chen X.-Z. (2003)b. Polycystin-2 Interacts with Troponin I, an Angiogenesis-Inhibitor. *Biochemistry* 42, 450-457.

Li, X., Luo, Y., Starremans, P.G., McNamara, C.A., Pei, Y. und Zhou, J. (2005)a. Polycystin-1 and polycystin- 2 regulate the cell cycle through the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature Cell Biology* 7, 1202-1212.

Li, Y., Wright, J.M., Qian, F., Germino, G.G. und Guggino W.B. (2005)c. Polycystin 2 Interacts with Type I Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor to Modulate Intracellular Ca²⁺ Signaling. *J Biol Chem* 280, 41298-41306.

Lopez-Gimenez, JF., Canals, M., Pediani, JD., Milligan, G. (2007). The α (1b)-adrenoceptor exists as a higher-order oligomer: Effective oligomerization is required for receptor maturation, surface delivery, and function. *Molecular Pharmacology* 71, 1015.

Lüllmann-Rauch, R. (2009). Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (3.Auflage)

Madsen, K. M., Brenner, B. M. (1994). Anthology of the Kidney Vol. 1 661–698 J. B. Lippencott, Philadelphia.

Majoul, I., Straub, M., Duden, R., Hell, SW., Söling, HD. (2002). Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein–protein interactions in single living cells by multifocal multiphoton microscopy. *Reviews in Molecular Biotechnology* 82, 267–277.

Markowitz, G.S., Cai, Y., Li, L., Wu, G., Ward, L.C., Somlo, S., and D'Agati, V.D.. (1999). Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol* 277, F17–F25.

Martinez J.R. and Grantham J.J. (1995). Polycystic kidney disease: etiology, pathogenesis, and treatment. *Disease-a-Month* 41, 693–765.

Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J. und Somlo, S. (1996). PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272, 1339-1342.

Nagai, T., Ibata,K., Park, E.S., Kubota, M., Mikoshiba, K., Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nature Biotechnology* 20, 87 – 90.

Nauli, S.M., F.J. Alenghat, Y. Luo, E. Williams, P. Vassilev, X. Li, A.E. Elia, W. Lu, E.M. Brown, S.J. Quinn, et al. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33,129–137.

Nims N., Vassmer D. and Maser R.L. (2003). Transmembrane Domain Analysis of Polycystin-1, the Product of the Polycystic kidney Disease-1 (PKD1) Gene: Evidence for 11 Membrane-Spanning Domains. *Biochemistry* 42, 13035-13048.

Ohashi, K., Kiuchi, T., Shoji, K., Sampei, K., Mizuno, K. (2012). Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments. *BioTechniques* 52, 45-50.

Ohashi, K. und Mizuno, K. (2014). A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. *Methods Mol Biol* 1174, 247-62.

Paul, BM., Consugar, MB., Ryan Lee, M., Sundsbak, JL., Heyer, CM., Rossetti, S., Kubly, VJ., Hopp, K., Torres, VE., Coto, E., Clementi, M., Bogdanova, N., de Almeida, E., Bichet, DG., Harris, PC. (2013). Evidence of a third ADPKD locus is not supported by re-analysis of designated PKD3 families. *Kidney Int.* 85, 383-92.

Pazour, GJ., Dickert, BL., Vucica, Y., Seeley, ES., Rosenbaum, JL., Witman, GB. und Cole, DG. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 151, 709–18.

Parnell, SC., Magenheimer, BS., Maser, RL., Rankin, CA., Smine, A. et al. (1998). The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 625–31.

Peral, B., San Millán, JL., Ong, AC., Gamble, V., Ward, CJ., Strong, C., Harris, PC. (1996). Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals six novel mutations. *Am J Hum Genet* 58, 86-96.

Peters, D.J., van de Wal, A., Spruit, L., Saris, J.J., Breuning, M.H., Bruijn, J.A., and de Heer, E. (1999). Cellular localization and tissue distribution of polycystin-1. *J Pathol* 188, 439-46.

Pirson Y (2010). Extrarenal manifestations of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 17,173-180.

Praetorius, HA. und Spring, KR. (2001). Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* 184, 71–79.

Praetorius H.A. und Spring K.R. (2004). A physiological view of the primary cilium. *Annu Rev Physiol* 67, 09.1-09.15.

Qian, F., Germino, J., Cai, Y., Zhang, X., Somlo, S., Germino, G. (1997) PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16, 179–183.

Qian F. und Germino G.G. (1997). “Mistakes happen”: somatic mutation and disease. *Am J Hum Genet* 61, 1000-1005.

Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F., und G.G. Germino. (1996). The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 87, 979–987.

Rundle, D.R., Gorbsky, G. und Tsiokas L. (2004). PKD2 Interacts and Co-localizes with mDia1 to Mitotic Spindles of Dividing Cells. *J Biol Chem* 279, 29728-29739.

Schermer B., Benzing T. (2010). Current findings on the pathogenesis of ADPKD. *Nephrologe* 5, 364–374.

Schmitt R., Lang F., Heckmann M. (2010). *Physiologie des Menschen*. Springer Medizin Verlag Heidelberg (31. Auflage)

Schwartz, E.A., Leonard, M.L., Bizios, R. und Bowser, S.S. (1997). Analysis and modeling of the primary cilium bending response to fluid shear. *Am J Physiol* 272, 132-138.

Schünke M., Schulte E., Schumacher U. (2009). *Prometheus LernAtlas der Anatomie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart (2.Auflage).

Shyu, Y., Liu, H., Deng, X., Hu, C. D. (2006). Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions. *BioTechniques* 40, 61-66.

Sloboda, RD. (2009). Posttranslational protein modifications in cilia and flagella. *Methods Cell Biol* 94, 347–363.

Sullivan, L. P., Wallace, D. P., Grantham, J. J. (1998). Epithelial transport in polycystic kidney disease. *Physiol Rev* 78, 1165–1191.

Sutters M. (2006). The Pathogenesis of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* 103, e149-e155.

Tao, B., Bu, S., Yang, Z., Siroky, B., Kappes, JC., Kispert, A., Guay-Woodford, LM. (2009). Cystin localizes to primary cilia via membrane microdomains and a targeting motif. *J Am Soc Nephrol* 20, 2570-80.

Tsiokas, L., Kim, E., Arnould, T., Sukhatme, V., Walz, G. (1997) Homo- and hetero-dimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci* 94, 6965–6970.

Tsiokas, L., Arnould, T., Zhu, C., Kim, E., Walz, G. und Sukhatme, V.P. (1999). Specific association of the gene product of PKD2 with the TRPC1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3934–3939.

Vassilev, P.M. et al. (2001). Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca²⁺ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 341–350.

Veldhuisen, B., Saris, J.J., de Haij, S., Hayashi, T., Reynolds, D.M., Mochizuki, T., Elles, R., Fossdal, R., Bogdanova, N., van Dijk, M.A., Coto, E., Ravine, D., Nrby, S., Verellen-Dumoulin, C., Breuning, M.H., Somlo, S. und Peters, D.J.M. (1997). A Spectrum of Mutations in the Second Gene for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (PKD2). *Am J Hum Genet* 61, 547-555.

Verani R. R. and Silva F. G. (1988) Histogenesis of the renal cysts in adult (autosomal dominant) polycystic kidney disease: a histochemical study. *Mod Pathol* 1, 457–463.

Wang, S. und Dong, Z. (2013). Primary cilia and kidney injury: current research status and future perspectives. *Am J Physiol Renal Physiol* 305, F1085–F1098.

Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gattner, K. und Harris, P.C. (1996). Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney. *Proc Natl Acad Sci* 93, 1524–1528.

Webber, W.A. und Lee, J. (1975). Fine structure of mammalian renal cilia. *Anat Rec* 182, 339-343.

Wheatley, DN. und Bowser, SS. (2000). Length control of primary cilia: analysis of monociliate and multiciliate PtK1 cells. *Biol Cell* 92, 573–82.

Wilson, PD. (2004). Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1868-73.

Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J.H., Reynolds, D.M., Mada, Y., Le, T.C., Hou, H., Kucherlapati, R., Edelmann, W. und Somlo, S. (1998). Somatic Inactivation of Pkd2 Results in Polycystic Kidney Disease. *Cell* 93, 177-188.

Wu, Y., Cai, X.Q., Li, Q., Chen, C.X., Mai, W., Hussain, Z., Long, W., Montalbetti, N., Li, G., Glynne, R., Wang, S., Cantiello, H.F., Wu, G. und Chen, X.Z. (2006). Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Human Molecular Genetics* 15, 3280-3292.

Xu, G.M., González-Perrett, S., Essafi, M., Timpanaro, G.A., Montalbetti, N., Arnaout, M.A., Cantiello, H.F. (2003). Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem* 278, 1457-62.

Xu, M., Ma, L., Bujalowski, P.J., Qian, F., Sutton, RB., Oberhauser, AF. (2013). Analysis of the REJ Module of Polycystin-1 Using Molecular Modeling and Force-Spectroscopy Techniques. *J Biophys* 2013, 525231.

Yoder, B.K., Hou, X., und Guay-Woodford, L.M. (2002). The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13, 2508–2516.

Zhou, J. (2009). Polycystins and Primary Cilia: Primers for Cell Cycle Progression. *Annu Rev Physiol* 71, 83–113.

8 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen sind die persönlichen Daten in der elektronischen Version unveröffentlicht.

9 Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ralph Witzgall bedanken, welcher mir die Möglichkeit zur Promotion an seinem Lehrstuhl gab und das Fachgebiet der Histologie im Rahmen des Studiums exzellent vertreten hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Karin Babinger, welche mir im Labor zu jeder Zeit geduldig zur Seite stand. Danke für die außerordentlich persönliche Betreuung und freundliche Aufnahme am Lehrstuhl! Dies ist bei weitem nicht selbstverständlich und wird mir stets in bester Erinnerung bleiben.

Herzlichen Dank auch an Kerstin Herrmann und Carina Mirbeth, ohne euch beide wäre es im Labor nur halb so Spaßig gewesen!

Larissa Osten, Marion Kubitza und Uwe de Vries gilt mein Dank für die Ratschläge, die ich jederzeit einholen konnte.

Außerhalb des Lehrstuhls danke ich den Herren Nikolai Weichert, Johannes Schuderer und Gregor Schuhknecht sowie Dr. med. Daniel Pfütze für das Ertragen meiner Klagen und das Aufmuntern in schwierigen Zeiten sowie für die jahrelange Freundschaft.

Gedankt sei auch der Familie, namentlich Jutta-Kristina Metzger und Eugen Metzger sowie Christine Luise Metzger, die mich stets unterstützt haben und mich nie zweifeln ließen.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Karl Eugen Metzger, geboren am 26. Dezember 1989 in Backnang, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Karl Eugen Metzger