

**Der Drosophila-Nephrozyt
als Werkzeug zur Validierung von Genen,
die eine Rolle in der
Regulation der glomerulären Filtration spielen**



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER
MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Ann-Kristin Frerking

aus
Hannover

im Jahr
2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

09.06.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Dr. Michael Krahn

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die menschliche Niere	1
1.1.1 Funktion und Bedeutung	1
1.1.2 Die Filtrationsbarriere.....	1
1.2 Genomweite Assoziationsstudien zur Erforschung von Nierenerkrankungen	2
1.3 Der <i>Drosophila</i> -Nephrozyt zur Validierung von Kandidatengenen.....	4
1.4 Der Nephrozyt.....	5
1.5. Genregulation.....	9
1.5.1 UAS/GAL4-System.....	9
1.5.2 RNA-Interferenz.....	10
1.6 Die Kandidatengene.....	17
1.6.1 <i>AMPKγ</i>	17
1.6.2 <i>CG9413</i>	22
1.6.3 <i>CG16717</i>	26
1.6.4 <i>CG32702</i>	28
1.6.5 <i>Dachshund</i>	31
1.6.6 <i>DP Transkriptionsfaktor</i>	36
1.6.7 <i>PIP5K59B</i>	40
1.7 MicroRNA 210	43
2. Material und Methoden	49
2.1 Materialien	49
2.1.1 Reagenzien und Lösungen.....	49
2.1.2 Geräte und Software	50
2.1.3 Fliegenstämme.....	51
2.2 Methoden	51
2.2.1 Untersuchung der Morphologie.....	51
2.2.2 Untersuchung der Funktion	53
3. Ergebnisse	55
3.1 Morphologie.....	55
3.1.1 Wildtyp	55
3.1.2 <i>AMPKγ</i>	55
3.1.3 <i>CG9413</i>	56
3.1.4 <i>CG16717</i>	57

3.1.5 <i>CG32702</i>	58
3.1.6 <i>Dachshund</i>	59
3.1.7 <i>DP Transkriptionsfaktor</i>	60
3.1.8 <i>PIP5K59B</i>	61
3.1.9 MicroRNA 210.....	62
3.2 Ergebnisse der Funktionsanalyse.....	63
4. Diskussion.....	67
5. Zusammenfassung.....	74
6. Anhang.....	75
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	75
6.2 Liste der Tabellen.....	78
6.3 Liste der Abbildungen.....	79
7. Literaturverzeichnis.....	81
8. Erklärung.....	119
9. Danksagung.....	120

1. Einleitung

1.1 Die menschliche Niere

1.1.1 Funktion und Bedeutung

Die menschliche Niere ist ein zentraler Regulator der Körperhomöostase: Wasser, Ionen, Glukose, Aminosäuren und andere Stoffe werden selektiv filtriert und wieder zurück resorbiert, sowie Abfallstoffe ausgeschieden (Cagan 2011). Das Ziel ist dabei eine konstante Elektrolytkonzentration, ein Säure-Basen-Gleichgewicht und ein möglichst optimales intravasales Volumen (Behrends *et al.* 2012). Außerdem synthetisiert die Niere als endokrines Organ Erythropoietin, Vitamin D₃, Renin und Prostaglandine und ist damit an der Erythropoese, dem Knochenstoffwechsel, der Blutdruckregulation und der Modulation der Nierenperfusion beteiligt (Behrends *et al.* 2012).

Die funktionellen Einheiten der menschlichen Niere sind die Glomeruli, in denen das Blut filtriert wird, und das Tubulussystem, in dem das entstandene Ultrafiltrat anschließend modifiziert wird. Ein Glomerulus enthält etwa 30 anastomosierende Kapillarschlingen, denen von außen Podozyten anliegen. Zur mechanischen Stabilisierung dienen Mesangiumzellen (Behrends *et al.* 2012). Die Filtration erfolgt nach Molekülgröße und Ladung, sodass unter physiologischen Bedingungen weder Blutzellen noch Proteine verloren gehen (Behrends *et al.* 2012; Lüllmann-Rauch 2003). Als Maß für die Funktion der Niere dient die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die sowohl von der Zahl der filtrierenden Glomeruli als auch von den Differenzen der hydrostatischen und onkotischen Drücke zwischen Kapillarlumen und dem Innenraum des Glomerulus abhängt (Behrends *et al.* 2012).

1.1.2 Die Filtrationsbarriere

Die größen- und ladungsselektive Filtrationsbarriere setzt sich aus drei Komponenten zusammen: dem Kapillarendothel, einer Basalmembran und einer aus Transmembranproteinen bestehenden Schlitzmembran. Letztere ist zwischen den Fußfortsätzen der Podozyten verankert (Lüllmann-Rauch 2003) (siehe Abbildung 1.1).

Das Kapillarendothel weist etwa 50-100nm große Poren und an der lumenwärtigen Plasmamembran eine anionische Glykokalyx auf (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Basalmembran wird von den Endothelzellen und den Podozyten gebildet. Sie setzt sich aus der dem Endothel zugewandten Lamina rara interna, der Kollagen Typ IV und Laminin enthaltenden Lamina densa und der den Podozyten zugewandten Lamina rara externa zusammen. Die Endothelzellen und die Podozyten sind mittels Zelladhäsionsproteinen an der

Lamina densa befestigt. Ebenfalls dort verankerte Heparansulfat-Proteoglykane bedingen eine stark negative Ladung der Basalmembran (Lüllmann-Rauch 2003).

Die Podozyten bilden ausgehend vom Zellkörper erste Fortsätze, deren Zytoskelett aus Mikrotubuli und Intermediärfilamenten besteht. Die Aktin-basierten sekundären Fortsätze gehen von den primären ab, wachsen um die Blutkapillaren herum und interagieren in der Ebene der Basalmembran (Garg und Holzman 2012; Mandal *et al.* 2004). Zwischen ihnen bildet sich die 35-40nm breite Schlitzmembran aus. Diese besteht vor allem aus Podocin und Nephrin (Barletta *et al.* 2003; Weavers *et al.* 2009). Nephrin ist ein Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domänen sich in der Mitte nach dem Reißverschlussprinzip überlappen, während lateral

Filtrationsporen entstehen (Lüllmann-Rauch 2003). Wichtig ist außerdem das Nephrin-ähnliche Protein NEPH1, das mit einer C-terminalen Domäne von Podocin interagiert (Sellin *et al.* 2003). Ohne Nephrin oder NEPH1 ist die tertiäre Fortsatz-Formation stark gestört (Donoviel *et al.* 2001; Kestila und Jarvela 2003).

Schädigungen im Bereich der Filtrationsbarriere haben schwerwiegende Folgen. Das kongenitale nephrotische Syndrom vom finnischen Typ führt zum Beispiel zu Proteinurie und späterem Nierenversagen (Manski 2015).

1.2 Genomweite Assoziationsstudien zur Erforschung von Nierenerkrankungen

Laut der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie erleiden in Deutschland jährlich etwa 175 pro 100.000 Einwohner eine terminale Niereninsuffizienz (GFR <15ml/min/1,73m²) (DGfN Das Nierenportal : Daten und Fakten zur Nephrologie; Herold 2016) . Häufigste Ursachen dafür sind die diabetische Nephropathie, primäre und sekundäre Glomerulonephritiden, polyzystische Nierenerkrankungen, chronisch tubulo-interstitielle Erkrankungen und vaskuläre Nephropathien (Herold 2016). Neben Risikofaktoren wie Hypertonie, Diabetes und Nikotinabusus spielen auch genetische Faktoren eine Rolle bei Nierenerkrankungen (Herold

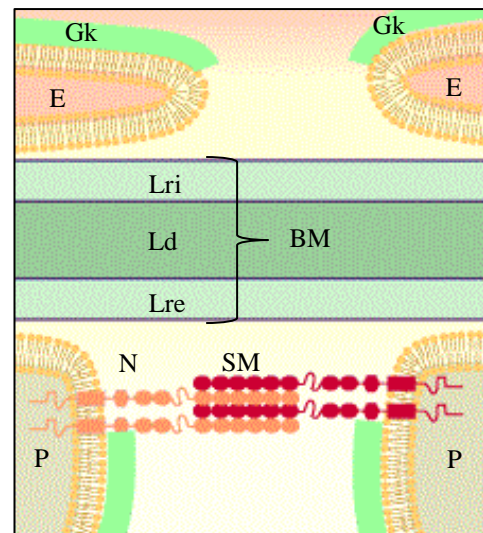


Abbildung 1.1: Die Filtrationsbarriere (verändert nach Département de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg).

Die Filtrationsbarriere besteht aus drei Komponenten: dem Endothel, der Basalmembran und der Schlitzmembran zwischen den Podozytenfortsätzen (Lüllmann-Rauch 2003). BM= Basalmembran; E= Endothelzelle; Gk= Glykokalix; Ld= Lamina densa; Lre= Lamina rara externa; Lri= Lamina rara interna; N= Nephrin; P=Podozytenfortsatz; SM= Schlitzmembran

2016; Hwang *et al.* 2014). Ein wichtiger Ansatz für die Früherkennung und Therapie ist daher die Erforschung von Genen, bei denen Mutationen ursächlich für Nephropathien sein können. Mithilfe genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) wurden Gene identifiziert, welche die Nierenfunktion beeinflussen könnten (Böger *et al.* 2011; Köttgen *et al.* 2009, 2010; Pattaro *et al.* 2012; Reznichenko *et al.* 2012). GWAS untersuchen an verschiedenen Genloki die DNA-Sequenz, um eine auffällige Häufigkeit einer Genveränderung bei einem bestimmten Phänotypen zu identifizieren (Lenk *et al.* 2014). Dabei werden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) als Marker für Gene genutzt (Hardy und Singleton 2009; Lenk *et al.* 2014; Manolio 2010). SNPs sind Varianten im Genom, die ge- und vererbt werden und bezeichnen Stellen im Genom, an denen mindestens 1% der Menschen ein anderes Nukleotid aufweisen (Lenk *et al.* 2014; Wikipedia 2017). Eine Assoziation zwischen einem SNP und einem Phänotypen, die sich durch Replikation bestätigen lässt, könnte auf einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Genlokus bzw. dem Gen, in dem oder in dessen Nähe der SNP zu finden ist, und dem Phänotypen hindeuten.

GWAS erreichen als Methode zur Untersuchung des menschlichen Genoms eine immer größere Bedeutung und konnten eine Vielzahl an Krankheiten, zum Beispiel Diabetes, Makuladegeneration und exfoliatives Glaukom, entzündliche Darmerkrankungen und verschiedene Tumoren, mit Genloki assoziieren, wodurch neue Einblicke in die Pathologie, aber auch Therapieansätze ermöglicht wurden (Hardy und Singleton 2009; Manolio 2010; Manolio *et al.* 2008). Hilfreich war dabei das „International HapMap Project“, welches die Erstellung einer genomweiten Datenbank mit Millionen von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) bewirkte (Frazer *et al.* 2007; International HapMap Consortium 2003, 2005).

Köttgen *et al.* (2010) führten eine Metaanalyse von GWAS-Daten von 67093 Menschen europäischer Herkunft hinsichtlich der Nierenfunktion und chronischer Niereninsuffizienz durch. Letztere wurde entsprechend der Leitlinie der National Kidney Foundation (Goolsby 2002) als eine glomeruläre Filtrationsrate von weniger als $60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ definiert. Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurde die GFR mithilfe der Modification-of-Diet-in-Renal-Disease-Formel (MDRD-Formel) anhand des Serumkreatinins und zur Elimination des Einflusses der Kreatininproduktion und -sekretion auch anhand des Cystatin c im Serum abgeschätzt. Neben fünf bekannten Genloki (Köttgen *et al.* 2009) konnten sie 23 neue Genloki bzw. entsprechende Gene identifizieren, von denen sich bei der Replikation dreizehn mit einer veränderten Nierenfunktion und sieben mit dem Kreatininmetabolismus assoziieren ließen. Die meisten der mit der Nierenfunktion assoziierten Gene konnten auch mit

chronischer Niereninsuffizienz assoziiert werden. Dazu gehörten die Gene *TFDP2*, *PRKAG2*, *PIP5K1B*, *DACHI* und *SLC7A9*. In den Untersuchungen zeigten sich diese Zusammenhänge unabhängig von einer Erkrankung an Diabetes mellitus oder arteriellem Hypertonus, welche die beiden wichtigsten Risikofaktoren für Nierenerkrankungen darstellen (Islam *et al.* 2009). Pattaro *et al.* (2012) berücksichtigten daher in ihrer Metaanalyse von GWAS-Daten von 130600 Menschen europäischer Herkunft neben Alter und Geschlecht auch das Vorliegen eines Diabetes mellitus sowie einer arteriellen Hypertonie. Sie identifizierten sechs neue Gene, die mit einer veränderten glomerulären Filtrationsrate assoziiert waren, darunter *MPPED2*. Der Knock-down dieses Gens in Zebrafischembryos führte zu einer veränderten Genexpression von *pax2a* und *nephrin*, welche als Nieren- bzw. Podozytenmarker gelten (Kramer-Zucker *et al.* 2005; The Company of Biologists Ltd 1998). Pattaro *et al.* (2012) konnten damit einen Einfluss von *MPPED2* auf die Podozytenentwicklung vermuten, ihre Untersuchungen ergaben allerdings keine Auffälligkeiten bezüglich der Clearance von fluoreszierenden Dextranen.

Anhand einer weiteren Metaanalyse von GWAS-Daten von 63153 Menschen europäischer Herkunft stellten Böger *et al.* (2011) eine Assoziation zwischen einem SNP im Gen *CUBN* und Albuminurie fest, welche sich vom Vorhandensein eines Diabetes mellitus unabhängig zeigte. Die Albuminausscheidung wurde dabei anhand des Albumin-Kreatinin-Quotienten im Urin bestimmt. Da Albuminurie laut der National Kidney Foundation ein frühes Zeichen für eine Nierenerkrankung sei (Keane und Eknoyan 1999), lag eine Assoziation zwischen dem identifizierten SNP und der glomerulären Filtrationsrate oder einer chronischen Niereninsuffizienz nahe. Diese konnte jedoch nicht gefunden werden (Böger *et al.* 2011; Köttgen *et al.* 2010; Reznichenko *et al.* 2012). Mittels einer GWAS von 1142 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz sowie 1186 Nierenspendern konnten Reznichenko *et al.* (2012) aber schließlich ein anderes SNP im *CUBN*-Gen mit terminaler Niereninsuffizienz assoziieren und damit doch einen Zusammenhang zwischen *CUBN* und der Nierenfunktion herstellen.

Die GWAS von Böger *et al.* (2011), Köttgen *et al.* (2010), Pattaro *et al.* (2012) und Reznichenko *et al.* (2012) identifizierten damit eine Reihe neuer Gene, die in der Pathogenese von Nierenerkrankungen eine Rolle spielen könnten.

1.3 Der *Drosophila*-Nephrzyt zur Validierung von Kandidatengen

In den in 1.2 beschriebenen Studien konnten insgesamt 25 Genloki mit einer veränderten Nierenfunktion assoziiert werden, wobei GWAS zwar eine Korrelation zwischen Genlokus und Phänotyp aufzeigen, aber keine Aussage über die Kausalität dieser Assoziation zulassen.

Um genauere Erkenntnisse über den Einfluss der Gene auf die Nierenfunktion zu erlangen, habe ich im Rahmen meiner Dissertation am Modell der *Drosophila melanogaster* die Orthologe von sieben der Gene, die in den in 1.2 beschriebenen GWAS als mit der Nierenfunktion zusammenhängend identifiziert wurden, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Morphologie und die Funktion der Nephrozyten untersucht. Unter den gleichen Aspekten habe ich mich zusätzlich mit der microRNA 210 (mir210) beschäftigt, welche nach Studien von Zaparty *et al.* am Lehrstuhl für molekulare und zelluläre Anatomie der Universität Regensburg unter Prof. Dr. Witzgall in den Glomeruli stark exprimiert wird.

Ich habe meine Untersuchungen an Garland-Nephrozyten von transgenen *Drosophila*-Larven im dritten Larvenstadium durchgeführt. Die Entwicklungsstadien teilen sich nach den beiden Häutungsvorgängen ein: Während ihres Wachstums muss die Larve sich zweimal häuten, da die Chitinhaut nur eine geringe Elastizität aufweist (Becker 1978).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen am Modell der *Drosophila melanogaster* können Hinweise auf eine vergleichbare Bedeutung der humanen Orthologe für den Filtrationsapparat der menschlichen Niere geben, da Nephrozyten aufgrund der Ähnlichkeiten hinsichtlich Entwicklung, Struktur und Funktion als Äquivalent der Podozyten gelten (Weavers *et al.* 2009).

1.4 Der Nephrozyt

In *Drosophila melanogaster* bilden Nephrozyten zusammen mit den malpighischen Gefäßen eine funktionelle Einheit, die durch Filtration der Hämolymphe für die Aufrechterhaltung der Körperhomöostase sorgt (Berridge und Oschman 1969; Bradley 1989; Cagan 2011; Harrison und Locke 1998; Kerkut und Gilbert 1985; O'Donnell *et al.* 2003; Weavers *et al.* 2009).

Während in Vertebraten die Glomeruli mit den Podozyten an das tubuläre System angeschlossen sind, liegen die Nephrozyten in *Drosophila* einzeln, häufig aber mit Ausbildung von Zellkontakten zu benachbarten Nephrozyten, in der Hämolymphe im Fliegenkörper ohne

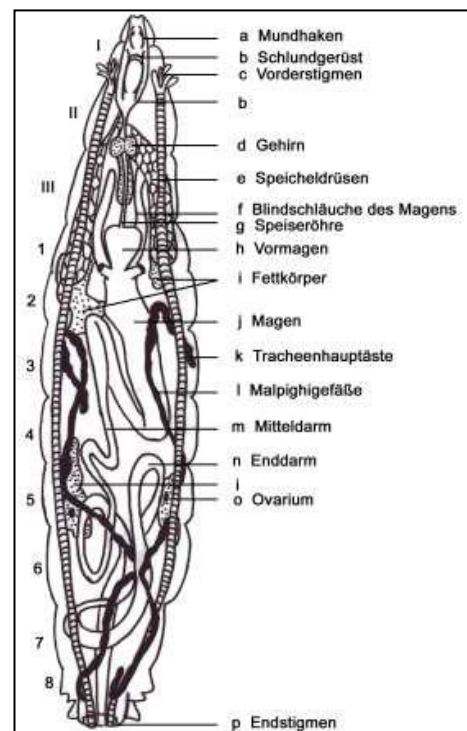


Abbildung 1.2: Anatomie der Larve von *Drosophila melanogaster* (Mainx 1949).
Die Malpighigefäße münden in den Enddarm.

Kontakt zu den malpighischen Gefäßen, die funktionell als wichtigste Exkretionsorgane dem menschlichen Tubulusystem entsprechen (Aggarwal und King 1967; Cagan 2011; Weavers *et al.* 2009). Die blindgeschlossenen Endabschnitte der malpighischen Gefäße weisen ein einschichtiges, stark gefaltetes Epithel auf. Durch dieses diffundiert die Hämolymphe, welche die Stoffwechselprodukte enthält. Es wird der Primärharn gebildet, welcher in die langen Hauptstücke gelangt. Dort werden noch verwertbare Stoffe und Wasser reabsorbiert und der entstehende Sekundärharn wird an den Darm abgegeben (Dettner und Peters 2010) (siehe Abbildung 1.2).

Durch das offene Kreislaufsystem in *Drosophila* bewegt sich die Hämolymphe frei durch die Körperhöhle und wird dabei an den Nephrozyten gefiltert, wobei es zwei verschiedene Nephrozyten-Populationen gibt: die Garland-Nephrozyten, die in Gruppen von 20-30 Nephrozyten in einer kranzförmigen Formation um den Ösophagus herum liegen (siehe Abbildung 1.3), und die perikardialen

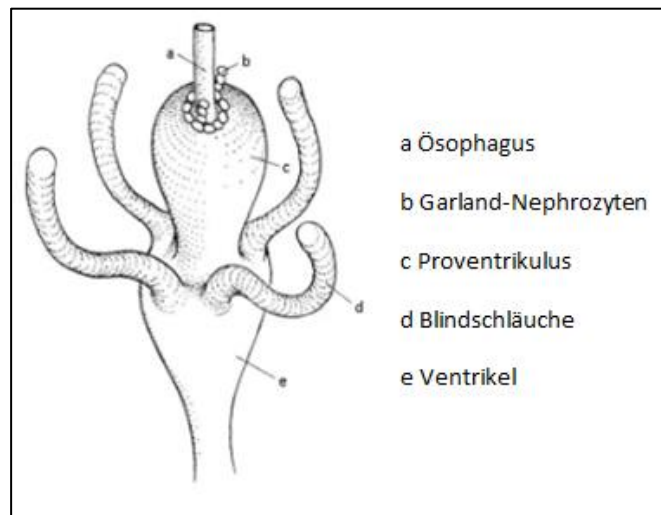


Abbildung 1.3: Partielles Schema des Verdauungstraktes mit Garland-Nephrozyten (verändert nach Aggarwal und King 1967).

Nephrozyten, welche mit den das Herz umgebenden, myoepithelialen Gefäßzellen assoziiert sind (Aggarwal und King 1967; Crossley 1972; Mainx 1949; Wessing 1965).

Drosophila-Nephrozyten differenzieren sich, wie Podozyten auch, aus epithelialen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs (Campbell *et al.* 2003; Mandal *et al.* 2004). Der Nephrozyt ist eine eiförmige Zelle mit einem Durchmesser von etwa 10-20µm. Er ist von einer Basalmembran umgeben (Weavers *et al.* 2009) (siehe Abbildung 1.5).

Im EM-Bild lassen sich zwei Bereiche voneinander abgrenzen: das Zellinnere und eine kortikale Randzone (siehe Abbildung 1.4).

Im Zellinneren befinden sich, wie in Abbildung 1.4 gut zu erkennen, meist zwei Nuklei, da der Nephrozyt wahrscheinlich durch Verschmelzung zweier Vorläuferzellen entsteht, und die Zellorganellen (Zhuang *et al.* 2009). Dazu gehören das endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, Lysosomen, Mitochondrien, Peroxisomen und Vesikel (siehe Abbildung 1.4).

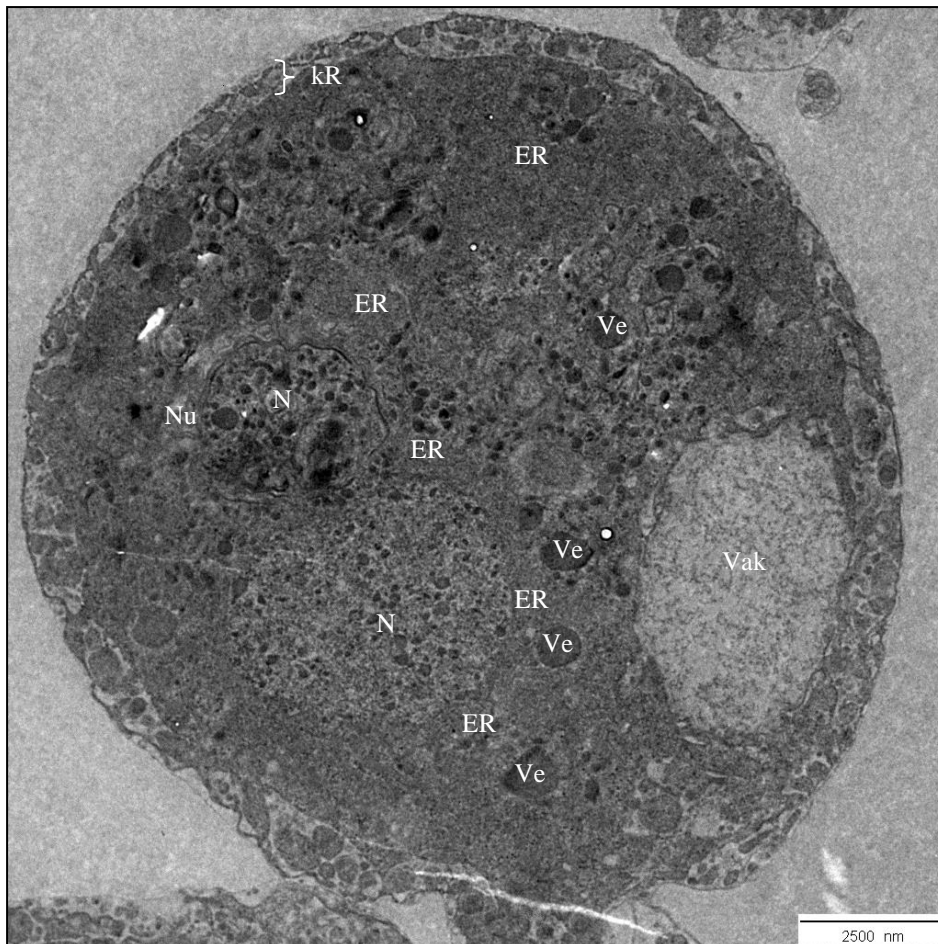


Abbildung 1.4: Elektronenmikroskopisches Bild eines Nephrozyten.

ER= endoplasmatisches Retikulum; N= Nukleus (unterschiedlich angeschnitten); kR= kortikale Randzone; Nu= Nukleolus; Vak= Vakuole; Ve= Vesikel

In der kortikalen Randzone entstehen durch die starke Einfaltung der Plasmamembran Kanäle und Lakunen, deren Eingänge schmale Schlitz von etwa 30nm darstellen. Zwischen den flankierenden Fußfortsätzen, welche denen der Podozyten entsprechen, sind einzelne oder doppelte Filamente verspannt, die das Nephrozytendiaphragma bilden, das Äquivalent der Schlitzmembran (Burghardt *et al.* 2015; Weavers *et al.* 2009) (siehe Abbildung 1.5).

Das Nephrozytendiaphragma enthält Orthologe der Schlitzmembran-Proteine

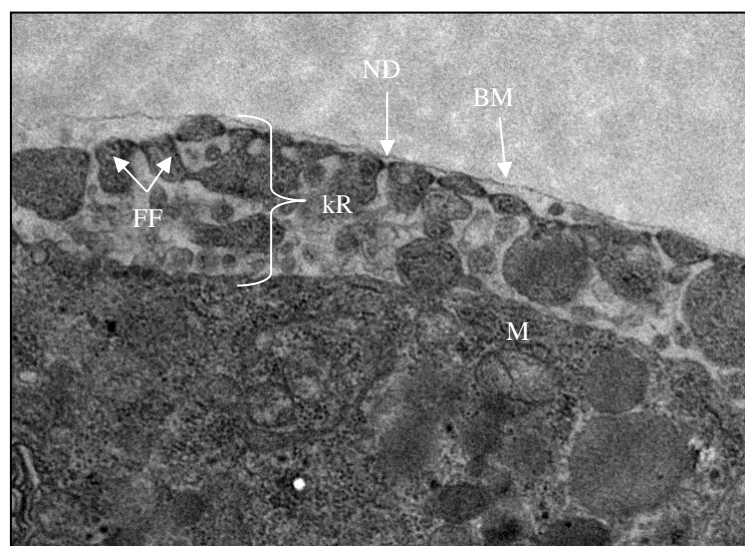


Abbildung 1.5: Randzonen-Abschnitt eines Nephrozyten (Elektronenmikroskopisches Bild).

BM= Basalmembran; FF= Fußfortsätze; kR= kortikale Randzone; M= Mitochondrium; ND= Nephrozytendiaphragma

Nephrin und NEPH1 (Weavers *et al.* 2009). Während ein Nephrin-ähnliches Protein von den Genen *sticks and stones (sns)* und *hibris (hbs)* kodiert wird, kodieren *dumbfounded (duf, kirre)* und *roughest (rst)* für ein NEPH1-Homolog. Es konnte analog zur Koexpression von Nephrin und NEPH1 in Podozyten (Barletta *et al.* 2003) eine lebenslange Koexpression der von *sns* und *kirre* kodierten Proteine in Nephrozyten nachgewiesen werden (Weavers *et al.* 2009). Das Fehlen eines Proteins führt zu Verlust, Reduktion oder Misslokation des anderen (Weavers *et al.* 2009). Weavers *et al.* (2009) stellten bei Nephrozyten mit *sns*- oder *kirre*-Mutation fehlende Diaphragmata und in der Regel auch den Verlust der Lakunenstruktur fest und schlussfolgerten daraus, dass die Diaphragmata möglicherweise die Fußfortsätze stabilisieren könnten.

Das Diaphragma bildet zusammen mit der Basalmembran die größen- und ladungsselektive Filtrationsbarriere des Nephrozyten für die in der Hämolymphe enthaltenen Stoffe (Harrison und Locke 1998; Kerkut und Gilbert 1985; Weavers *et al.* 2009). Über rezeptorvermittelte Endozytose oder ähnliche Mechanismen gelangen die filtrierte Stoffe von dem Lakunensystem in das Zellinnere, wo sie abgebaut (z.B. Proteine) oder lebenslang gespeichert werden (z.B. Silbernitrat) (Cagan 2011; Vijayakrishnan *et al.* 2009; Weavers *et al.* 2009; Zhang *et al.* 2013b; Zhuang *et al.* 2009). Die Randzone stellt damit den für die Nephrozytenfunktion wichtigen Bereich dar und ohne die charakteristische Struktur verlieren Nephrozyten ihre Fähigkeit zur Filtration und Entgiftung. Die glatte Oberfläche der mutierten Nephrozyten gleicht dem Phänotyp von Podozyten ohne Nephrin und NEPH1, welcher zu Proteinurie führt (Donoviel *et al.* 2001; Patrakka *et al.* 2000).

Zhang *et al.* (2013a) konnten zeigen, dass die Rolle der Proteinreabsorption bei den *Drosophila*-Nephrozyten vor allem in der Elimination von Toxinen aus der Hämolymphe besteht und dass Defekte im Endozytose-System zu einer verringerten Überlebensdauer der Fliegen unter toxischen Bedingungen führten. Nachdem die Ähnlichkeiten zwischen Nephrozyten und Podozyten schon länger bekannt waren (Weavers *et al.* 2009), zogen Zhang *et al.* (2013a) erstmals auch den Vergleich zu proximalen Tubuluszellen und deren Proteinreabsorptionsfunktion. Den malpighischen Gefäßen sprachen sie dabei die Funktion der Henle-Schleife und distalen Tubuli zu, welche vor allem in der Salzreabsorption und Wasserresorption besteht.

1.5. Genregulation

1.5.1 UAS/GAL4-System

Um die Bedeutung der sieben Kandidaten-Gene in den Garland-Nephrozyten zu untersuchen, wurde deren Expression jeweils in einem *Drosophila*-Stamm herunterreguliert. Dies geschah mittels RNA-Interferenz, einem Wirkmechanismus, der von interferierender RNA abhängt.

Die Expression der interferierenden RNA in den Fliegen wurde in meinen Experimenten mittels des UAS/GAL4-Systems erreicht. Dazu wurden zwei verschiedene *Drosophila*-Stämme miteinander gekreuzt (siehe Abbildung 1.6).

Der eine exprimierte den hefespezifischen Transkriptionsfaktor GAL4. Da dieser unter der Kontrolle des Garland-Nephrozyten-spezifischen Promotors $ns::GAL4$ steht, wurde das Protein GAL4 allerdings auch nur in den Garland-Nephrozyten synthetisiert.

Im anderen Stamm befand sich vor einem Zielgen die Upstream Activating Sequenz (UAS). Das Zielgen kodierte in meinem Versuch für die interferierende RNA, die jeweils spezifisch für eins der Gene war, die untersucht werden sollten.

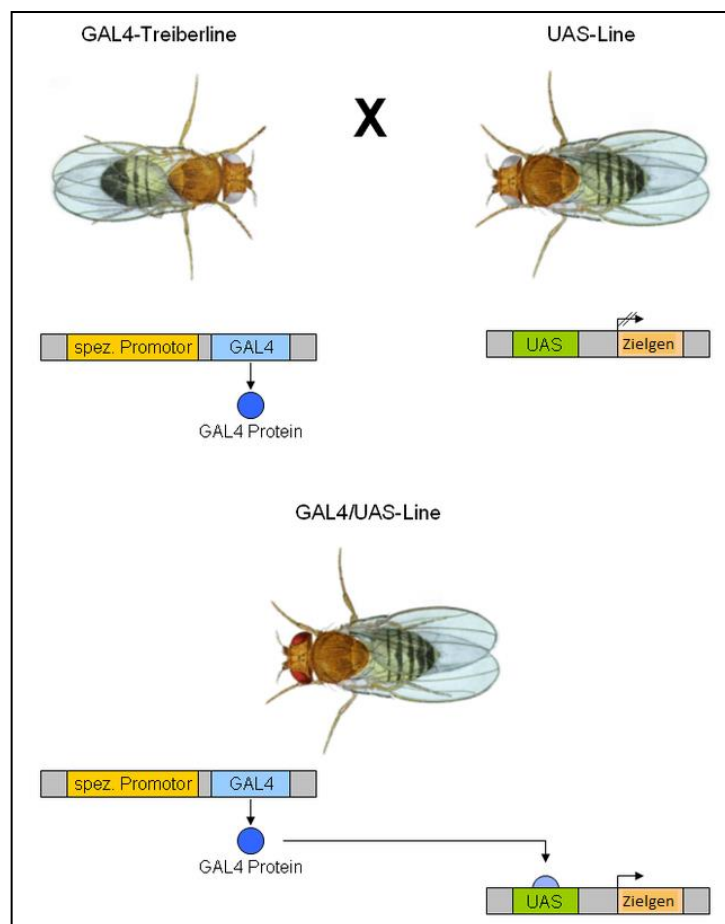


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau eines UAS/GAL4-Systems (Wikipedia 2015).

Die GAL4-Treiberlinie wird mit der UAS-Linie gekreuzt, sodass das durch die UAS regulierte Gen der jeweiligen interferierenden RNA exprimiert wird.

In den Garland-Nephrozyten der Nachkommen der ersten Generation band nun das Protein GAL4 spezifisch an die UAS, wodurch das downstream gelegene Zielgen aktiviert wurde. Dadurch wurde in mehreren Schritten die interferierende RNA gebildet, die die Expression eines Gens herunterregulierte.

1.5.2 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz spielt eine wichtige Rolle bei der physiologischen Regulation der Genexpression. Es ist ein von interferierender RNA vermittelter Mechanismus mit dem Ziel, die Umsetzung einer genetischen Information zu verhindern. Dies wird durch die Blockade oder den spezifischen Abbau von mRNA (messenger RNA) erreicht. Bei veränderten Umständen, die veränderte Expressionsmuster von endogenen Genen bewirken oder erfordern, kann die Silencing-Maschinerie durch Expression neuer und Konzentrationsverdünnung bzw. Entfernung alter interferierender RNA dementsprechend angepasst werden (Carthew und Sontheimer 2009).

Interferierende RNAs sind doppelsträngige (ds), kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von 20-30bp: vor allem miRNAs (microRNAs) und siRNAs (small interfering RNAs) in den Körper-, und piRNAs (piwi-interacting RNAs) in den Keimzellen (Carthew und Sontheimer 2009; Kim 2006). Für fast alle *Drosophila*-Gene sind bereits Stämme erhältlich, welche unter dem UAS-Promoter induzierbar RNA-Interferenz Sequenzen exprimieren.

miRNAs

MiRNAs regulieren die Genexpression auf der posttranskriptionellen Ebene über verschiedene Mechanismen, zum Beispiel die RNA-Interferenz (Ambros 2003; Bartel 2004; He und Hannon 2004; Lai 2003). Etwa 30-50% aller humanen mRNAs werden so beeinflusst, wobei eine miRNA Hunderte von Genen regulieren kann (Carthew und Sontheimer 2009; Huntzinger und Izaurralde 2011; Krol *et al.* 2010; Röther und Meister 2011). MiRNAs haben eine Wirkung auf die Entwicklung, Differenzierung, Proliferation, Apoptose und die Funktion von Zellen, sodass Dysregulationen der miRNA-Expression zu schwerwiegenden Fehlentwicklungen im Organismus führen können (Röther und Meister 2011). Entsprechend korrelieren die miRNA-Expressions-Profile häufig mit dem Krankheitsstatus und können daher als neue Biomarker für die Diagnose genutzt werden (Farazi *et al.* 2013; Nana-Sinkam und Croce 2010).

MicroRNAs sind durch die genomische DNA kodiert und die Transkription der miRNA-kodierenden Genbereiche erfolgt im Zellkern durch die RNA-Polymerase II (Cai *et al.* 2004; Lee *et al.* 2004). Es entsteht ein RNA-Einzelstrang, der sich wegen einer großen Zahl palindromischer Abschnitte zu einer charakteristischen Sekundärstruktur faltet: Die so entstandene pri-miRNA (primäre miRNA) besteht aus einem doppelsträngigen Stamm aus etwa 33 Basenpaaren (bp), einem terminalen Loop und zwei flankierenden, unstrukturierten, einzelsträngigen Segmenten (Denli *et al.* 2004; Gregory *et al.* 2004; Han *et al.* 2004;

Landthaler *et al.* 2004; Lee *et al.* 2003; Liu *et al.* 2008). Sie ist 5' capped, gespliced und polyadenyliert (Röther und Meister 2011).

Als nächstes wird die Stem-Loop-Struktur von einem Mikroprozessor-Komplex herausgeschnitten, sodass die etwa 70-Nukleotid-lange, haarnadelförmige („hairpin-like“) pre-miRNA (Vorläufer-miRNA) entsteht.

Neben dem klassischen Mikroprozessor-abhängigen gibt es auch noch einen alternativen Weg, bei dem eine bestimmte Unterklasse der pre-miRNAs entsteht: die Mirtrons (pre-miRNA/Introns). Dabei werden durch Splicen der pri-miRNA Introns frei, die die strukturellen Kennzeichen der pre-miRNA aufweisen und entsprechend weiter prozessiert werden (Berezikov *et al.* 2007; Liu *et al.* 2008; Okamura *et al.* 2007; Ruby *et al.* 2007).

Die pre-miRNA wird in tierischen Zellen von Exportin5 in Anwesenheit von Ran-GTP (Ras-related nuclear protein) als Kofaktor über Kernporen der Kernmembran aktiv in das Zytoplasma transportiert.

Im Zytoplasma entsteht dann, wie in Abbildung 1.7 dargestellt, durch Entfernung des terminalen Loops durch die Endonuklease Dicer die etwa 22bp-lange, reife miRNA-Duplex (Bartel 2004; Bernstein *et al.* 2001). Dicer sind eine Klasse großer RNaseIII-Enzyme

(Carthew und Sontheimer 2009).

Während der Mensch nur ein Dicer-Gen besitzt und die Dicer-Endonuklease im Komplex mit dem HIV transactivating response RNA-binding Protein (TRBP) und dem Ago2-Protein daher für die Synthese sowohl von miRNA als auch siRNA verantwortlich ist, exprimiert *Drosophila* zwei verschiedene Dicer (MacRae *et al.* 2008). Für das Schneiden der pre-miRNA ist Dicer1 in Interaktion mit dem dsRBD(doppelsträngige-RNA-Bindedomäne)-Protein Loquacious zuständig. Dicer 2 ist an der siRNA-Bildung beteiligt (Carthew und Sontheimer 2009; Röther und Meister 2011; Tomari und Zamore 2005).

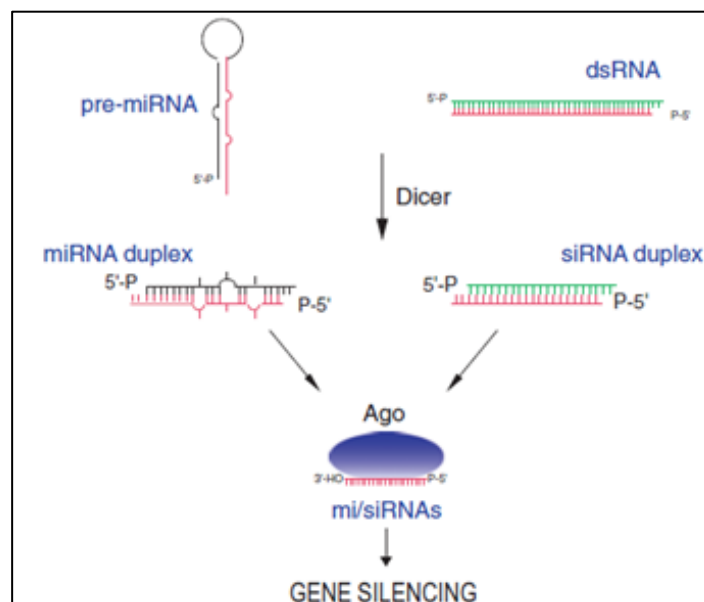


Abbildung 1.7: Prozessierung der pre-miRNA (Liu *et al.* 2008). Aus der pre-miRNA (bzw. dsRNA) entsteht durch Dicer die miRNA-Duplex (bzw. siRNA-Duplex) und anschließend der RNA-induzierte Silencing Komplex (RISC).

siRNA

SiRNAs sind 21-23bp lang und haben wie miRNA jeweils zwei 3'-endständig überstehende Nukleotide (Röther und Meister 2011). Sie sind allerdings bezüglich ihrer Enden viel heterogener als miRNA (Carthew und Sontheimer 2009). Sie werden aus einem langen, perfekt gepaarten dsRNA-Molekül gebildet, welches die menschliche Dicer-Endonuklease bzw. Dicer2 in *Drosophila* in Interaktion mit dem dsRBD-Protein R2D2 (exogene siRNA) oder einer alternativen Form von Loquacious (endogene siRNA) spaltet (siehe Abbildung 1.7) (Hartig et al. 2009; Liu et al. 2003; Mello und Conte 2004; Miyoshi et al. 2010; Tomari et al. 2004; Tomari und Zamore 2005; Zhou et al. 2009). Außerdem kann siRNA auch aus transposablen Elementen, heterochromatischen Regionen, konvergenten mRNA-Transkripten und hairpin-RNAs entstehen (Czech et al. 2008; Ghildiyal et al. 2008; Kawamura et al. 2008; Okamura et al. 2008). SiRNAs können entweder in der Zelle synthetisiert (endogene siRNA) oder von außerhalb in die Zelle eingeleitet werden (exogene siRNA) (Carthew und Sontheimer 2009; Golden et al. 2008; Röther und Meister 2011). Da die meisten siRNAs vor allem auf den Locus wirken, aus dem sie entstehen, sind an der RNA-Interferenz des eigenen Genoms vor allem die endogenen siRNAs beteiligt, während exogene siRNAs hauptsächlich der Verteidigung gegen Viren dienen (Haasnoot et al. 2007; Sontheimer und Carthew 2005; Carthew und Sontheimer 2009).

Ablauf der RNA-Interferenz

Bildung des RISC

Grundlage der RNA-Interferenz ist die im Zytosol stattfindende „RISC Assembly“, die Bildung eines RNA-induzierten Silencing Komplexes (RISC), der aus RNA und Proteinen besteht (Carthew und Sontheimer 2009; Eulalio et al. 2007; Meister und Tuschl 2004; Tomari und Zamore 2005). Die genauen Komponenten variieren je nach interferierender RNA und RNA-Interferenzweg, sowie auch nach Spezies.

Bei dem Proteinanteil handelt es sich hauptsächlich um Ago-Proteine. Diese sind etwa 95kDa schwer und gehören der Argonauten-Superfamilie an (Carthew und Sontheimer 2009; Liu et al. 2008), deren Mitglieder, wie in Abbildung 1.8

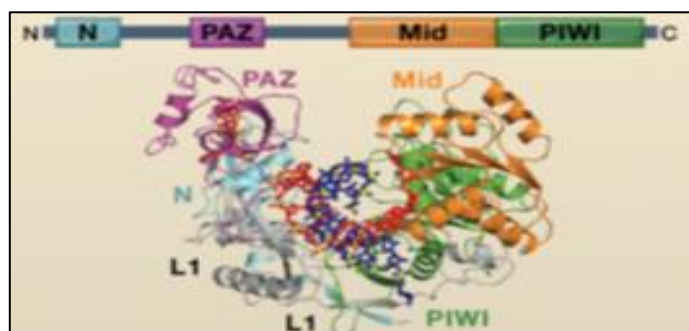


Abbildung 1.8: Schemata der Domänenabfolge und Struktur der Ago-Proteine (Carthew und Sontheimer 2009).

dargestellt, durch vier Domänen charakterisiert werden: die PAZ-, die PIWI-, die N- und die Mittel-Domäne (Ma *et al.* 2005; Parker *et al.* 2004, 2005; Song *et al.* 2004; Yuan *et al.* 2005). Die PAZ-Domäne besitzt eine RNA-3'-Terminus-Bindeaktivität, wodurch der RNA-Strang im RISC gebunden wird (Carthew und Sontheimer 2009; Parker *et al.* 2005; Song *et al.* 2004).

Abbildung 1.9 stellt die Genese des RISCs dar: Nachdem die siRNA-Duplexe generiert wurden, interagieren sie mit einem RISC loading Komplex (RLC), dessen Kern in *Drosophila* von Dicer2 und dem dsRBD-Protein R2D2 gebildet wird (Liu *et al.* 2003; Tomari *et al.* 2004; Tomari und Zamore 2005). Das Dicer2-R2D2-Heterodimer lädt die siRNA-Duplex auf das Ago2-Protein (Forstemann *et al.* 2007; Tomari *et al.* 2007). MiRNA-Duplexe, die statt weitreichender Komplementarität typischerweise viele Fehlpaarungen aufweisen, haben nur eine geringe Affinität zu R2D2 (Forstemann *et al.* 2007; Tomari *et al.* 2007). Man nimmt an, dass sie direkt von Dicer1 auf das Ago1-Protein übertragen werden

(Carthew und Sontheimer 2009). Die miRNA- bzw. siRNA-Duplex bildet zusammen mit dem jeweiligen Ago-Protein den pre-RISC (Vorläufer-RISC).

Nun wird die miRNA- bzw. siRNA-Duplex entwunden, die beiden Stränge voneinander getrennt (Carthew und Sontheimer 2009) und nach der thermodynamischen Asymmetrie-Regel ein Führungsstrang selektiert, welcher mit dem Ago-Protein den RISC bildet (Kim 2005; Liu *et al.* 2008; Matranga *et al.* 2005; Miyoshi *et al.* 2005; Rand *et al.* 2005; Tomari und Zamore 2005).

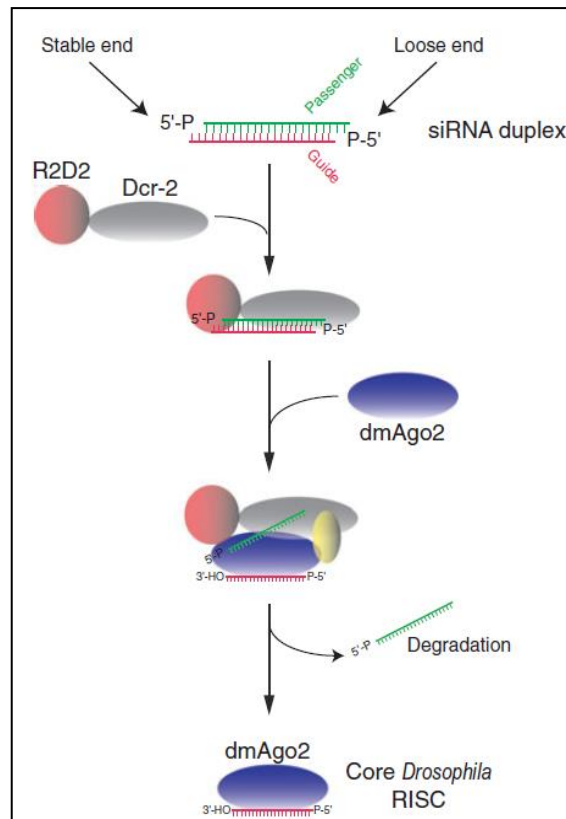


Abbildung 1.9: Entstehung des RNA-induzierten Silencing Komplexes (Liu *et al.* 2008).

Durch Interaktion mit dem RISC-loading Komplex wird die Duplex auf ein Ago-Protein geladen, entwunden und die beiden Stränge werden voneinander getrennt. Der Führungsstrang bildet zusammen mit dem Ago-Protein den RISC.

Funktion des RISC

Nach Bildung des RISC bindet die miRNA bzw. siRNA spezifisch eine komplementäre mRNA (Carthew und Sontheimer 2009). MiRNAs binden ihre mRNA meist unter Ausbildung vieler Fehlpaarungen und Wölbungen, wohingegen SiRNA/mRNA-Doppelstränge in der Regel perfekt gepaart sind (Carthew und Sontheimer 2009). Der Grad der Komplementarität zwischen RISC und der Ziel-mRNA ist entscheidend dafür, auf welchem Weg es zum Silencing der mRNA kommt (Carthew und Sontheimer 2009; Liu *et al.* 2008).

Bei perfekter Basenpaarung, die wie beschrieben fast ausschließlich bei siRNA auftritt, kommt es zum endonukleolytischen Abbau durch Ago2 (siehe Abbildung 1.10), durch den ein 5' Monophosphat-terminales und ein 3' Hydroxyl-terminales Fragment entstehen, die von dem RISC dissoziieren und von Exonukleasen abgebaut werden (Elbashir *et al.* 2001; Hutvagner und Zamore 2002; Liu *et al.* 2004; Martinez und Tuschl 2004; Orban und Izaurralde 2005; Schwarz *et al.* 2004).

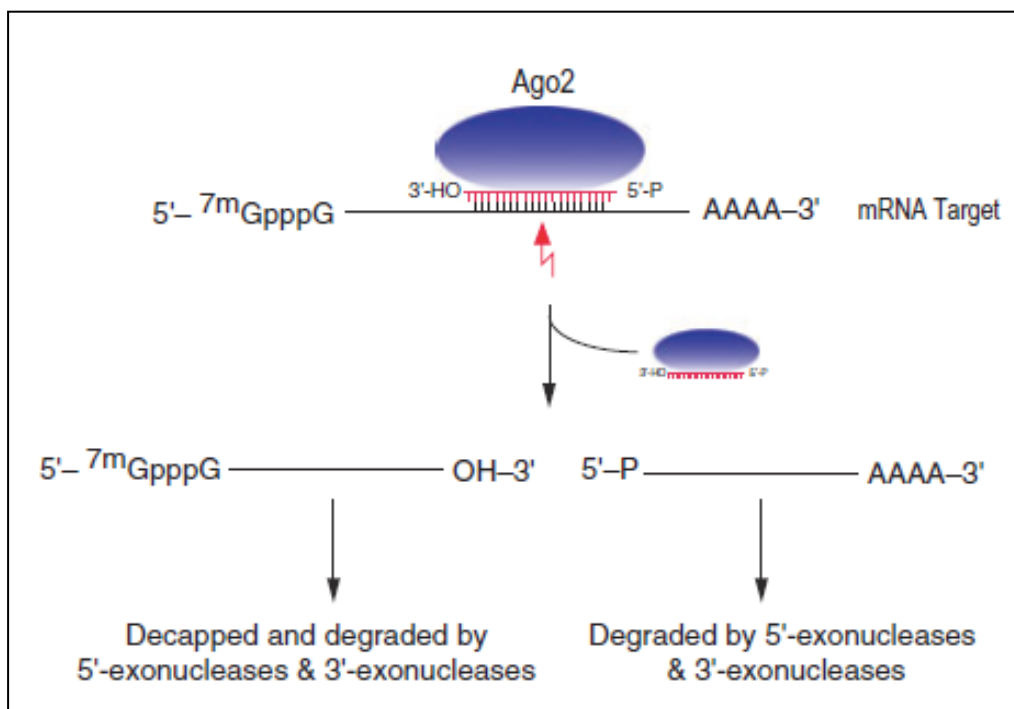


Abbildung 1.10: Abbau der mRNA nach Bindung durch den RISC (Liu *et al.* 2008).

Bei perfekter Basenpaarung zwischen mRNA und dem RISC wird die mRNA zunächst endonukleolytisch durch Ago2 und anschließend von Exonukleasen abgebaut.

Da Fehlpaarungen im oder in der Nähe des Doppelstrang-Zentrums einen endonukleolytischen Abbau verhindern, tritt bei RISCs, die miRNA enthalten, ein anderer Repressionsweg auf: die Inhibition der Translation vor allem zum Zeitpunkt der Initiation (Ambros 2004; Carthew und Sontheimer 2009; Filipowicz *et al.* 2005; Gebauer und Hentze 2004; Richter und Sonenberg 2005). Die Initiation beginnt mit der Bindung des eukaryotischen Initiationsfaktors (eIF) 4E an das 5' terminale 7 Methyl-Guanosin-Cap (m7G)

der mRNA. Ein weiterer eukaryotischer Initiationsfaktor, eIF4G, interagiert nun einerseits mit eIF4E und andererseits mit dem polyA-bindenden Protein (PABP) am polyadenylierten Ende. Dies führt zur Bildung einer zirkularisierten mRNA, was die Translationseffizienz verbessert und regulatorischen Sequenzen innerhalb der 3'UTR (untranslatierte Region) erlaubt, die Translationsinitiation zu beeinflussen. Nach Assoziation der 40S- und der 60S-Ribosomuntereinheit am AUG-Codon startet die Proteinsynthese (Carthew und Sontheimer 2009; Richter und Sonenberg 2005). Die genauen Details, bei welchem Schritt der RISC ansetzt, sind noch unklar. Es gibt verschiedene mögliche Mechanismen, die in Abbildung 1.11 dargestellt sind:

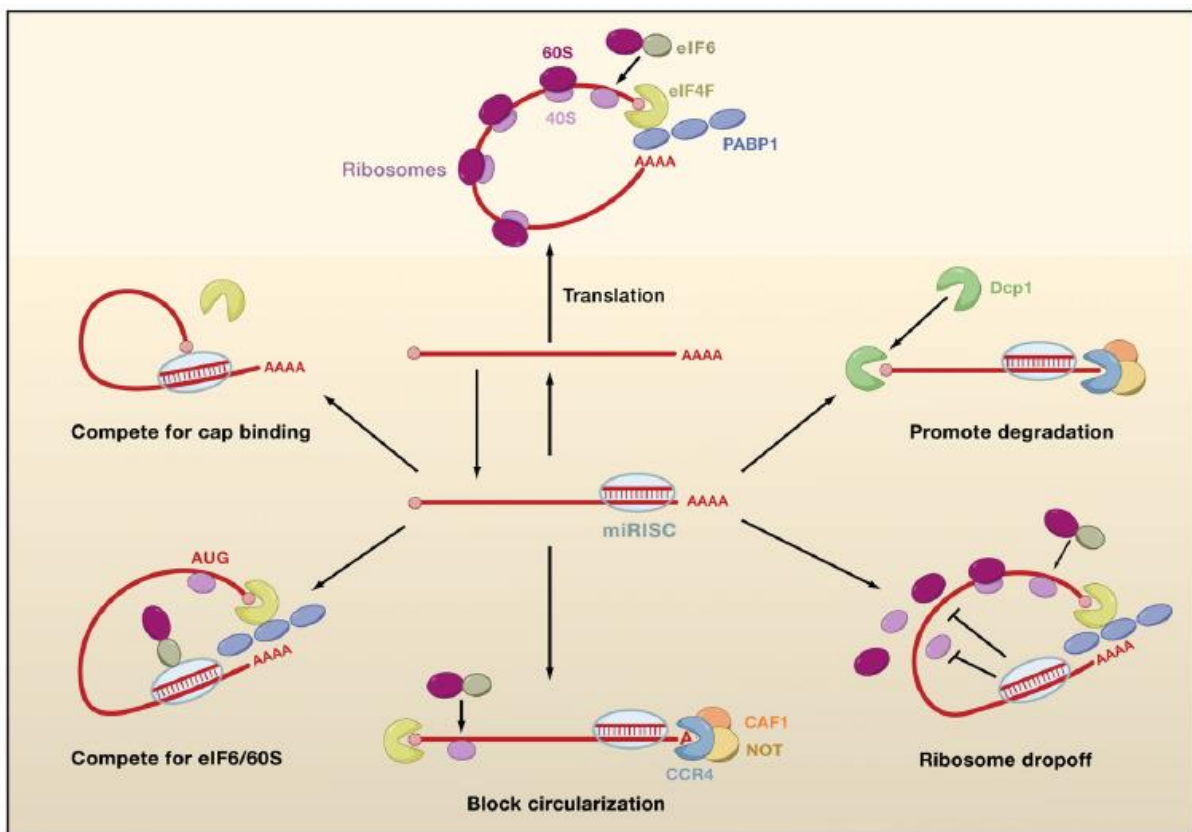


Abbildung 1.11: Gen-Silencing durch den RISC (Carthew und Sontheimer 2009).

Der RISC verhindert die Translation der gebundenen mRNA durch Besetzen der Cap-bindenden Domäne (oben links), Verhinderung der Zusammensetzung (unten links) oder frühzeitige Dissoziation eines Ribosoms (unten rechts), Verhinderung der Zirkularisierung der mRNA (unten Mitte) und Förderung des Abbaus der mRNA (oben rechts).

1. Die Mitteldomäne der Ago-Proteine hat Sequenzähnlichkeiten zur Cap-bindenden Domäne von eIF4E. Statt der zwei wesentlichen Tryptophanreste besitzen sie zwei Phenylalaninreste, mit denen der RISC statt eIF4E an das m⁷G-Cap binden kann und so die Translationsinitiation verhindert (Kiriakidou *et al.* 2007).
2. Das menschliche Ago2-Protein interagiert mit eIF6 und der 60S-ribosomalen Untereinheit und verhindert die Entstehung eines Ribosoms an der mRNA (Chendrimada *et al.* 2007).

3. Das Ago1-Protein des RISCs kann an das Aminoende von GW182 binden (Behm-Ansmant *et al.* 2006). GW182-Proteine fördern die Deadenylierung der mRNA, wodurch diese sich nicht zu einer kreisförmigen Struktur formen kann, sodass sie instabiler und schneller abgebaut wird (Carthew und Sontheimer 2009; Djuranovic *et al.* 2011; Eulalio *et al.* 2008; Huntzinger und Izaurralde 2011; Izaurralde 2014).

4. Eine weitere Möglichkeit ist die Hemmung der Elongation durch eine RISC-induzierte frühzeitige Dissoziation der Ribosomen von der mRNA (Petersen *et al.* 2006). Die genauen Details sind noch nicht bekannt.

5. Letztendlich können mRNAs nach Bindung des RISC als Folge von Deadenylierung, Decapping und exonukleolytischem Verdau schneller abgebaut werden (Behm-Ansmant *et al.* 2006; Giraldez *et al.* 2006; Wu *et al.* 2006b). Es ist noch unklar, warum manche mRNAs abgebaut werden und andere nicht. Anzahl, Typ und Position der Fehlpaarungen zwischen miRNA und mRNA könnten dabei laut Aleman *et al.* (2007) eine wichtige Rolle spielen.

Neben der beschriebenen posttranskriptionellen Silencing-Wege gibt es auch noch die Wirkung der Transkriptionshemmung.

Diese wird durch den RITS-Komplex (RNA-induzierter transkriptioneller Silencing-Komplex) vermittelt, der eine Variante des RISC darstellt und siRNA enthält (Lippman und Martienssen 2004; Verdel *et al.* 2004). Er bewirkt, dass das Chromatin eine kompaktere Form annimmt und dann nicht mehr für die Transkription zugänglich ist (Lippman und Martienssen 2004) (siehe Abbildung 1.12).

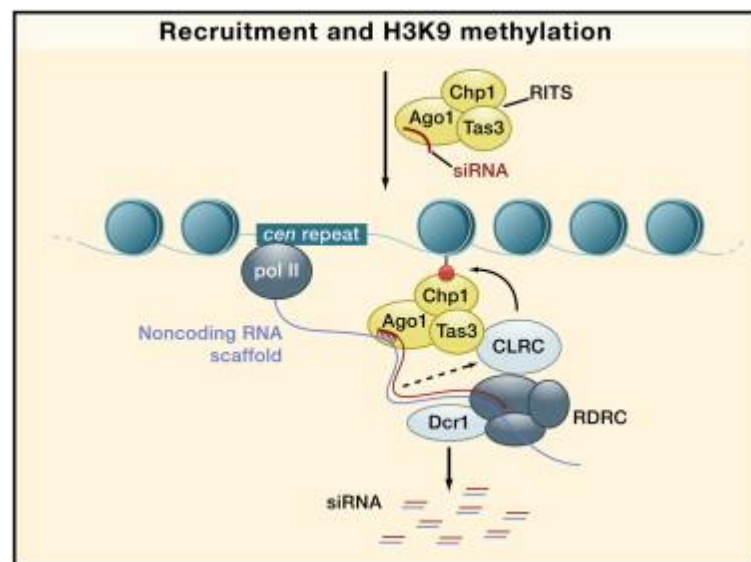


Abbildung 1.12: Rekrutierung und H3K9-Methylierung (Cell Press 2012).

In *Schizosaccharomyces pombe* besteht der RITS-Komplex aus siRNA und den Proteinen Ago1, tas3 und Chp1 (Verdel *et al.* 2004). Die Assoziation des RITS führt zur Methylierung von Histon 3 an Lysin durch den Clr4-Methyltransferase-Komplex (ClrC). Dadurch wird die Heterochromatinform stabilisiert und so die Transkription verhindert (Ishida *et al.* 2012; Lippman und Martienssen 2004; Volpe *et al.* 2002). Außerdem wird der RNA-Polymerase-Komplex (RDRIC) aktiviert, welcher die Potenz der RNA-Interferenz steigert, indem er sekundäre siRNAs regeneriert, sodass die Repression verstärkt wird und länger erhalten bleibt (Carthew und Sontheimer 2009; Sugiyama *et al.* 2005).

1.6 Die Kandidatengene

1.6.1 *AMPK γ*

Das Protein-kodierende Gen *AMPK γ* entspricht dem Gen *SNF4A γ* und ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* des menschlichen Gens *PRKAG2* (FlyBase Gene Report: Dmel\SNF4A γ).

AMPK γ ist auf dem Führungsstrang des rechten Arms von Chromosom 3 von Stelle 21140,739 bis 21214,269 lokalisiert (siehe Abbildung 1.13) (FlyBase Gene Report: Dmel\SNF4A γ).

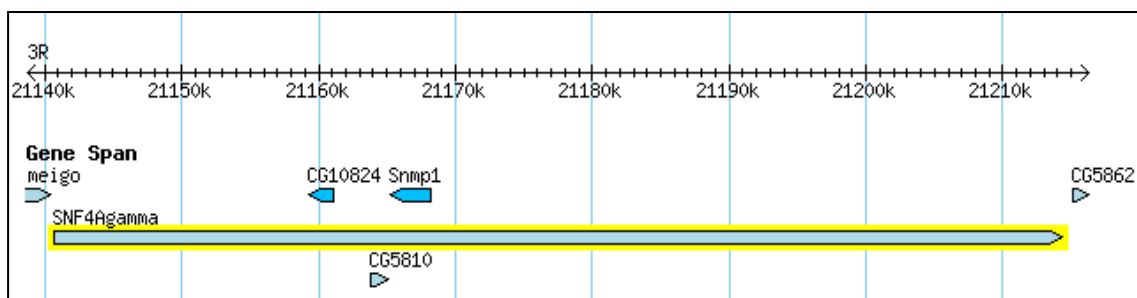


Abbildung 1.13: Lokalisation von *AMPK γ* (FlyBase Gene Report: Dmel\SNF4A γ ; FlyBase Web Development Group).

AMPK γ kodiert für die γ -Untereinheit der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK). Diese ist ein heterotrimerer Komplex, bestehend aus einer katalytischen α -Untereinheit und den zwei regulatorischen Untereinheiten β und γ (Riek *et al.* 2008). Menschen weisen zwei α -, zwei β - und drei γ -Isoformen auf, während bei *Drosophila* jede Untereinheit von nur einem Gen kodiert wird (Birk und Wojtaszewski 2006; Pan und Hardie 2002). Die Koexpression der drei Untereinheiten ist essentiell für die Bildung und Funktion der Proteinkinase (Dyck *et al.* 1996; Woods *et al.* 1996).

Die AMPK wird ihrem Namen entsprechend durch hohe Adenosinmonophosphat(AMP)-Level in der Zelle aktiviert (Stein *et al.* 2000; Hawley *et al.* 1995, 1996). Situationen, in denen die Adenosintriphosphat(ATP)-Produktion verhindert ist, wie Hypoxie oder Ischämie, Hitzeschock, metabolische Vergiftung oder Glukosedeprievation, sowie Prozesse, die den ATP-Verbrauch beschleunigen, zum Beispiel die Muskelarbeit, führen daher zu einer erhöhten Aktivität der AMPK (Corton *et al.* 1994; Marsin *et al.* 2000; Salt *et al.* 1998; Winder und Hardie 1996). Für die Aktivierung der Kinasefunktion ist die Struktur der AMPK entscheidend (Moffat und Harper 2010). Die γ -Untereinheit weist vier Cystathion- β -sheet(CBS)-Sequenzen auf (Townley und Shapiro 2007; Xiao *et al.* 2007). CBS-Domänen zeigen eine Helix-Loop-Strang-Struktur, bei der in einer hydrophoben Tasche Nukleotide gebunden werden können (Townley und Shapiro 2007; Xiao *et al.* 2007). Die vier CBS-

Domänen von AMPK γ unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten. CBS1 und CBS3 können sowohl AMP als auch ATP binden (Xiao *et al.* 2007), während CBS4 nur AMP binden kann und damit als Energiesensor fungiert (Townley und Shapiro 2007; Xiao *et al.* 2007). Der CBS2-Domäne fehlt ein Asparaginsäure-Rest (Townley und Shapiro 2007), weshalb sie kein Nukleotid binden kann. Stattdessen wurde von Scott *et al.* (2007) eine Pseudosubstrat-Sequenz (PS) gefunden, welche in Abwesenheit von AMP mit der Substrat-Binde-Domäne der α -Untereinheit assoziiert und damit deren Aktivität unterdrückt. Die Bindung von AMP führt zu einer Konformationsänderung der γ -Untereinheit, welche die CBS2-Domäne deformiert, dabei den Kontakt zwischen der PS und der aktiven Seite der α -Untereinheit und somit die Inhibition beendet (Scott *et al.* 2007). ATP antagonisiert den Effekt von AMP durch kompetitive Hemmung (Corton *et al.* 1995; Scott *et al.* 2004).

Die AMPK reagiert dadurch sehr sensibel auf Änderungen des AMP/ATP-Verhältnisses und bewirkt dann über verschiedene Ansatzpunkte eine Anpassung der Stoffwechselprozesse an das Energieniveau der Zelle. Bei ATP-Mangel und damit hohem AMP-Level werden katabole Stoffwechselwege aktiviert, während anabole Prozesse inhibiert werden (Moffat und Harper 2010).

Für den Fettstoffwechsel bedeutet das eine vermehrte β -Oxidation und eine verringerte Fettsäuresynthese. Wie in Abbildung 1.14 dargestellt, inhibiert die AMPK durch Phosphorylierung die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) und damit die Synthese von Malonyl-Coenzym A (CoA) (Kahn *et al.* 2005).

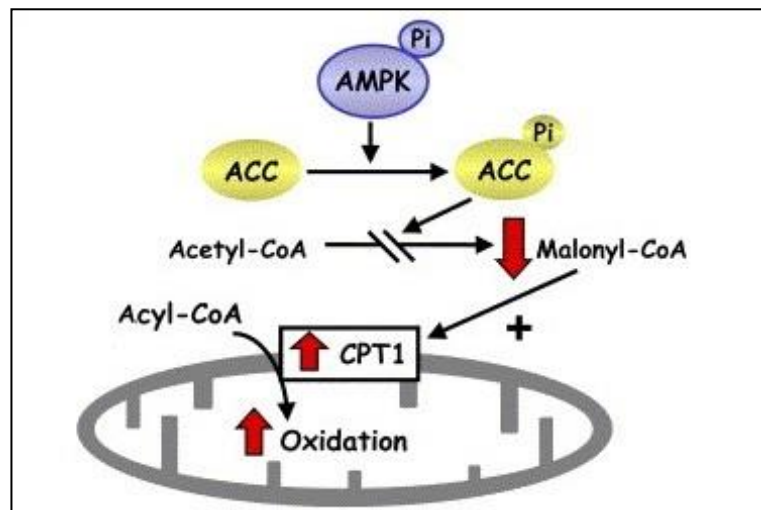


Abbildung 1.14: Modell für den Effekt der AMPK auf die Oxidation der Fettsäuren (verändert nach Kahn *et al.* 2005).

Die phosphorylierte AMPK hemmt über Phosphorylierung der ACC die Malonyl-CoA-Synthese. Dadurch können vermehrt Fettsäuren in das Mitochondrium transportiert und dort oxidiert werden.

Zudem konnten Lee *et al.* (2006) zeigen, dass die Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase zu einer erhöhten Expression von PPAR α und PGC1 führt und Campbell *et al.* (2002) beschrieben, dass dies geringere Level an Malonyl-CoA bewirke. Da dieses das Substrat der de-novo-Synthese und Elongation von Fettsäuren ist, kann beides dann nicht mehr stattfinden. Außerdem hemmt Malonyl-CoA die Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1

(CPT1) (Kahn *et al.* 2005), welche für den Transfer von primären zytosolischen Fettsäuren in die Mitochondrien, den Ort der β -Oxidation, benötigt wird. Letztere kann also bei niedrigen Malonyl-CoA-Leveln verstärkt ablaufen.

Des Weiteren steigert die AMPK die Glykolyse (Marsin *et al.* 2000). Durch Aktivierung der Phosphofruktokinase 2 (PFK2) entsteht vermehrt Fructose-2,6-bisphosphat, welches die Phosphofruktokinase 1 (PFK1), ein Schlüsselenzym der Glykolyse, aktiviert. Gleichzeitig inhibiert es die Fructose-1,6-Bisphosphatase (F-1,6-Bisphosphatase) und hemmt damit die Glukoneogenese (siehe Abbildung 1.15).

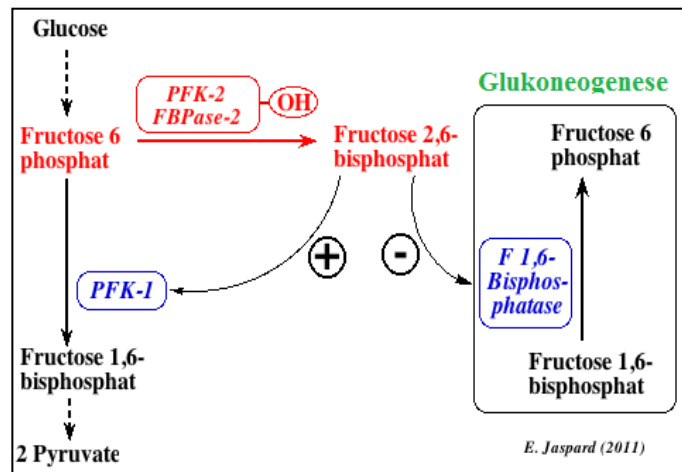


Abbildung 1.15: Regulation der Glykolyse (verändert nach Jaspard 2015).

Fructose-2,6-bisphosphat aktiviert die PFK1, ein Schlüsselenzym der Glykolyse, und inhibiert die Fructose-1,6-Bisphosphatase und damit die Glukoneogenese.

Außerdem zeigten Studien von Hayashi *et al.* (2000), dass die Aktivität der AMPK stark mit der Glukoseaufnahme in Muskelzellen von Ratten korrelierte und Russell *et al.* (1999) und Franch *et al.* (1999) nehmen an, dass die AMPK die Kontraktions-induzierte Steigerung der Glukoseaufnahme vermittelt. In Studien von Mu *et al.* (2001) wurde allerdings beschrieben, dass die Glukoseaufnahme und Translokation von GLUT4 an die Zelloberfläche bei Muskelzellmutanten, bei denen die AMPK inhibiert war, nur zum Teil verhindert wurde, woraus sie schlussfolgerten, dass wahrscheinlich auch andere Mechanismen an der Regulation der Glukoseaufnahme beteiligt sind.

Experimente von Halse *et al.* (2003) zeigten einen Abfall der Glykogensynthese-Aktivität bei steigender Aktivität der AMPK, was auf eine Inhibition der Glykogensynthese durch die AMPK schließen lässt. Ob dies durch direkte Phosphorylierung geschieht, bleibt allerdings noch unklar.

Über die negative Regulation von Transkriptionsfaktoren inhibiert die AMPK laut Hardie und Carling (1997) außerdem noch weitere ATP-verbrauchende Prozesse wie die Cholesterolsynthese.

Die AMPK spielt also eine Schlüsselrolle in der Regulation der zellulären Energiehomöostase. Ein Funktionsverlust führt zu einer allgemeinen Unfähigkeit

der Zellen, während ernährungsbedingten Stresssituationen Energie umzuverteilen und Aktivitäten anzupassen (Johnson *et al.* 2010).

Da bei diesen Umstellungsprozessen auch Hormone eine wichtige Rolle spielen, ist es nicht überraschend, dass diese beiden Systeme zusammenhängen. Die Arbeitsgruppe Braco *et al.* (2012) beschäftigte sich mit der Sekretion von AKH (Adipokinetischem Hormon), dem Äquivalent der *Drosophila* zu menschlichem Glukagon und stellten eine Korrelation zur Aktivität der AMPK fest. Die Untersuchungen ergaben dabei, dass die Aktivierung der AMPK eine Veränderung der Zellerregbarkeit durch erhöhte Kalziumlevel in der Zelle bewirkt. Braco *et al.* (2012) spekulierten daraufhin, dass die AMPK K^+ _{ATP}-Kanäle moduliert. Kalzium könnte dann über spannungsgesteuerte Ionenkanäle in die Zelle gelangen und dazu führen, dass Vesikel, die AKH enthalten, mit der Zellmembran fusionieren und das Hormon ausschütten, welches eine Energiemobilisation und steigende Zuckerkonzentrationen in der Hämolymphe bewirkt. Auch in menschlichen Pankreaszellen wird die AMPK benötigt, um die für die Glukagonausschüttung benötigten hohen Kalziumlevel zu generieren.

Ein letztes wichtiges Substrat der AMPK ist Tuberin (TSC2), welches phosphoryliert zusammen mit Hamartin (TSC1) den dimeren tuberösen Sklerose-Komplex (TSC) bildet. Dieser inhibiert Rheb, eine Guanosin-Triphosphatase (GTPase) der Ras-Familie, welche mTOR (mammalian target of Rapamycin) direkt aktiviert (siehe Abbildung 1.16) (Hay und Sonenberg 2004; Inoki *et al.* 2003; Reiter *et al.* 2005).

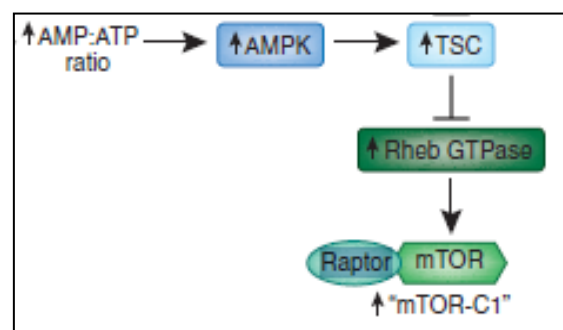


Abbildung 1.16: Einfluss der AMPK auf mTOR (verändert nach Lieberthal und Levine 2009). Durch Hemmung der Rheb-GTPase über TSC inhibiert die AMPK auch mTOR.

mTor ist Bestandteil von zwei verschiedenen Komplexen, mTORC1, welcher das Gerüstprotein Raptor enthält, und mTORC2, welcher das Gerüstprotein Rictor enthält (Jacinto *et al.* 2004; Kim *et al.* 2002; Sarbassov *et al.* 2004). Während mTORC2 Einfluss auf die Zellpolarität und das Zytoskelett hat, fördert mTORC1 die Zellproliferation durch Stimulation der mRNA-Translation und Synthese der Proteine, die für eine Zunahme der Zellgröße und den Durchlauf der G0- und G1-Phase des Zellzyklus benötigt werden (Sarbassov *et al.* 2004; Wullschleger *et al.* 2006; Kim *et al.* 2002). Durch die Aktivierung der AMPK wird also durch die Inhibition von mTOR das Zellwachstum während Energiemangel unterdrückt.

Außerdem ist mTOR durch den Einfluss auf die Zellmasse und Zellproliferation auch an der Pathogenese von Nierenerkrankungen beteiligt (siehe Abbildung 1.17). Lieberthal und Levine (2009) haben gezeigt, dass mTOR einen großen Einfluss auf die Regeneration des Nierengewebes nach akutem Nierenversagen hat. Andererseits spielt mTOR bei der Hypertrophie der glomerulären Zellen, einer ersten Strukturveränderung bei chronischen Nierenerkrankungen eine zentrale Rolle (Lee *et al.* 2007; Chen *et al.* 2005). Die glomeruläre Hypertrophie kann zu einer Verletzung der Podozyten und damit zu einem Funktionsverlust der Niere führen (Hostetter 1995, 2003). Zusätzlich

haben Studien von Bonegio *et al.* (2005) gezeigt, dass die Inhibition von mTOR bei chronischen Nierenerkrankungen die interstitielle Entzündung, Fibrose und den Funktionsverlust verringert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mTOR auch die Proliferation und klonale Expansion von Lymphozyten fördert (Fingar und Blenis 2004; Hay und Sonenberg 2004). Außerdem stimuliert es die Proliferation von Fibroblasten und deren Kollagensynthese, sowie die Expression von profibrotischen Zytokinen wie TGF β 1 und des konnektiven Gewebe-Wachstumsfaktors (Brenneisen *et al.* 2000; Lloberas *et al.* 2006; Lock *et al.* 2007; Shegogue und Trojanowska 2004; Sakaguchi *et al.* 2006; Yang *et al.* 2007). Außerdem beeinflusst mTOR die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), bei der

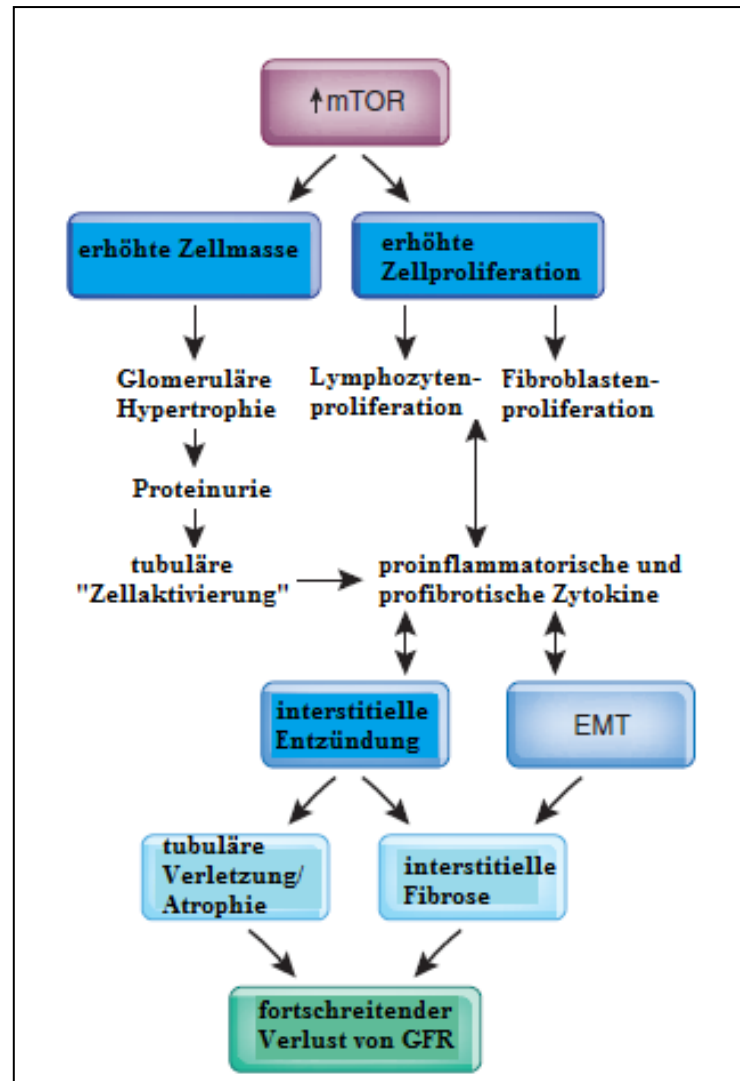


Abbildung 1.17: Effekte von mTOR (verändert nach Lieberthal und Levine 2009).

Gesteigerte Aktivität von mTOR fördert interstitielle Entzündungen und die epithelial-mesenchymale Transition (EMT), was zu interstitieller Fibrose und Störungen des Tubulussystems und dadurch zu einer Verschlechterung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt.

Tubuluszellen eine phänotypische Veränderung zu Fibroblasten durchlaufen und dann durch die Basalmembran in das Interstitium wandern (Eddy und Neilson 2006; Harris und Neilson 2006; Lamouille und Derynck 2007; Liu 2004; Pon *et al.* 2008).

Bei der diabetischen Nephropathie bewirkt mTOR neben den beschriebenen Charakteristika chronischer Nierenerkrankungen eine Steigerung der Synthese von Matrixproteinen, was zu einer Verdickung der Basalmembran und Anlagerung von mesangialer Matrix führt (Kasinath *et al.* 2006; Mariappan *et al.* 2007; Sataranatarajan *et al.* 2007).

Doch die Veränderungen der Niere durch mTOR gehen sogar noch darüber hinaus. mTOR scheint einen Anteil an der Pathogenese von polyzystischen Nieren (Shillingford *et al.* 2006; Tao *et al.* 2005) und von Nierenzellkarzinomen zu haben (Brugarolas *et al.* 2003; Kenerson *et al.* 2002; Kondo *et al.* 2001), wobei der therapeutische Effekt der mTOR-Inhibition vor allem auf die Hemmung des Zellwachstums und der Zellproliferation abzielt.

Da durch die Herunterregulation des *AMPK γ* -Genes keine funktionsfähige AMPK gebildet werden kann, und damit die Inhibition von mTOR wegfällt, wären pathologische Veränderungen an den Nephrozyten der *Drosophila* sehr realistisch.

1.6.2 CG9413

Das Protein-kodierende Gen *CG9413* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* des menschlichen Gens *SLC7A9* (FlyBase Gene Report: Dmel\CG9413).

CG9413 ist auf dem Folgestrang des X-Chromosoms von Stelle 14584,733 bis 14602,580 lokalisiert (siehe Abbildung 1.18) (FlyBase Gene Report: Dmel\CG9413).

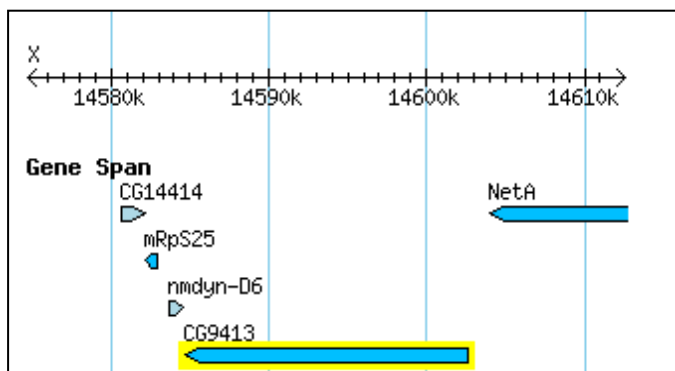


Abbildung 1.18: Lokalisation von *CG9413* (FlyBase Web Development Group).

SLC7A9 kodiert für den Aminosäuretransporter $b^{0,+}$ ($b^{0,+}AT$) (Calonge *et al.* 1994; Feliubadalo *et al.* 1999; Pras *et al.* 1994), welcher ein nicht glykosyliertes Membranprotein mit mutmaßlich zwölf Transmembrandomänen darstellt. Zusammen mit dem Typ-II-Membran-Glykoprotein rBAT, mit dem es über eine Disulfidbrücke zwischen zwei Cysteinresten

verbunden ist, bildet es einen heterodimeren Aminosäuretransporter (siehe Abbildung 1.19) (Chillaron *et al.* 2001; Pfeiffer *et al.* 1998; Verrey *et al.* 1999; Wagner *et al.* 2001).

Dieser ist hauptsächlich in der apikalen Bürstensaummembran von Epithelzellen der Nierentubuli und des Dünndarms lokalisiert und vermittelt den Natriumunabhängigen, hoch-

affinen Transport von Cystin und dibasischen Aminosäuren in die Zelle im Austausch gegen neutrale Aminosäuren (Chillaron *et al.* 1996; Furriols *et al.* 1993). Die Antriebskraft für die Reabsorption von L-Cystin wird zum einen elektrophysiologisch durch das negative Membranpotential, zum anderen durch die intrazelluläre Reduktion zu L-Cystein generiert, welches über den basolateralen L-Typ-Aminosäuren-Transporter 2 (LAT2) die Zelle verlässt (Chillaron *et al.* 1996; Silbernagl 1988). Die dibasischen Aminosäuren gelangen an der basolateralen Seite über das γ -LAT1-Transportsystem aus der Zelle heraus (Pfeiffer *et al.* 1999). Die Substratspezifität des $b^{0,+}$ AT/rBAT-Heterodimers wird durch die leichte Untereinheit, den $b^{0,+}$ AT, bestimmt, welche auch den eigentlichen Transporter darstellt. Die schwere Untereinheit (rBAT) hat vermutlich eine Trafficking-Funktion des Heterodimers zur apikalen Membran (Nakamura *et al.* 1999).

Laut Fernandez *et al.* (2002) nimmt, wie in Abbildung 1.20 dargestellt, die Expression des $b^{0,+}$ AT/rBAT-Heterodimers im Verlauf des proximalen Nierentubulus ab, was dem Expressionsgradienten von $b^{0,+}$ AT entspricht. Bei rBAT verhält es sich genau entgegengesetzt, was zu der Annahme führte, dass rBAT noch mit mindestens einer anderen leichten Untereinheit zu einem Komplex assoziiert. Diese ist bislang allerdings unbekannt und das Heterodimer scheint auch nicht Cystin zu transportieren, da ein Defekt von rBAT, welcher die Funktion beider Heterodimere betrifft, die Reabsorption von Cystin nicht stärker

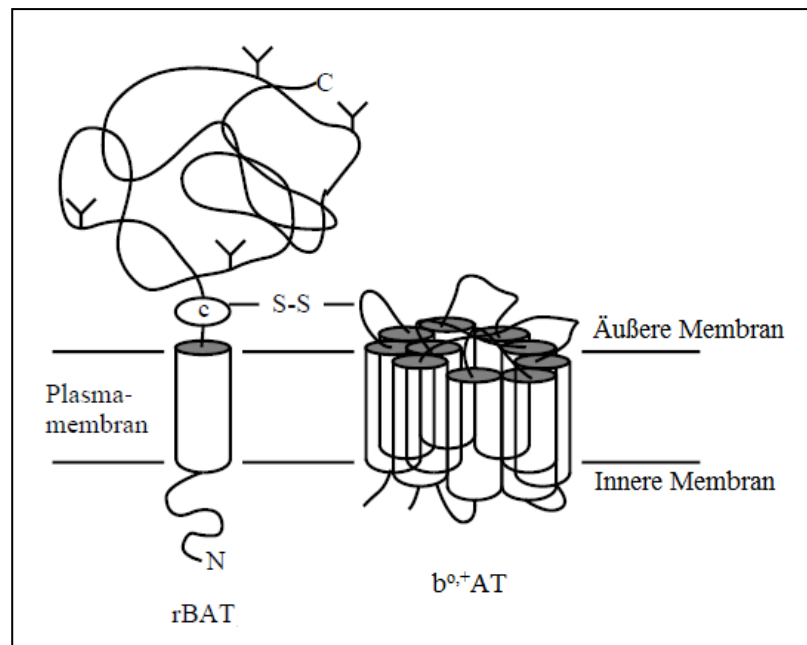


Abbildung 1.19: Modell der heterodimeren Präsentation von $b^{0,+}$ und rBAT (verändert nach Palacín 1994).

rBAT weist einen intrazellulären Aminoterminus, eine transmembrane Sequenz, sowie eine große extrazelluläre Domäne auf und ist über eine Disulfidbrücke mit dem wahrscheinlich aus zwölf Transmembrandomänen bestehenden $b^{0,+}$ verbunden.

vermindert als ein Defekt von $b^{0,+}AT$, der die Komplexe aus rBAT und der unbekanntes Untereinheit nicht beeinträchtigt (Crawhall *et al.* 1967; Font *et al.* 2001; Frimpter *et al.* 1962).

Die Cystin-Reabsorption in der Niere findet zu >90% in den frühen Teilen des proximalen Tubulus statt (Volkl und Silbernagl 1982; Silbernagl 1988), wobei das $b^{0,+}AT/rBAT$ -Heterodimer das wichtigste System darstellt (Fernandez *et al.* 2002). Ein zweites ist Natrium-abhängig und hat eine geringere Affinität zu Cystein, transportiert aber keine anderen Aminosäuren (Fernandez *et al.* 2002). Es ist noch weitgehend unerforscht. Defekte, die das hochaffine $b^{0,+}AT/rBAT$ -Transportsystem betreffen,

führen zur Cystinurie (Font *et al.* 2001). Die Cystinurie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, die sich durch eine urinaire Hyperexkretion von Cystin und kationischen Aminosäuren auszeichnet (Levy 1973). Da die Löslichkeit von Cystin sehr gering ist, kommt es zu rezidivierender Nierensteinbildung, die zu Obstruktion, Infektionen und letztendlich zur renalen Insuffizienz führen kann (Palacín *et al.* 2001). Anhand der Konzentrationen von Cystin und dibasischen Aminosäuren im Urin bei heterozygoten Trägern, wird die Cystinurie in Typ-I und nicht-Typ-I unterschieden. Bei der Typ-I-Cystinurie sind die Konzentrationen nicht erhöht, bei der nicht-Typ-I-Cystinurie dagegen schon (Goodyer *et al.* 1998). Die Variationsbreite hierbei ist so groß, dass eine dominante Vererbung mit variabler Penetranz vermutet wurde (Eggermann *et al.* 2000). Die beiden Typen sind auf Mutationen in unterschiedlichen Genen zurückzuführen. Während die Typ-I-Cystinurie durch Mutationen im Gen *SLC3A1* verursacht wird (Calonge *et al.* 1995), welches für rBAT kodiert, führen Mutationen im Gen *SLC7A9* zur nicht-Typ-I-Cystinurie (Feliubadalo *et al.* 1999). Auch Mischformen (Typ-I/nicht-Typ-I) sind möglich (Goodyer *et al.* 1998).

Assimos *et al.* (2002) verglichen Patienten mit durch Zystinurie bedingten Nierensteinen und Patienten mit Kalziumoxalatsteinen bezüglich des Serumkreatinins und konnten dabei pathologisch erhöhte Werte bei signifikant mehr Patienten mit Zystinurie feststellen, denen

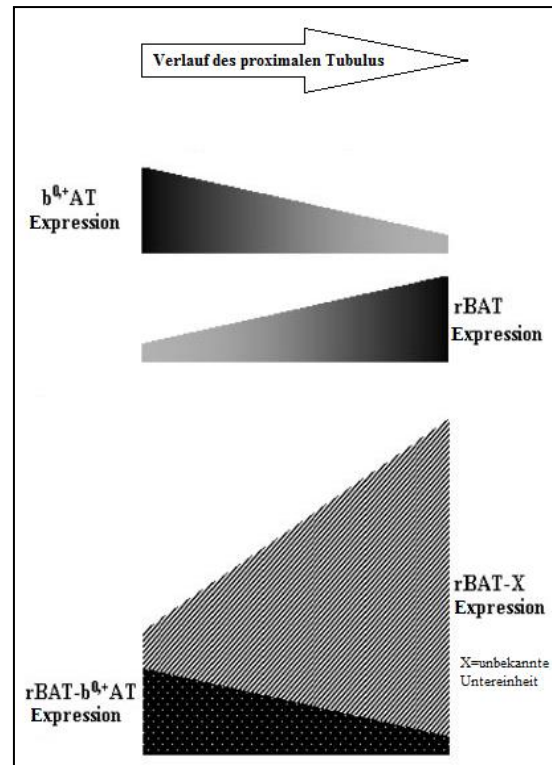


Abbildung 1.20: Expressionsgradienten von $b^{0,+}$ und rBAT (verändert nach Fernandez *et al.* 2002).

damit ein größeres Risiko für einen Nierenfunktionsverlust zugeschrieben wurde. Dies erklärt, warum Menschen mit einer Mutation im Gen *SLC7A9* in der Studie von Köttgen *et al.* (2010) durch eine veränderte GFR aufgefallen sind und es ist von großem Interesse, die Wirkungen des Gens am Modell der *Drosophila* näher zu untersuchen.

In Studien von Reynolds *et al.* (2009) konnte allerdings in *Drosophila* nur eine einzige schwere Untereinheit von heterodimeren Aminosäuretransportern identifiziert werden und diese entsprach nicht dem menschlichen rBAT, sodass fraglich ist, ob *Drosophila* ein Ortholog zu dem $b^{0,+}$ AT/rBAT-Heterodimer aufweist.

Außerdem ist das entsprechende *Drosophila*-Gen *CG9413* nicht nur das Ortholog des menschlichen Gens *SLC7A9*, sondern auch noch anderer Gene, welche für weitere leichte Untereinheiten von verschiedenen Aminosäuretransportern kodieren:

<i>Menschliches Gen</i>	<i>Produkt</i>
<i>SLC7A5</i>	Leichte Kette des Aminosäuretransporter des L-Systems
<i>SLC7A6</i>	Leichte Kette des Aminosäuretransporter des γ +L-Systems
<i>SLC7A7</i>	Leichte Kette des Aminosäuretransporter des γ +L-Systems
<i>SLC7A9</i>	Leichte Kette des Aminosäuretransporter des $b^{0,+}$ -Systems
<i>SLC7A10</i>	Leichte Kette des Transporters des ASC-Systems für neutrale Aminosäuren
<i>SLC7A11</i>	Leichte Kette des Transporters des x_c^- -Systems für anionische Aminosäuren

Tabelle 1: Orthologe von *CG9413* (FlyBase Gene Report: Dmel\CG9413).

Aminosäuretransporter des x_c^- -Systems vermitteln einen Natrium-abhängigen Austausch zwischen extrazellulärem Cystin und intrazellulärem Glutamat und haben damit eine wichtige Funktion für die Glutathion-Synthese bei oxidativem Stress (Bannai *et al.* 1984; Bannai und Ishii 1982; Christensen 1990; Shih *et al.* 2006). Außerdem beeinflussen sie den extrazellulären Glutamatspiegel, welcher Auswirkungen auf die Sensibilität von Glutamatrezeptoren an der postsynaptischen Membran hat (Augustin *et al.* 2007).

Aminosäuretransporter des L-Systems sind an der Natrium-unabhängigen Aufnahme von Leucin und anderen hydrophoben Aminosäuren beteiligt (Verrey 2003). Da der Transport von Aminosäuren in die Zellen essentiell für das Wachstum und Überleben von Zellen ist (Reynolds *et al.* 2009), kann also die Herunterregulation von *CG9413* in den Nephrozyten weitreichende Folgen haben, die über entsprechende Auswirkungen des menschlichen Gens *SLC7A9* hinausgehen.

1.6.3 CG16717

Das Protein-kodierende Gen *CG16717* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* des menschlichen Gens *MPPED2* (FlyBase Gene Report: Dmel\CG16717).

CG16717 ist auf dem Führungsstrang des linken Arms des Chromosoms 3 von Stelle 9679,201 bis 9681,060 lokalisiert (Abbildung 1.21) (FlyBase Gene Report: Dmel\CG16717).

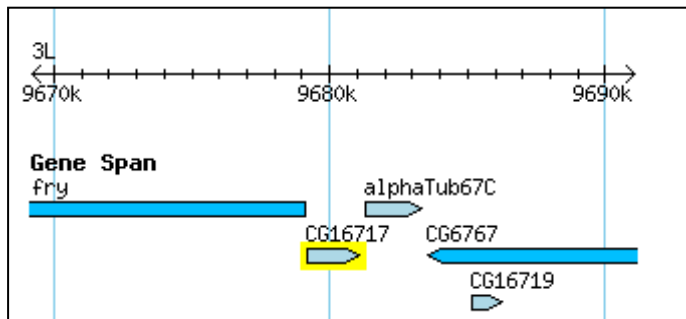


Abbildung 1.21: Lokalisation von *CG16717* (FlyBase Web Development Group).

CG16717 kodiert für ein Protein, das eine Calcineurin-ähnliche Phosphoesterase- und eine Metall-abhängige Phosphatase-Aktivität aufweist. Die Substrate werden also in reversibler Reaktion hydrolytisch gespalten. Es ist noch nicht bekannt, in welchen biologischen Prozessen das Protein mitwirkt.

Das humane Metallophosphoesterase-Domäne enthaltende Protein 2 (MPPED2) gehört der Familie der Metallophosphoesterasen an. Diese enthalten eine Phosphoprotein-Phosphatase-ähnliche Faltung, welche zwei Metallionen an der aktiven Seite bindet. Andere strukturelle Eigenschaften unterscheiden die Mitglieder in ihrer Substratspezifität, Katalysationsrate und bezüglich ihrer Interaktionen mit anderen Molekülen (Hierro *et al.* 2007; Keppetipola und Shuman 2007, 2008).

Die MPPED2 kann der Klasse III der Metallophosphodiesterasen in Säugern zugeordnet werden (Schwartz und Ota 1997; Tyagi *et al.* 2009). Diese katalysieren die Hydrolyse zyklischer Nukleotide zu 5'-AMP und 5'-GMP (Richter 2002). Bei der MPPED2 wurde dabei eine negative Rückkopplung beschrieben (Dermol *et al.* 2011): An der aktiven Seite kann die MPPED2 5'-AMP oder 5'-GMP binden. Da dadurch die Phosphodiesterase-Aktivität inhibiert wird, hängt die Aktivität von der intrazellulären AMP-Konzentration und damit dem Energiestatus der Zelle ab. Bei ATP-Mangel ist die AMP-Konzentration hoch und die Enzymaktivität der MPPED2 damit verringert, bei einem hohen Energiestatus sinkt die AMP-Konzentration und die MPPED2-Aktivität steigt. Durch den charakteristischen Austausch eines Histidins durch ein Glycin innerhalb der aktiven Seite der MPPED2 ist ihre enzymatische Aktivität allerdings im Vergleich zu anderen Phosphodiesterasen trotzdem sehr gering (Podobnik *et al.* 2009; Shenoy *et al.* 2005, 2007; Tyagi *et al.* 2009). Dermol *et al.*

(2011) nehmen daher an, dass die Hauptfunktion darin besteht, die spezielle Metallophosphoesterase-Faltung als Gerüst oder Adapter für Protein-Protein-Interaktionen zu nutzen. Sie vermuten weiter, dass die hydrophoben Regionen an der Oberfläche der MPPED2 Protein-Protein- oder auch Protein-Lipid-Bindungen und damit auch die Bildung von Komplexen mit anderen zellulären Komponenten ermöglichen.

Trotzdem ist die Metallophosphodiesterase-Funktion nicht zu unterschätzen, die vor allem im Zusammenhang mit dem Zellzyklus (siehe Abbildung 1.22) steht. Sie ist nach Studien von Liguori *et al.* (2012) für die antiproliferative Wirkung von MPPED2 verantwortlich. Während Phosphodiesterasen der Klasse I und II das Zellwachstum fördern, hemmt die MPPED2 dieses und indu-

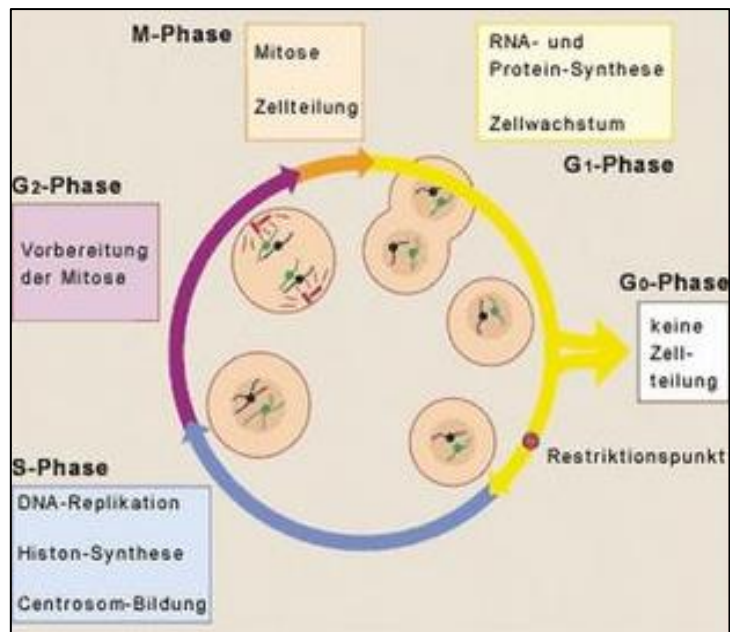


Abbildung 1.22: Zellzyklus (GoPixPic).

Eine Zelle durchläuft unter der Kontrolle verschiedenster Proteine nacheinander G₁-, S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus.

ziert die Apoptose (Liguori *et al.* 2012). In Neuroblastomzellen führte die Überexpression von MPPED2 zu einem signifikanten Anstieg der G₀/G₁- und einem Abfall der S-Phasen-Zellpopulation (Liguori *et al.* 2012). Dabei zeigten sich verringerte Konzentrationen von Zyklin D1 und gesteigerte Konzentrationen von p21, einem Protein der Cip/Kip-Familie, welche CDK (Zyklin abhängige Kinasen)/Zyklin-Komplexe negativ reguliert. Diese sind für den Durchlauf des Zellzyklus (siehe Abbildung 1.22) essentiell.

Gleichzeitig führte eine gesteigerte Caspasenaktivität zu einer erhöhten Apoptoserate. Bei Mäusen mit einer Überexpression von MPPED2 in Neuroblastomzellen zeigte sich dementsprechend ein weniger aggressiver Phänotyp und auch beim humanen Neuroblastom konnte eine negative Korrelation zwischen der MPPED2-Konzentration und der Tumorprogression festgestellt werden (Liguori *et al.* 2012). Je höher das Tumorstadium, desto weniger wurde MPPED2 exprimiert. Auch die Rezidivrate war bei Patienten mit geringen MPPED2-Leveln sehr viel höher als bei Patienten mit höheren MPPED2-Leveln (Liguori *et al.* 2012).

MPPED2 wird nicht nur in Neuroblastomzellen exprimiert, sondern konnte auch in Zelllinien des Medulloblastoms, Mamma- und Zervixkarzinoms nachgewiesen werden (Barnes *et al.* 1981; Kanda *et al.* 1983; Ross *et al.* 1983).

Außerdem wurde eine hohe Expression in fetalem Hirngewebe festgestellt (Schwartz *et al.* 1994, 1995) und MPPED2 scheint eine Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung des Nervensystems zu spielen (Liguori *et al.* 2012; Schwartz *et al.* 1995). Patienten mit einem WAGR-Syndrom haben eine Deletion der Region des Chromosoms 11, in dem auch das MPPED2-Gen liegt (Schwartz *et al.* 1994). Der Symptomkomplex beinhaltet den Wilmstumor (Nephroblastom), eine Aniridie, urogenitale Anomalien und mentale Retardierung, wobei letztere auf das fehlende MPPED2-Gen zurückgeführt werden könnte.

Auch während der embryonalen Entwicklung von Herz und Niere wurde eine erhöhte Expression von MPPED2 gezeigt (Liguori *et al.* 2012), sodass es durchaus denkbar ist, dass die Herunterregulation von *CG16717* in den Nephrozyten von *Drosophila* Veränderungen bewirkt.

1.6.4 *CG32702*

Das Protein-kodierende Gen *CG32702* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* vom menschlichen Gen *CUBN* (FlyBase Gene Report: Dmel\Cubn).

CG32702 ist auf dem Folgestrang des X-Chromosoms von Stelle 9558,665 bis 9571,308 lokalisiert (siehe Abbildung 1.23) (FlyBase Gene Report: Dmel\Cubn).

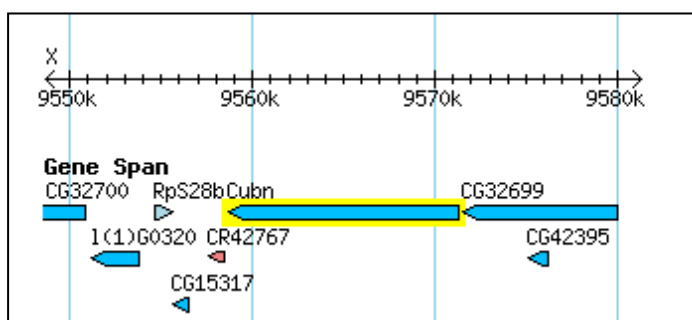


Abbildung 1.23: Lokalisation von *CG32702* (FlyBase Web Development Group).

CG32702 und *CUBN* kodieren für das 460kDa schwere Membranprotein Cubilin. Es enthält viele Bindedomänen für verschiedene Liganden, darunter Albumin, Apolipoprotein A1 (ApoA1), Haptoglobin, Transferrin, der intrinsische Faktor-Vitamin B₁₂-Komplex (VitB₁₂-IF) und das Vitamin D-Bindeprotein (siehe Abbildung 1.24) (Nielsen *et al.* 2012).

Da Cubilin als peripheres Membranprotein weder transmembrane noch intrazelluläre Segmente enthält und keine Endozytose der Liganden vermitteln kann, bildet es Komplexe mit Transmembranproteinen. Amnionless (AMN) bindet an die EGF-Domänen (epidermaler-

Wachstums-Faktor-Domänen), führt Cubilin zur Zellmembran, verankert es dort und bildet den Amnionless/Cubilin-Rezeptorkomplex Cubam (siehe Abbildung 1.24) (Coudroy *et al.* 2005; Fyfe *et al.* 2004; Tanner *et al.* 2003). Cubam wird im epithelialen Bürstensaum von Dünndarm- und proximalen Tubuluszellen exprimiert und übt Rezeptor-vermittelte Endozytose über Clathrin-beschichtete Vertiefungen der Plasmamembran (Clathrin-coated pits) aus (Pedersen *et al.* 2010). Die Kombination aus einer intestinalen Malabsorption von Vitamin B₁₂, die oftmals in einer megaloblastischen Anämie resultiert, und leichter Proteinurie charakterisiert das Imerslund-Gräsbeck-Syndrom, das auf Mutationen im *CUBN*- oder *AMN*-Gen zurückzuführen ist (Aminoff *et al.* 1999; Gräsbeck *et al.* 1960; Imerslund 1960; Imerslund und Bjornstad 1963; Tanner *et al.* 2003).

Wie in Abbildung 1.24 dargestellt, bildet Cubilin in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen zusätzlich mit Megalin einen Komplex, bei dem Megalin für die Internalisierung von Cubilin und seinen Liganden, sowie seinen eigenen Liganden, wozu Apolipoprotein E (Apo E), Apolipoprotein M (Apo M), Retinolbindepotein (Rbp), Transthyretin (Tr), die lösliche Form des Folatezeptors (Folr1) und das morphogene sonic-hedgehog-Protein (Shh)

gehören, verantwortlich ist (Christensen und Nielsen 2007; Pescarmona). Das zytoplasmatische Ende von Megalin bindet das Adapterprotein Dab2 und dieses rekrutiert das Protein Myo6. Das Rezeptor-assoziierte Protein (RAP) bindet sowohl Cubilin als auch Megalin.

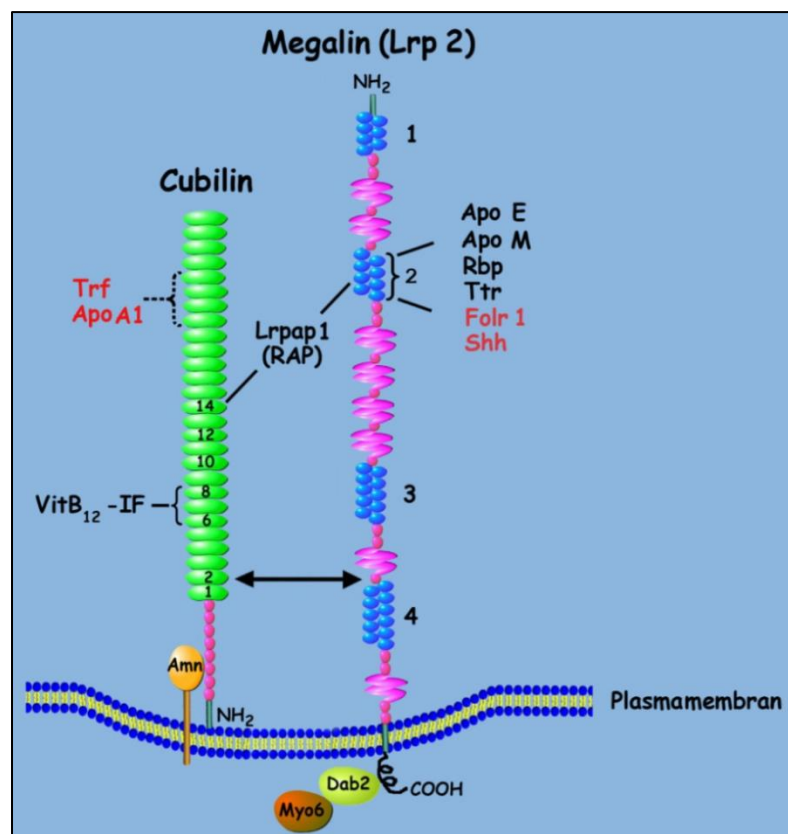


Abbildung 1.24: Modell von Cubilin und Megalin (Waes *et al.* 2008). Cubilin und Megalin bilden einen Komplex in der apikalen Membran. Dieser kann verschiedene Liganden binden und in die Zelle aufnehmen.

Laut Birn *et al.* (2000), Christensen *et al.* (2009), Kozyraki *et al.* (1999) und Nielsen und Christensen (2010) ist die vom Cubilin/Megalin-Rezeptor vermittelte Endozytose der einzige Mechanismus der Reabsorption von glomerulär filtrierten Proteinen. Mutationen von Cubilin führen daher zu Proteinurie und Albuminurie (Grasbeck 2006) und letztere wird von Meguid El Nahas und Bello (2005) als Risikofaktor für fortschreitenden Nierenfunktionsverlust beschrieben. Nach Studien von Erkan *et al.* (2005) induziert Albuminurie in Zellen des proximalen Tubulus und distalem Nephron die Apoptose und laut Gross *et al.* (2011) und Lee und Han (2008) in proximalen Tubulusepithelzellen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und dem profibrotischen transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β), was eine mögliche Erklärung für diese Einschätzung darstellt. Reznichenko *et al.* (2012) überlegten nun, dass Variationen im *CUBN*-Lokus mit fortschreitendem Nierenfunktionsverlust und schließlich dem Endstadium des Nierenversagens assoziiert sein könnten und konnten dies in ihren Studien belegen (siehe 1.2).

Studien von Aseem *et al.* (2014) zeigten, dass die verringerte Reabsorption von Albumin und ApoA1 im proximalen Tubulus zu signifikant niedrigeren Leveln von Albumin und ApoA1 und damit auch HDL-Partikeln im Blut führten. Es gibt klinische Hinweise darauf, dass niedrige Albumin- und HDL-Cholesterin-Blutwerte invers mit dem Risiko für koronare Herzerkrankungen korrelieren (Arnlov *et al.* 2005; Assmann *et al.* 1996; Gordon *et al.* 1977; Hillege *et al.* 2002; Kuller *et al.* 1991; Linsel-Nitschke und Tall 2005; Sharrett *et al.* 2001; Smink *et al.* 2012). Da glomeruläre Albuminurie häufig mit systemischen Krankheiten einhergeht, während tubuläre Albuminurie oft aus einer lokalen Pathologie resultiert, vermuten McMahon *et al.* (2014), dass tubuläre Albuminurie das Risiko für koronare Herzerkrankungen in einem geringeren Ausmaß als die glomeruläre Albuminurie erhöhen könnte. Diese Hypothese bleibt aber noch zu bestätigen.

Kürzlich konnten Zhang *et al.* (2013a) zeigen, dass die *Drosophila*-Orthologe des menschlichen Cubilin und Amnionless in Nephrozyten exprimiert werden und dort als Korezeptoren für Proteinaufnahme fungieren. Nachdem dies der Rolle in der proximalen Tubuluszelle entspricht, schlussfolgerten sie, dass der Nephrozyt Filtration und Proteinreabsorption kombiniert und damit sowohl die Funktion der Podozyten als auch der proximalen Tubuluszelle ausübt. Die Methodik dieser Studie ähnelt meinen Untersuchungen sehr stark, sodass es interessant sein wird, zu sehen, ob meine Ergebnisse mit denen von Zhang *et al.* (2013a) übereinstimmen.

1.6.5 Dachshund

Das Protein-kodierende Gen *Dachshund* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* vom menschlichen Gen *DACHI* (FlyBase Gene Report: Dmel\dac).

Dachshund ist auf dem Folgestrang des linken Arms des Chromosoms 2 von Stelle 16466,512 bis 16485,998 lokalisiert (siehe Abbildung 1.25) (FlyBase Gene Report: Dmel\dac).

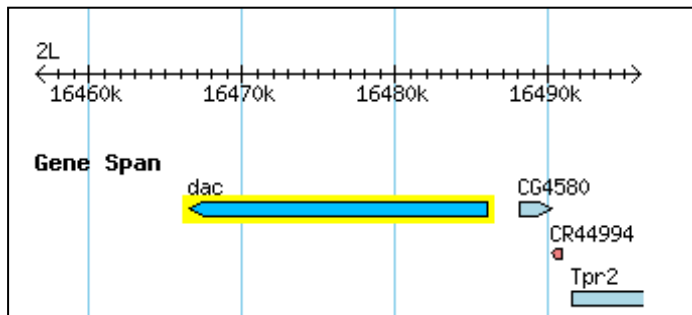


Abbildung 1.25: Lokalisation von *Dachshund* (FlyBase Web Development Group).

Das Gen *Dachshund* ist nach dem Phänotyp benannt, der bei einer Mutation in diesem Gen auftritt. Die Beine von mutanten Fliegen sind im Vergleich zu wildtypischen Fliegen und im Verhältnis zur Körperlänge extrem kurz (Interactive Fly, *Drosophila* 2013). Dies liegt an einer gestörten Morphogenese während des Larven- und frühen Puppenstadiums (Mardon *et al.* 1994).

Auch für die Entwicklung neuronaler Strukturen ist *Dachshund* wichtig. Eine Nullmutation in den embryonischen Pilzkörpern, den Zentren für olfaktorisches assoziatives Lernen und elementaren kognitiven Funktionen im Gehirn von *Drosophila*, resultiert in unterbrochenen oder abberanten Axonen (Kurusu *et al.* 2000). Bei fehlender Funktion des vom Gen kodierten Proteins Dachshund ist zudem die regelrechte Bewegung der morphogenetischen Furche gestört. Diese besteht aus Zellen, die die Genexpression beeinflussen und die neurale Differenzierung der Zellen im sich entwickelnden Auge initiieren. *Dachshund*-mutierte Zellen verbleiben also in einem undifferenzierten Status (Mardon *et al.* 1994). Außerdem ist Dachshund ein Suppressor der Ellipse-Mutation des epidermalen Wachstumsfaktors (*Egfr*) (Mardon *et al.* 1994). Diese verhindert ein normales Anordnen und Differenzieren der Photorezeptorzellen im Auge.

Als Mitglied des retinalen Determinations-Gen-Netzwerks (RDGN), welches die Zellschicksale für verschiedene Gewebe determiniert, ist Dachshund jedoch nicht nur an der Entwicklung des Auges beteiligt, sondern beeinflusst auch die von vielen anderen Organen, einschließlich dem Ohr und der Niere (Li *et al.* 2003).

Der Einfluss von *Dachshund* auf die Differenzierung und das Wachstum von Zellen erhielt hinsichtlich Tumorerkrankungen eine neue Bedeutung und es zeigte sich, dass die Expression

von *DACH1* in verschiedenen Tumorarten invers mit dem Tumorgrad und dem TNM-Staging korreliert (Chu *et al.* 2014), sowie dass *DACH1* das Wachstum und die Metastasierung der Tumoren verhindert (Wu *et al.* 2011) und damit die Prognose für die Patienten verbessert (Wu *et al.* 2006a). Dabei spielen verschiedene Signaltransduktionswege eine Rolle.

Studien von Chen *et al.* (2013) an Mammakarzinomzellen zeigten, dass *DACH1* an das Tumorsuppressorprotein p53 bindet, wobei die NAD-abhängige Deacetylase SIRT1 durch Deacetylierung von p53 die Assoziationsrate der beiden im Nukleus kolokalisierten Proteine erhöht. *DACH1* verstärkt die Wirkung von p53, die in Abbildung 1.26 dargestellt ist. Sie besteht zum einen in

der Induktion der Apoptose und zum anderen über Aktivierung der Expression von p21 in der Inhibition des Zellzyklus. P21 bindet und hemmt dadurch Komplexe aus Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs), welche den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zell-

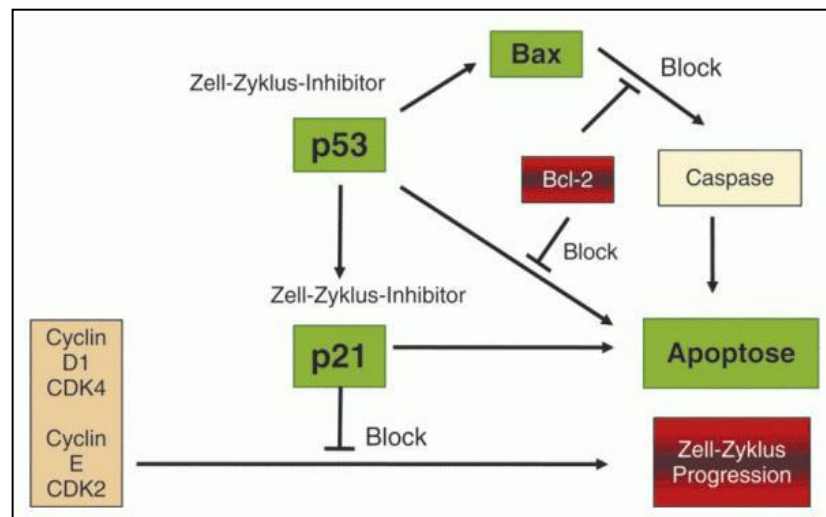


Abbildung 1.26: Effekte von p53 (Jacob *et al.* 2009).

Sowohl über die Beeinflussung verschiedener Proteine, als auch direkt bewirkt p53 die Apoptose und verhindert den Progress der Zelle im Zellzyklus.

P53 beeinflusst auch die Expression vieler weiterer Gene, darunter die proapoptotischen Proteine BAX, PUMA, NOXA und PIG3, deren Expression wiederum zusätzlich von *DACH1* induziert werden (Wu *et al.* 2003).

Ein weiterer Wirkmechanismus von Dachshund ist die Inhibition des Wnt-Signalweges, welcher in Abbildung 1.27 dargestellt ist. Er reguliert die Zellproliferation, Migration und Apoptose. Im inaktivierten Zustand liegt das Schlüsselprotein β -Catenin durch einen inhibitorischen Komplex aus der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β), der Casein-Kinase 1 α , dem Adenomatöse-Polyposis-coli-Protein (APC) und Axin besteht, mehrfach phosphoryliert vor. Dadurch wird es ubiquitiert und schließlich im Proteasom abgebaut, sodass der zytosolische Spiegel von β -Catenin gering ist. Bindet das Signalprotein Wnt an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Frizzled-Familie und seinen Co-Rezeptor LRP, wird die GSK 3 β inhibiert, sodass das β -Catenin unphosphoryliert vorliegt und in den Nukleus

transloziert wird. Hier bindet es an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie, welche vorher durch DNA-Bindung und Interaktion mit anderen Faktoren, wie dem CREB-binding-Protein (CBP) und Groucho, die Transkription der Wnt-Zielgene verhindert haben (Peifer und Polakis 2000; Saito-Diaz *et al.* 2013; Wodarz und Nusse 1998).

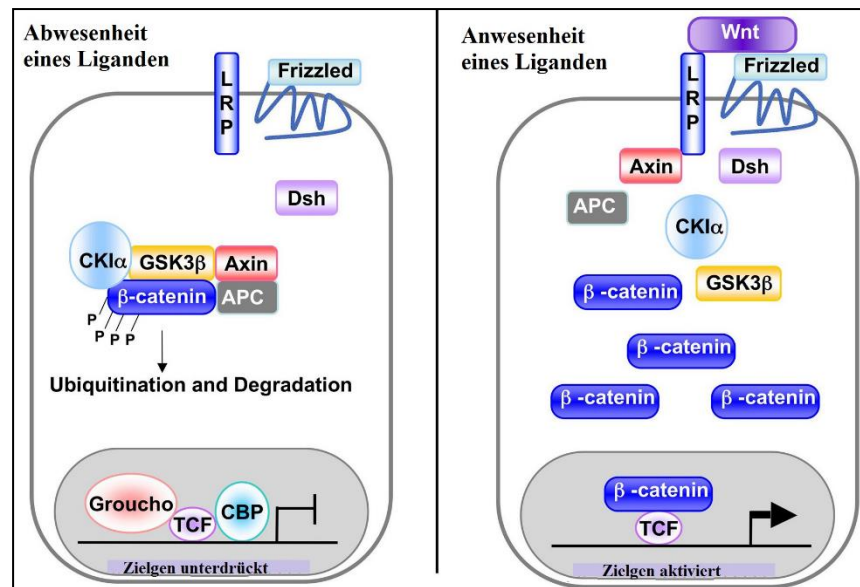


Abbildung 1.27: Wnt-Signalweg (verändert nach Eisenmann 2005). Nach Bindung von Wnt an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor der Frizzled-Familie und seinen Co-Rezeptor LRP liegt β -Catenin unphosphoryliert vor und ermöglicht die Transkription des Zielgens.

Studien von Alvarado *et al.* (2011) ließen vermuten, dass die hochregulierte Proliferation der basaloiden Zellen in oralen epithelialen Dysplasien durch eine erhöhte Aktivität des Wnt-Signalweges verursacht wird und in Studien von Ravindran und Devaraj (2012) an Patienten mit oralen Karzinomen ging eine übermäßige Aktivierung des Wnt-Signalweges mit einer Tumorprogression einher und die nukleäre Akkumulation von β -Catenin korrelierte mit einem kürzeren Überleben der Patienten. Auf die Rolle von *DACHI* dabei wird in Studien von Yan *et al.* (2013) und von Paluszczak *et al.* (2014) eingegangen. Erstere beschrieben eine Methylierung der Promotorregion von *DACHI* in kolorektalen Karzinomen, welche mit späten Tumorstadien, schlechter Differenzierung und Lymphknotenmetastasen korrelierte, und Paluszczak *et al.* (2014) konnten diese epigenetische Ausschaltung von *DACHI* auch in oralen Plattenepithelkarzinomen finden.

Studien von Wu *et al.* (2014b) und Zhu *et al.* (2013) bestätigten den tumorsuppressiven Effekt von *DACHI* und begründeten ihn mit der Aktivierung des TGF β -Signalweges. Dieser beeinflusst verschiedene biologische Prozesse wie die Zellproliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose. Bei Aktivierung werden, wie in Abbildung 1.28 dargestellt, die Proteine Smad2 und Smad3 vermehrt phosphoryliert und bilden mit Smad4 einen Komplex, der in den Nukleus transloziert und dort die Transkription verschiedener Gene reguliert (Shi und Massague 2003), darunter die des Tumorsuppressorproteins p21 und des Zyklin-

abhängigen Kinase-Inhibitors (p21Cip1), deren vermehrte Expression zum Zellzyklusarrest in Phase G1 führt (Chen *et al.* 2002; Matsuzaki 2012; Pardali *et al.* 2005; Seoane 2006).

Außerdem bindet der Smad-Komplex an den wachstumsfördernden Transkriptionsfaktor c-Myc und inhibiert diesen, wodurch dessen hemmende Wirkung auf die Differenzierung von Zellen aufgehoben wird (Shachaf *et al.* 2004). Wu *et al.* (2014b) und Zhu *et al.* (2013) stellten bei DACH1-Expression in ösophagealen Plattenepithelkarzinomzellen bzw. hepatozellulären Tumorzellen eine vermehrte Phosphorylierung von Smad3 fest. Wu *et al.* (2003) berichteten allerdings von einer über die Bindung von Smad4 erreichten Inhibition des TGF β -Signalwegs durch DACH1 in Mammakarzinomzellen. Es wurde aber wiederum von Wu *et al.* (2008, 2006a) auch beim Mammakarzinom eine tumorsuppressive und Metastasen inhibierende Wirkung von DACH1 beschrieben. Dies lässt sich möglicherweise auf die paradoxe Rolle des TGF β zurückführen. Während es in frühen Tumorstadien das Wachstum unterdrückt, fördert es in späten Stadien die Invasion des Tumors (Azuma *et al.* 2005; Leivonen *et al.* 2006; Leivonen und Kahari 2007; Massague *et al.* 2000; Zu *et al.* 2012).

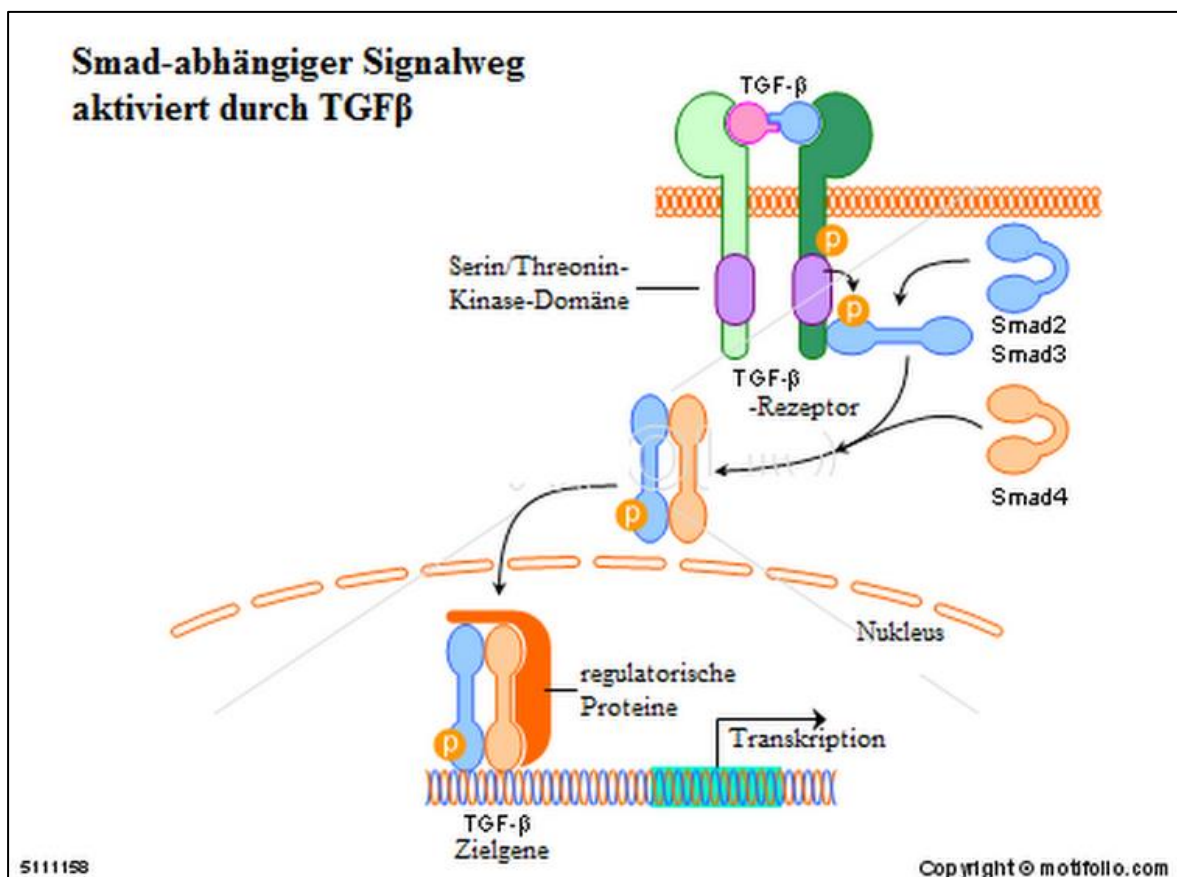


Abbildung 1.28: Smad-abhängiger Signalweg aktiviert durch TGF β (verändert nach Biology Medicine PowerPoint Presentations, Templates, Images, Diagrams, Slides 2011).

Bei Aktivierung des TGF β -Rezeptors durch TGF β phosphoryliert dieser Smad2/3, welche daraufhin mit Smad4 assoziieren, in den Nucleus translozieren und dort über regulatorische Proteine die Transkription vieler Gene beeinflusst.

Ein weiteres Zielgen von DACH1, was den Zellzyklus beeinflusst, ist das für Zyklin D1 (Chu *et al.* 2014). Dieses inhibiert das Retinoblastomprotein (Rb-Protein) (siehe 1.6.6) und hebt dadurch dessen hemmende Wirkung auf die DNA-Synthese auf. Zyklin D1 fördert also den Übergang der Zelle von der G₁- in die S-Phase und die Unterdrückung der Transkription durch DACH1 resultiert in einem Zellzyklusarrest. Nach Studien von Hedberg *et al.* (1999) exprimieren etwa 75% aller Nierenzellkarzinome Zyklin D1 in höherem Maße als gesundes Nierengewebe.

Im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen ist auch die epitheliale-mesenchymale Transition von Bedeutung (Wu *et al.* 2014a). Bei diesem physiologischerweise in der Embryonalentwicklung stattfindenden Prozess lösen Epithelzellen ihre Zellkontakte auf und exprimieren weniger Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin. Sie verlieren damit ihre epithelialen Eigenschaften und ermöglichen eine Zellmigration. Der onkogene Faktor Y-Box-bindendes Protein 1 (YB-1) induziert die epitheliale-mesenchymale Transition durch Regulation der Transkription von Zyklin A, Topoisomerase IIa und anderen Proteinen, die die Migration und zelluläre Invasion fördern (Jurchott *et al.* 2003; Shibao *et al.* 1999; Wu *et al.* 2014a). Wu *et al.* (2014a) konnten zeigen, dass DACH1 in Mammakarzinomzellen sowohl die nukleäre Transkription von YB-1-induzierten Genen, als auch durch direkte Bindung an zytoplasmatisches YB-1 dessen Translationsaktivität unterdrückt. SNAIL, Twist, ZEB2/Sip1 und andere Aktivatoren der epithelialen-mesenchymalen Transition werden damit nicht synthetisiert und die Tumorerkrankung inhibiert. Entsprechend korreliert ein erhöhtes Level an YB-1 mit der Aggressivität des Tumors (Evdokimova *et al.* 2009).

Iwai *et al.* (2010) beschrieb auch einen Einfluss von β -Catenin auf die Zelladhäsion und Morphologie durch Aktivierung der Matrix-Metalloproteinase 7 (MMP7). Ihre Funktion besteht im Abbau von extrazellulärer Matrix durch Degradation von Makromolekülen wie Casein, Gelatine Typ I, II, IV und V, sowie Fibronectin und Proteoglykanen (Yokoyama *et al.* 2008). Da DACH1 wie oben beschrieben das Level an β -Catenin im Zytoplasma verringert, unterdrückt es auch die Aktivität der MMP7.

DACH1 spielt aber nicht nur in der Pathogenese von Tumorerkrankungen eine Rolle, sondern ist laut Jain *et al.* (2007) und Vats *et al.* (2003) auch an der Entstehung von Nierendysplasien beteiligt. Wie eingangs erwähnt, hat *DACH1* einen Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Gewebe, darunter der Niere. Als Bestandteil des EYA-SIX-DACH-Netzwerks von Entwicklungsgenen reguliert DACH1 die Zelldifferenzierung während der Nephrogenese (Ikeda *et al.* 2002; Li *et al.* 2003; Popov *et al.* 2010). Nachdem gezeigt werden konnte, dass Mutationen von BMP4, einem Mitglied der TGF β -Familie, mit der Entstehung von renaler

Hypodysplasie assoziiert sind (Weber *et al.* 2008), und Mutationen in *DACH1* eine verstärkte Suppression des TGF β -Signalweges verursachen, nehmen Schild *et al.* (2013) an, dass Mutationen in beiden Genen synergistisch zu dem Phänotypen der renalen Hypodysplasie führen.

Insgesamt hat der Transkriptionsfaktor DACH1 also ein breites Wirkungsspektrum, laut Chu *et al.* (2014) variieren die Zielgene sogar gewebeabhängig (Watanabe *et al.* 2011; Wu *et al.* 2008), und es wäre nicht überraschend, wenn die Herunterregulation von *Dachshund* in den Nephrozyten der *Drosophila* morphologische und dadurch auch funktionelle Veränderungen bewirken würde.

1.6.6 DP Transkriptionsfaktor

Das Protein-kodierende Gen *DP Transkriptionsfaktor* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* des menschlichen Gens *TFDP2* (FlyBase Gene Report: Dmel\Dp).

DP Transkriptionsfaktor ist auf dem Führungsstrang des rechten Arms von Chromosom 2 von Stelle 13222,433 bis 13228,202 lokalisiert (siehe Abbildung 1.29) (FlyBase Gene Report: Dmel\Dp).

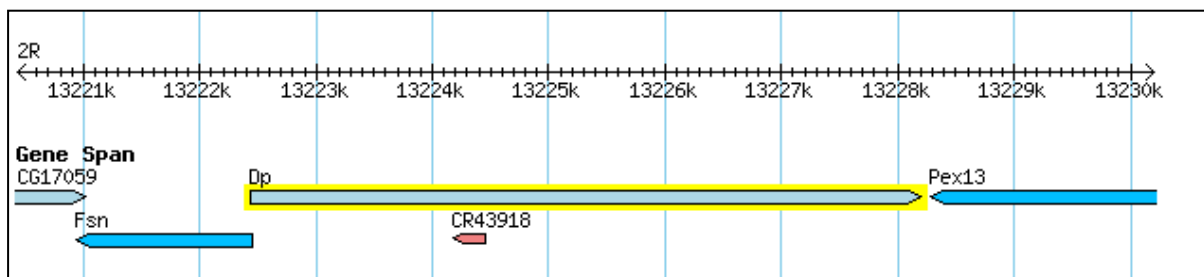


Abbildung 1.29: Lokalisation von *DP Transkriptionsfaktor* (FlyBase Web Development Group).

Die Gene *DP Transkriptionsfaktor* und *TFDP2* kodieren für den Transkriptionsfaktor DP bzw. DP2, welcher mit Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie Heterodimere bildet (Bandara *et al.* 1993; Helin *et al.* 1993b; Krek *et al.* 1993). Die primäre Dimerisations-Domäne der humanen Proteine besteht dabei aus einem sich wiederholenden Motiv von sieben hydrophoben Aminosäuren (Helin *et al.* 1993b).

Die DP/E2F-Heterodimere binden sequenzspezifisch DNA und haben durch die Regulation der Transkription von Genen des Zellzyklus eine große Wirkung auf die Zellproliferation und Apoptose (Dynlacht *et al.* 1994; Nevins 1992; Slansky und Farnham 1996). Viele Gene, deren Produkte in der S-Phase des Zellzyklus benötigt werden, weisen in ihrer Promotorregion mindestens eine DP/E2F-bindende Domäne auf. Dazu gehören die Gene, die für die DNA-Polymerase α , die Thymidinkinase, die Ribonuklein-Reduktase, die Dihydrofolat-Reduktase, das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA), Zyklin A, Zyklin E und Cdc2, c-Myc und c-

Myb kodieren (Blake und Azizkhan 1989; Dalton 1992; Hiebert *et al.* 1989; Lam und Watson 1993; Means *et al.* 1992; North *et al.* 1999; Slansky *et al.* 1993; Thalmeier *et al.* 1989; Yamaguchi *et al.* 1995, 1997). Ohne die Transkription dieser Gene verbleibt die Zelle in der G₁-Phase des Zellzyklus (Dynlacht *et al.* 1994; Nevins 1992).

Sowohl DP als auch E2F-Transkriptionsfaktoren weisen eine DNA-Bindedomäne auf. Experimente von Dynlacht *et al.* (1994) haben allerdings gezeigt, dass die Assoziation der beiden Proteine für die DNA-Bindung und die Funktion von essentieller Bedeutung ist. Während E2F allein nicht fähig ist, DNA zu binden, zeigt DP zwar eine geringe Affinität, die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA hat aber keine Auswirkungen auf die Transkription. Nach Dimerisation weist auch E2F eine DNA-Affinität auf und die von DP ist deutlich gesteigert.

Drosophila melanogaster weist nur eine Form des Transkriptionsfaktors DP und zwei verschiedene E2F-Proteine, E2F und E2F2, auf (Dynlacht *et al.* 1994; Hao *et al.* 1995; Sawado *et al.* 1998). In Säugern wurden dagegen die Transkriptionsfaktoren DP1 und DP2, sowie acht Mitglieder der E2F-Familie entdeckt (Bandara *et al.* 1993; Helin *et al.* 1993b; Hijmans *et al.* 1995; Trimarchi *et al.* 1998; Vairo *et al.* 1995; Weijts *et al.* 2012). Das menschliche Gen *TFDP2* kodiert für DP2. Die beiden DP-Proteine sind zu 70% homolog und können jeweils mit sechs der acht E2F-Proteine funktionelle Heterodimere bilden (Wu *et al.* 1995).

Diese lassen sich aufgrund ihrer Struktur, Funktion und Affinität zu den regulatorischen Proteinen der Pocket-Protein-Familie, die aus dem Retinoblastom-Protein (Rb), p107 (Rb-ähnliches Protein 1) und p130 (Rb-ähnliches Protein 2) besteht, in vier Gruppen einteilen (Sawado *et al.* 1998; Weijts *et al.* 2012). Heterodimere von DP-Proteinen und E2F1, E2F2 oder E2F3 aktivieren die Transkription von S-Phase-Genen und induzieren damit die DNA-Replikation (DeGregori *et al.* 1997; Lukas *et al.* 1996). DP/E2F6-Heterodimere konkurrieren mit DP/E2F1, DP/E2F2 und DP/E2F3 um die E2F-Bindedomänen der Promotorsequenzen der S-Phase-Gene und unterdrücken damit ihre Transkription (Trimarchi *et al.* 1998). Während die Transkriptionsfaktoren der ersten Gruppe von dem Rb-Protein reguliert werden, weist E2F6 keine Bindungsdomänen für regulatorische Proteine auf (Trimarchi *et al.* 1998). E2F4- und E2F5-Dimere interagieren mit den Proteinen p107 und p130 und werden vor allem von in der G₀-Phase ruhenden Zellen exprimiert (Hijmans *et al.* 1995; Vairo *et al.* 1995). Komplexe mit p130 wirken dort wahrscheinlich als transkriptionelle Repressoren (Hijmans *et al.* 1995; Johnson 1995; Vairo *et al.* 1995). E2F7 und E2F8 wirken nach Studien von Weijts *et al.* (2012) unabhängig von DP-Proteinen auf die Formation von Blutgefäßen. Ouseph *et al.*

(2012) konnten in Trophoblastentellen von Mäusen eine Bedeutung der beiden Faktoren für die Entwicklung des Fetus nachweisen, welche Prozesse dabei allerdings reguliert werden, ist noch unbekannt.

Das E2F-Protein von *Drosophila melanogaster* zeigt als Heterodimer mit dem DP-Protein eine aktivierende Wirkung auf die Transkription von Genen, deren Produkte für die DNA-Replikation wichtig sind (Duronio *et al.* 1995, 1998; Duronio und O'Farrell 1994; Royzman *et al.* 1997), und entspricht daher der ersten Gruppe der Säuger-E2F-Proteine (Sawado *et al.* 1998). Nach Ergebnissen von Sawado *et al.* (1998) verringert das Heterodimer DP/E2F2 dagegen nach Bindung an die DNA die Promotoraktivität. Beide weisen Bindedomänen für Rbf-Proteine (Retinoblastom-Familien-Proteine) auf, den Orthologen der *Drosophila* für die Pocket-Proteine Rb, p107 und p130 (Du *et al.* 1996; Dynlacht *et al.* 1994; Sawado *et al.* 1998). E2F bindet dabei an das Rbf1-Protein (Du *et al.* 1996; Ran *et al.* 2013; FlyBase Gene Report: Dmel\E2f1; FlyBase Gene Report: Dmel\Rbf), E2F2 kann sowohl an das Rbf1- als auch an das Rbf2-Protein binden (E2f2 - Transcription factor E2F2 - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly); FlyBase Gene Report: Dmel\E2f2).

Das Retinoblastom(Rb)-Protein ist das Produkt eines Tumorsuppressorgens. Es ist in vielen menschlichen Tumoren mutiert (Murphree und Benedict 1984). Durch Bindung an ein Transkriptions-aktivierendes DP/E2F-Heterodimer wird dieses gehemmt. Dabei scheint die DNA-Affinität des Heterodimers unbeeinflusst zu sein, aber die Aktivierung der Transkription bleibt aus (Hamel *et al.* 1992; Helin *et al.* 1993a; Hiebert *et al.* 1992; Zamanian und La Thangue 1992). Die Zelle kann daher den Zellzyklus nicht weiter durchlaufen, sie verbleibt in der G₁-Phase.

Zu dem Zeitpunkt, wenn eine Zelle in die S-Phase des Zellzyklus übergehen soll, wird Rb von Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) und Zyklinen phosphoryliert (siehe Abbildung 1.30) (Bartkova *et al.* 2003; Das *et al.* 2005; Korenjak und Brehm 2005; Munger und Howley 2002). Dabei wird eine erste Phosphorylierung von einem Komplex bestehend aus Zyklin D, CDK4 und CDK6 durchgeführt, die

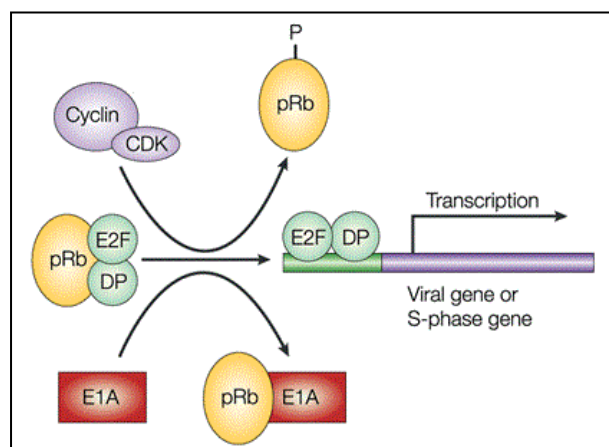


Abbildung 1.30: Aktivierung der Transkription viraler oder S-Phase-Gene durch E2F/DP (verändert nach Frisch und Mymryk 2002).

Das virale Protein E1A kann das Rb-Protein binden und damit die Inhibition der Transkription der von E2F/DP-regulierten Gene aufheben.

zweite von einem Komplex aus Zyklin E und CDK2 (Munger und Howley 2002). Wie in Abbildung 1.30 dargestellt, dissoziiert das Rb-Protein in der phosphorylierten Form von dem DP/E2F-Heterodimer ab und dieses kann dann die Transkription der S-Phase-Gene aktivieren (Chellappan *et al.* 1991; Hamel *et al.* 1992; Helin *et al.* 1992).

Die Wirkung lässt sich leicht auf die Interaktion zwischen dem Rbf1-Protein und DP/E2F von *Drosophila melanogaster* übertragen: Die Bindung des Rbf1-Proteins an das Heterodimer hemmt dieses und damit die Transkription der S-Phase-Gene.

Auch während einer viralen Infektion ist die Interaktion zwischen Rb-Protein und DP/E2F entscheidend. Wie in Abbildung 1.30 dargestellt, kann das virale Protein E1A das Rb-Protein binden und damit die Transkription der DP/E2F-abhängigen Gene aktivieren (Bagchi *et al.* 1990; Bandara und La Thangue 1991; Berk 1986; Chellappan *et al.* 1992; Nevins *et al.* 1988).

Nach Studien von Kwon *et al.* (2001) an *Drosophila* bewirkt das Heterodimer DP/E2F außerdem eine Aktivierung der Promotorsequenz des Gens *D-raf*, dem Ortholog des menschlichen Protoonkogens *c-raf-1*. Dieses kodiert für die Serin/Threonin-Kinase Raf-1, welche eine Komponente der Mitogen-aktivierten Proteinkinase(MAPK)-Kaskade, einem weit verbreiteten intrazellulären Signaltransduktionsweg, ist und zudem verschiedene extrazelluläre Signale vermittelt, welche die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (Crews und Erikson 1993; Davis 1993; Morrison *et al.* 1989; Rapp 1991; Roberts 1992). Es ist gezeigt worden, dass bei Säugern die Aktivierung von Raf-1 durch Wachstumsfaktoren mittels der MAPK-Kaskade die Transkription von Zyklin D1 steigert. Dieses bildet Komplexe mit Cdk4, welche durch Phosphorylierung das Rb-Protein inaktivieren, das einen Inhibitor von E2F darstellt (Cheng *et al.* 1998; Kwon *et al.* 2001; Ladha *et al.* 1998; Lavoie *et al.* 1996). Dadurch wird die Transkription der DP/E2F-abhängigen Gene gestartet. Kwon *et al.* (2001) übertrugen dies auf *Drosophila* und da laut ihrer Untersuchungen neben S-Phase-Genen auch *D-raf* zu den DP/E2F-Zielgenen gehört, schlussfolgerten sie, dass eine durch Wachstumsfaktoren stimulierte Transkription von *D-raf* eine sich selbst verstärkende Wirkung hat und der Zelle eine schnelle und kontinuierliche Proliferation ermöglicht.

Zusätzlich zur Regulation des Zellzyklus und der dadurch bedingten Kontrolle von Proliferation und Apoptose, hat das Heterodimer DP/E2F auch noch einen direkten Einfluss auf die Induktion der Apoptose. E2F1 reguliert bei Säugern die Transkription der Apoptosegene *Apaf1*, *Caspase 7*, *Caspase 3*, *p73* und *p19^{ARF}* (Aslanian *et al.* 2004; Irwin *et al.* 2000; Müller *et al.* 2001; Pediconi *et al.* 2003) und bei *Drosophila melanogaster* stehen die Schlüsselgene

der Apoptose *hid* und *rpr* (Hay und Guo 2006; Steller 2008) unter der Kontrolle von DP/E2F (Davidson und Duronio 2012; Moon *et al.* 2005; Tanaka-Matakatsu *et al.* 2009). In Studien von Ambrus *et al.* (2013) zeigten sich *DP*-mutierte Zellen resistent gegenüber Bestrahlungs-induzierter Apoptose. Bei DNA-Schäden blieb allerdings die Transkription der Apoptose-Gene auch in *DP*-mutierten Fliegen erhalten. Es konnte stattdessen ein Zusammenhang zu Mitochondrien-Dysfunktionen festgestellt werden. Mitochondrien-assoziierte Gene werden ebenfalls von DP/E2F reguliert und die *DP*-Mutationen führten zu einer abnormalen Form der Mitochondrien, sowie einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und einer geringeren ATP-Synthese, wobei sich die Phänotypen in Fliegen und Säugern ähnelten. Die Ausprägung der Mitochondrien-Defekte korrelierte negativ mit dem Maß der Bestrahlungs-induzierten Apoptose (Ambrus *et al.* 2013). Dies könnte damit zusammenhängen, dass laut Studien von Abdelwahid *et al.* (2007), Goyal *et al.* (2007) und Sandu *et al.* (2010) die Apoptose-Proteine von *Drosophila* in den Mitochondrien lokalisiert sind.

Der Transkriptionsfaktor DP weist damit als Dimerisationspartner von E2F zahlreiche Funktionen auf. Da DP1 und DP2 in Nieren von Säugern nachgewiesen wurden (Wu *et al.* 1995), ist es interessant zu untersuchen, ob und welche Effekte in den Nephrozyten der *Drosophila melanogaster* auftreten.

1.6.7 PIP5K59B

Das Protein-kodierende Gen *PIP5K59B* ist das Ortholog der *Drosophila melanogaster* des menschlichen Gens *PIP5K1B* (FlyBase Gene Report: Dmel\PIP5K59B).

PIP5K59B ist auf dem Führungsstrang des rechten Arms des Chromosoms 2 von Stelle 22874,769 bis 22881,436 lokalisiert (siehe Abbildung 1.31) (FlyBase Gene Report: Dmel\PIP5K59B).

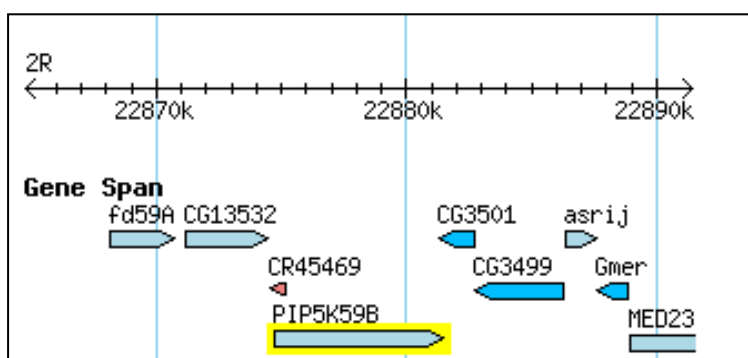


Abbildung 1.31: Lokalisation von PIP5K59B (FlyBase Web Development Group).

PIP5K59B und *PIP5K1B* kodieren für die Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (PIP5K). PIP5Ks kommen in der Zelle an verschiedenen Stellen vor (Loijens *et al.* 1996): in der

Plasmamembran (Carpenter und Cantley 1990; Jenkins *et al.* 1994; Ling *et al.* 1989; Smith und Chang 1989; Urumow und Wieland 1990), assoziiert mit dem Zytoskelett (Grondin *et al.* 1991; Payrastra *et al.* 1991), am Endoplasmatischen Retikulum (Helms *et al.* 1991), im Kern (Divecha *et al.* 1993a, 1993b; Payrastra *et al.* 1992) und auch im Zytosol (Jenkins *et al.* 1994; Ling *et al.* 1989; Moritz *et al.* 1993).

Sie katalysieren die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (siehe Abbildung 1.32), welchem verschiedenste Wirkungen zugeschrieben werden (Loijens *et al.* 1996). PIP₂ beeinflusst die Funktion von zahlreichen Enzymen einschließlich vieler Aktin-bindender Proteine (Janmey 1994), bindet die Pleckstrien-Homologie-Domäne von Signalproteinen (Harlan *et al.* 1994) und scheint in den Kreislauf der sekretorischen Vesikel involviert zu sein (Eberhard *et al.* 1990; Hay *et al.* 1995; Liscovitch und Cantley 1995). Durch die Herunterregulation der PIP5K könnte ein Mangel an PIP₂ bzw. ein Ungleichgewicht der verschiedenen Phosphoinositide, den phosphorylierten Formen von Phosphatidylinositol (PI), entstehen und damit die Zellhomöostase stark beeinträchtigt werden. Außerdem sind Auswirkungen auf die Zellentwicklung denkbar.

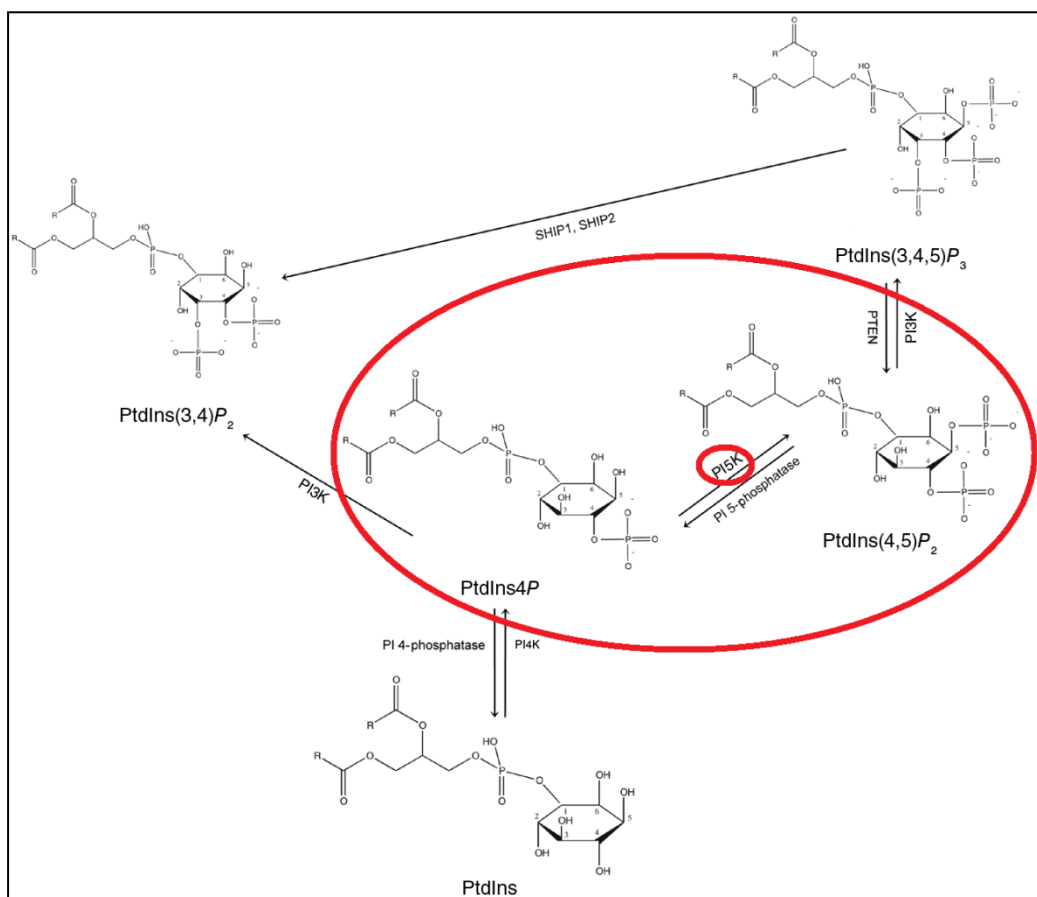


Abbildung 1.32: Phosphoinositide (verändert nach Krahn und Wodarz 2012).

Die PIP5K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂).

Phosphoinositide, die phosphorylierten Formen von Phosphatidylinositol (PI), sind in der Zelle an verschiedenen Lokalisationen zu finden: im Kern, im Cytoplasma, in der Plasmamembran und auch an Stellen, wo Vesikel mit der Plasmamembran fusionieren (Loijens *et al.* 1996). Die verschiedenen Phosphoinositide treten dabei an verschiedenen Lokalisationen unterschiedlich häufig auf. Während endosomale Membranen reich an Phosphatidylinositol-3-Phosphat sind, weisen die des Golgi-Apparats und die Plasmamembran vermehrt Phosphatidylinositol-4-Phosphat auf (Krahn und Wodarz 2012) und PIP_2 ist vor allem in der Plasmamembran lokalisiert (Tran *et al.* 1993).

Die Plasmamembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht. Phosphoinositide sind als polare Kopfgruppe von Glycerophospholipiden, einer großen Klasse der Phospholipide, Bestandteil der Plasmamembran (Krahn und Wodarz 2012). In einer polarisierten Epithelzelle von Säugetieren kommt PIP_2 vor allem auf der apikalen, Phosphatidyl-3,4,5-triphosphat (PIP_3) hauptsächlich auf der basolateralen Seite vor (Martin-Belmonte *et al.* 2007). Die Rekrutierung jeweils verschiedener Proteine trägt dazu bei, dass die Plasmamembran bezüglich ihrer Zusammensetzung große Unterschiede zwischen der apikalen und der basolateralen Seite aufweist (Krahn und Wodarz 2012). Diese Polarität ist für die Funktion der Zelle oftmals entscheidend (Krahn und Wodarz 2012). Bei einer Zelle des proximalen Nierentubulus zum Beispiel hängt von der Lokalisation der Kanäle ab, ob ein Stoff abgegeben oder aufgenommen wird, was letztendlich die Homöostase des Körpers bestimmt.

Auch während der Differenzierung von Podozyten spielt Polarität eine große Rolle. Die kuboiden Vorläuferzellen sind zunächst über apikale Zellkontakte verbunden, in deren Nähe sich der PAR-Komplex lokalisieren lässt, welcher aus den Proteinen Par3 und Par6, sowie der atypischen Proteinkinase C (aPKC) besteht (Simons *et al.* 2009). Die aPKC spaltet PIP_2 zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) (Loijens *et al.* 1996), die beide als Botenstoffe in den folgenden Entwicklungsschritten eine Rolle spielen könnten.

Der PAR-Komplex wandert mit den Proteinen des apikalen Zellkontaktes zur basolateralen Seite und rekrutiert Schlitzmembran-Proteine. Zusammen initiieren diese beiden Komponenten die Ausbildung der Fußfortsätze (Simons *et al.* 2009).

Der PAR-Komplex interagiert dabei mit den kleinen GTPasen Rac, Rho und Cdc42, um die Organisation von Membranen und dem Mikrotubuli- und Aktin-Skelett zu modulieren (Bryant und Mostov 2008; Iden und Collard 2008; Li und Gundersen 2008; Mellman und Nelson 2008). Die korrekte Lokalisation von Cdc42 an der apikalen Plasmamembran ist abhängig von dem Protein Annexin2, was wiederum von PIP_2 rekrutiert wird. Misslokationen

verursachen Defekte bezüglich der Zellform, was sich darauf zurückführen lässt, dass Cdc42 ein Regulator der Aktin-Polymerisation ist (Krahn und Wodarz 2012).

Damit sind zwei Ansätze für den Einfluss der PIP5Ks auf die Entwicklung der Podozyten denkbar: Das Produkt der von ihr katalysierten Reaktion, PIP₂, hat wie beschrieben zum einen eine Bedeutung bei der Lokalisation von Cdc42, zum anderen als Substrat der aPKC.

Zumindest die Relevanz der aPKC konnte experimentell schon dargestellt werden: Mäuse ohne die für Podozyten spezifische Isoform aPKC $\lambda/1$ wiesen Defekte in der Morphologie der Podozyten auf, die zu Proteinurie und Glomerulosklerose führten (Hirose *et al.* 2009; Huber *et al.* 2009).

Nephrozyten der *Drosophila* weisen mit der von kuboidalen Vorläuferzellen ausgehenden Formation einer Fußfortsatzstruktur mit Diaphragmata Ähnlichkeiten zu der Entwicklung von Podozyten auf. Daher ist es gut möglich, dass sich die an Podozyten gewonnenen Erkenntnisse auf Nephrozyten übertragen und sich Auswirkungen der verminderten Expression von PIP5K darstellen lassen. *Drosophila melanogaster* weist allerdings drei verschiedene PIP5Ks auf, sodass die Manipulation eines Gens, das für nur eine PIP5K kodiert, auch weniger große Auswirkungen zeigen könnte.

1.7 MicroRNA 210

Zusätzlich zu den Protein-kodierenden Genen, die in den GWAS auffällig wurden, werde ich mich mit der microRNA 210 (mir210) beschäftigen, da diese laut Zaparty *et al.* am Lehrstuhl für molekulare und zelluläre Anatomie in Regensburg unter Prof. Dr. Witzgall in der Mäuseniere sehr stark exprimiert wird.

Dazu wurde ein Überexpressions-Konstrukt von mir210 in die *Drosophila*-Embryonen injiziert und die Fliegen nach dem UAS-GAL4-System gekreuzt, was eine vermehrte Expression von mir210 zur Folge hatte.

Das erhöhte Expressionslevel von mir210 resultiert in einer verstärkten Wirkung auf die Expression ihrer Zielgene. Diese sind noch lange nicht vollständig erforscht, es sind aber schon verschiedene Wirkungen von mir210 publiziert worden.

Mir210 ist mit Hypoxie assoziiert, sauerstoffarme Bedingungen führen in allen Geweben zu einem verstärkten Vorkommen von mir210 (Ivan *et al.* 2008). Dies ist durch die positive Regulation durch den Hypoxie-induzierten Faktor HIF-1 α bedingt (Wang *et al.* 2014). Dieser ist, wie in Abbildung 1.33 dargestellt, unter normoxischen Bedingungen an zwei bestimmten Prolin-Resten hydroxyliert und kann deshalb von dem Hippel-Lindau-E3-Ligase-Komplex gebunden werden, was zur Ubiquitinierung und proteosomalen Degradation von HIF-1 α führt

(Jaakkola *et al.* 2001; Maxwell *et al.* 1999). Hypoxische Bedingungen verhindern die Hydroxylierung und damit den Abbau von HIF-1 α . Es akkumuliert und transloziert in den Nucleus, wo es mit HIF-1 β dimerisiert und Hypoxie-ansprechende Elemente (HREs) innerhalb der Promotorregion von Zielgenen bindet und transkriptionelle Koaktivatoren wie p300/CREB-bindendes Protein (CBP) rekrutiert (siehe Abbildung 1.33). Dadurch wird ein spezifisches Genexpressionsmuster aktiviert, welches die Zelle an mangelnde Sauerstoffversorgung anpasst (siehe Abbildung 1.33) (Wiesener *et al.* 2001).

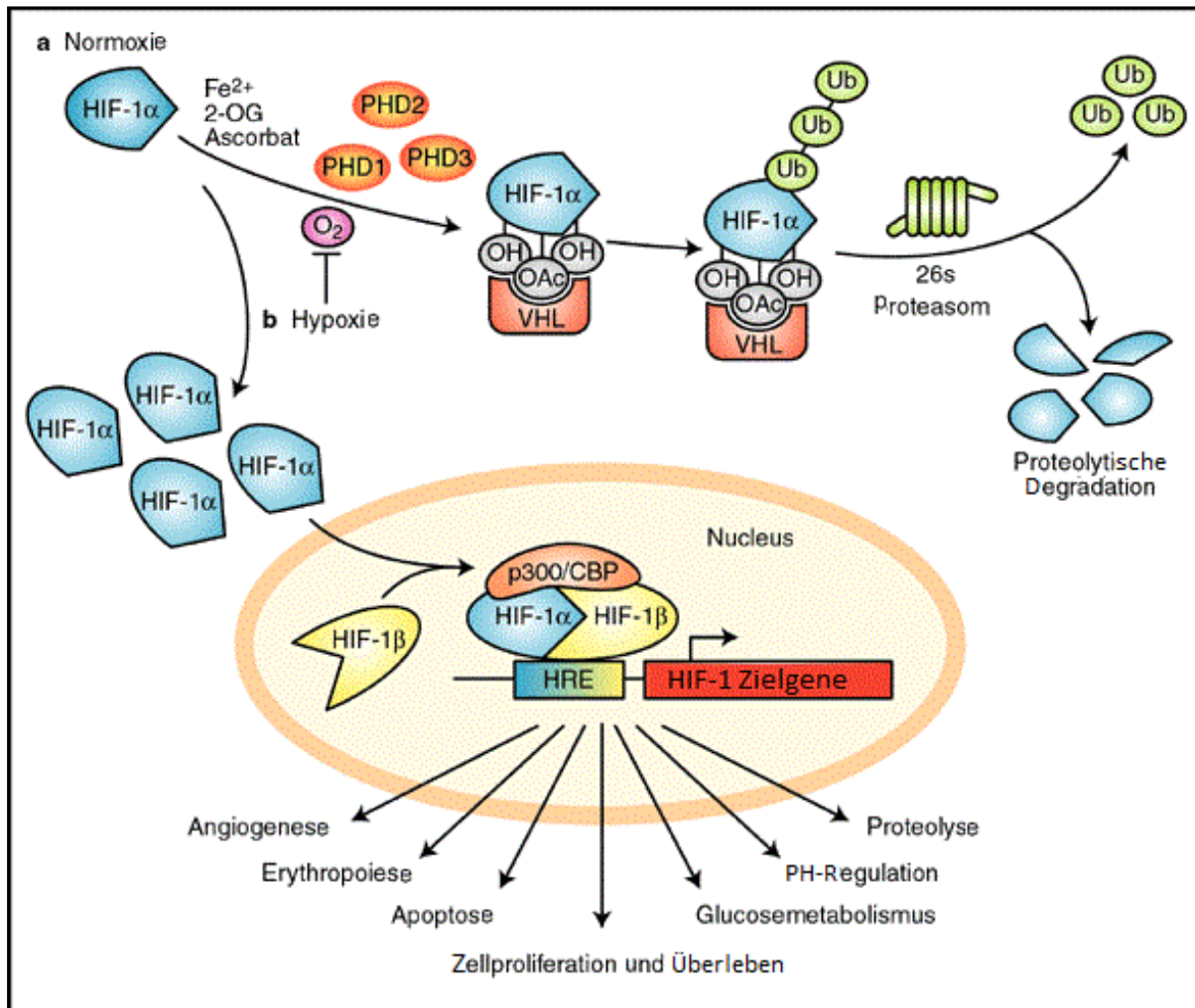


Abbildung 1.33: Regulation von HIF-1 α (verändert nach Carroll und Ashcroft 2005).

Während HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen ubiquitiniert und abgebaut wird, aktiviert es bei Sauerstoffmangel Gene, die den Organismus an die hypoxische Situation anpassen.

VHL (von-Hippel-Lindau) entspricht dem Hippel-Lindau-E3-Ligase-Komplex; Ub = Ubiquitin

Es beinhaltet zum Beispiel die Aktivierung des Erythropoetin-Gens und verursacht den metabolischen Shift von aerober mitochondrialer oxidativer Phosphorylation zu anaerober Glykolyse (Semenza 2007). Dafür werden die meisten glykolytischen Enzyme wie Laktatdehydrogenase A (LDH A) induziert, die Pyruvatdehydrogenase, welche die oxidative Decarboxylierung vermittelt, wird durch Aktivierung der Pyruvatdehydrogenasekinase (PDK)

inhibiert und die mitochondriale Biogenese wird unterdrückt (Wheaton und Chandel 2011; Zhang *et al.* 2007). Außerdem wird mir210 verstärkt exprimiert und hemmt über die Inhibition verschiedener Gene den Zitratzyklus und die mitochondriale Atmung (siehe Abbildung 1.34) (Chan und Loscalzo 2010; Devlin *et al.* 2011). HIF1 α und mir210 ermöglichen damit der Zelle eine höhere Resistenz gegenüber hypoxischen Zuständen, gleichzeitig ist die Energiebilanz der anaeroben Glykolyse aber deutlich schlechter als die des Stoffwechsels unter

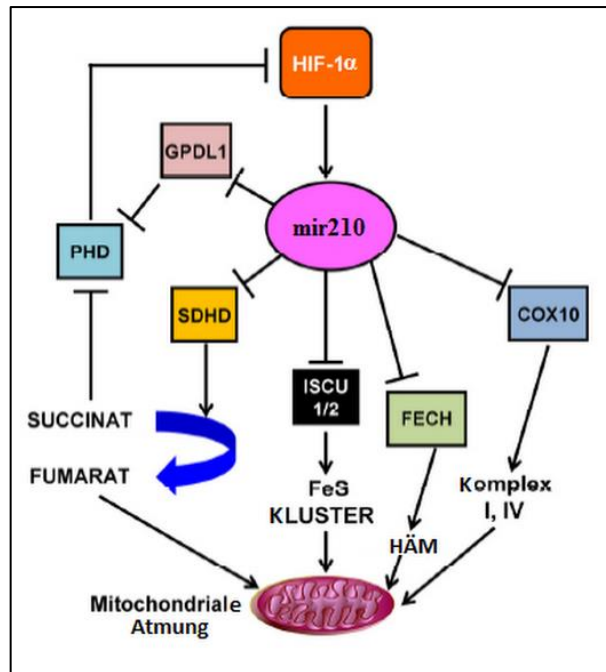


Abbildung 1.34: Einfluss von HIF-1 α auf die mitochondriale Atmung (verändert nach Magenta *et al.* 2013).

HIF-1 α hemmt über verschiedene Zwischenschritte die mitochondriale Atmung.

aeroben Bedingungen. Der ATP-Bedarf der Zelle könnte daher nur unzureichend gedeckt werden (Magenta *et al.* 2013). Zu den Zielgenen von mir210 gehören *ISCU 1* und *2*, welche für die Eisen-Schwefel-Kluster-Versammlungsenzyme 1 und 2 kodieren (Chan *et al.* 2009; Fasanaro *et al.* 2009). Eisen-Schwefel-Kluster sind Bestandteil verschiedener Zitratzyklus-komponenten und Elektronen-Transport-Ketten-Komplexe (Ye und Rouault 2010). Da mir210 auch den Transferrinrezeptor 1 reguliert (Yoshioka *et al.* 2012), ist sie in der Lage, die Entstehung von Eisen-Schwefel-Klustern zu unterdrücken ohne dass eine toxisch hohe intrazelluläre Eisenkonzentration entsteht (Chen *et al.* 2010). Mir210 hemmt außerdem die Expression der Ferrochelatase (FECH) (Qiao *et al.* 2013), welche das letzte Enzym in der Häm-Biosynthese ist, und *COX10* (Chen *et al.* 2010), das für die Cytochrom-C-Oxidase kodiert. Sowohl die Cytochrom-C-Oxidase als auch Häm sind ebenfalls Bestandteil verschiedener Atmungskettenkomplexe. Der Succinat-Dehydrogenase-Komplex ist sowohl Bestandteil des Zitratzyklus als auch der Elektronentransportkette und katalysiert die Reaktion von Succinat zu Fumarat. Da die mRNA an ihrer Untereinheit D (SDHD) von mir210 gebunden wird (Puissegur *et al.* 2011), akkumuliert bei deren Expression Succinat, was wiederum die HIF1 α -inhibierende HIF α -Prolyl-Hydroxylase (PHD) hemmt (Selak *et al.* 2005). Gleichzeitig wird diese allerdings durch mir210 aktiviert, da die die PHD inhibierende Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Ähnliche 1 (GPDL1) ebenfalls von mir210 reguliert

wird (Fasanaro *et al.* 2009). Welcher Effekt überwiegt ist nicht beschrieben. Magenta *et al.* (2013) hielten aber fest, dass der durch *HIF1a* kodierte HIF1 α und mir210 sich demnach sowohl vorwärts als auch rückwärts regulieren.

Diesen Zusammenhang beschrieben auch Wang *et al.* (2014). Sie stellten fest, dass HIF1 α nach der Aktivierung von T-Zellen direkt an die Promotorregion von mir210 bindet und dieses daraufhin stark exprimiert wird. Mit dem Anstieg von mir210 sinken allerdings die HIF1 α -Spiegel. Weitere Forschungen zeigten, dass *HIF1a* eine mir210-Binde-Sequenz aufweist und die negative Rückkoppelung durch direkte Bindung von mir210 an die mRNA erfolgt.

Des Weiteren inhibiert HIF1 α durch die Induktion der glykolytischen Enzyme die Differenzierung von T_H17-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Dang *et al.* 2011; Shi *et al.* 2011). T_H17-Zellen sind zum einen für die Immunantwort bei bakteriellen und Pilzinfektionen im Darm und in der Lunge verantwortlich (Korn *et al.* 2009), zum anderen erhalten sie aber auch Autoimmunpathologien wie Kollagen-induzierte Arthritis, Autoimmunenzephalopathie und entzündliche Darmerkrankungen aufrecht (Fife *et al.* 2009; Weaver *et al.* 2007; Wu *et al.* 2009). Bei Mäusen mit entzündlichen Darmerkrankungen konnten durch Überexpression von mir210 die Mukosainfiltration mit Leukozyten und der Gewichtsverlust der Mäuse reduziert werden (Wang *et al.* 2014). Mir210 spielt also durch die Regulation von HIF1 α eine wichtige Rolle bezüglich Immunpathologien. Die Expression von mir210 bleibt dabei immer von den Sauerstoffverhältnissen beeinflusst. In Zellen, die aus einem hypoxischen Gewebe stammen, konnten viel höhere mir210-Spiegel nachgewiesen werden als in Zellen, in denen normoxische Bedingungen vorherrschen (Wang *et al.* 2014).

Analog dazu wurde mir210 vermehrt in Kardiozyten nach einem Herzinfarkt gefunden (Li *et al.* 2011). Neben den beschriebenen Anpassungen an hypoxische Bedingungen induziert sie nach Studien von Puissegur *et al.* (2011) angiogenetische Faktoren wie Interleukin 1 α , Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Leptin. Außerdem supprimiert sie die Expression des Angiogenese-Inhibitors Ephrin A3 (Efn3) und der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1b (Ptp1b), welche über die Phosphorylierung apoptotischer Proteine wie Caspase 3 und Caspase 8 an der Induktion der Apoptose beteiligt ist (Ho *et al.* 2010). Mir21 bewirkt also eine erneute Vaskularisierung und verhindert den Untergang weiteren Herzgewebes.

In Studien von Qiu *et al.* (2013, 2014) wurde die Verhinderung der Apoptose durch mir210 als neuroprotektiver Effekt gegenüber Oxygen-Glukose-Deprivation in Phäochromozytomzellen von Ratten untersucht. Die Versuche zeigten entsprechend der bisherigen Erläuterungen einen erhöhten Spiegel an mir210 nach vierstündiger Oxygen-Glukose-

Deprivation gegenüber Zellen unter normoxischen Bedingungen. Mir210-Suppression bei hypoxischen Bedingungen erhöhte die Apoptoserate. In dem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass in Zellen mit überexprimierter mir210 die Level der proapoptischen Proteine Bax, Caspase 3 und Caspase 9 erhöht waren und dass das antiapoptische Protein Bcl2 dagegen vermindert vorkam. Sie stellten daher die Hypothese auf, dass mir210 das Absterben der Neurone bei hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie verhindern oder wenigstens verringern könnte.

Auch Tumoren verursachen zum Teil hypoxische Verhältnisse. In Zellen eines Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus wurde eine verstärkte Expression von mir210 nachgewiesen. Sie unterdrückte hier die Proliferation der Tumorzellen durch Bindung an die 3' untranslated Region der mRNA der Proteinkinase PLK1 (Polo-like Kinase 1), was deren Inhibition zur Folge hat (Li *et al.* 2014).

Die PLK1 ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase in Säugern, ähnelt funktionell stark der Kinase Polo von *Drosophila* und übt viele Effekte auf den Zellzyklus aus. Diese wurden von Zhou *et al.* (2008) in Adenokarzinomzellen der Lunge untersucht. Es zeigte sich, dass signifikant weniger Zellen mit inhibierter PLK1-Expression in der S-Phase des Zellzyklus zu finden waren und stattdessen am Übergang von der G2- zur M-Phase verblieben und teilweise apoptotisch reagierten. Grund hierfür ist die Bedeutung der PLK1 für die DNA-Synthese während der S-Phase (Li *et al.* 1996) und den Eintritt der Zelle in die Mitosephase und den regelrechten Ablauf dieser. Die PLK1 phosphoryliert die CDC25C-Phosphatase, fördert damit ihre nukleäre Lokalisation und steigert ihre Aktivität. Diese besteht darin, die an Zyklin B gebundene Zyklin-abhängige Kinase 2 (CDK2) durch Dephosphorylierung zu aktivieren und damit die Mitose zu initiieren (Roshak *et al.* 2000; Toyoshima-Morimoto *et al.* 2002; van Vugt *et al.* 2001).

Während der Mitose wird die PLK1 dann für die Reifung des Zentrosoms, die bipolare Spindelformation, Regulation des Anaphase-fördernden Komplexes und die Ausführung der Zytokinese benötigt (Doxsey 1998; Liu und Erikson 2002; Lane und Nigg 1996).

In Zellen mit einem hohen mitotischen Index ist die Aktivität der PLK1 daher sehr stark erhöht und bei Tumoren mit einer Progression assoziiert (Golsteyn *et al.* 1994; Holtrich *et al.* 1994; Smith *et al.* 1997).

Dies wird dadurch unterstützt, dass die PLK1 auch die Stabilität des Tumorsuppressorproteins p53 verringert (Mao *et al.* 2001). P53 erhöht die Expression von p21, welches sowohl den Cyclin D/CDK4/6-Komplex als auch den Cyclin E/CDK2-Komplex und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktor E2F hemmt, welcher den Zellzyklus weiterführen

würde. Gleichzeitig werden von p53 DNA-Reparaturmechanismen aktiviert. Der auf diese Weise erreichte Schutz einer Zelle vor fehlerhafter Replikation und ungehemmtem Wachstum wird also durch die PLK1 geschwächt.

Eine Verhinderung der Tumorproliferation durch Inhibition der PLK1 wurde neben den Studien von Li *et al.* (2014) auch bei Versuchen von Liu und Erikson (2003) und Spankuch-Schmitt *et al.* (2002) bei Zervixkarzinom-, Mammakarzinom- und kolorektalen Adenomenzellen beobachtet. Tumorpatienten mit hohen Leveln an PLK1 haben daher eine schlechtere Prognose als solche mit einem niedrigeren Leveln (Cogswell *et al.* 2000).

Während dies also eine Tumor-suppressive Wirkung von mir210 impliziert, wurden von Valera *et al.* (2011) erhöhte Level an mir210 in höhergradigen Tumoren und bei Befall von Lymphknoten beschrieben. Auch klarzellige Nierenzellkarzinome zeigten in Studien von Valera *et al.* (2011) eine besonders hohe Expression von mir210 wenn sie mit Tumoren nicht-klarer Zellhistologie verglichen wurden und es wurde mir210 und anderen miRNAs eine zentrale Rolle in der Pathogenese zugeschrieben.

Aufgrund der beschriebenen vielfältigen Wirkungen von mir210 und der verstärkten Expression in Mäusenieren ist es interessant zu sehen, ob die Überexpression von mir210 auch in den Nephrozyten morphologische oder funktionelle Veränderungen hervorruft.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien und Lösungen

Name	Inhaltsstoffe	Verwendung
Aceton	Sigma-Aldrich Aceton	Entwässerung, Mikrowelle
Agarose (low melt)	PBS; 1% NuSieve low melt agarose	Einbettungsmedium
Cacodylat-Puffer 0,1M	H ₂ O; 21,4g Natriumcacodylat-Trihydrat	Waschpuffer, Mikrowelle
DAPI	PBS (1x); 25µg/ml DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Färbungslösung
Epon	23g Glycerolether; 15,4g DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydrid); 10,2g MNA (Methyl nadic Anhydrid); 0,77g DMP (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol)	Einbettungsmedium
Glutardialdehyd	Cacodylat-Puffer 0,1M; 2% Glutardialdehyd	Fixationslösung
HL3.1Saline	0,07 mol/l NaCl; 0,005 mol/l KCl; 0,0015 mol/l CaCl ₂ x 2 H ₂ O; 0,004 mol/l MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 0,01 mol/l NaHCO ₃ ; 0,005 mol/l Trehalose; 0,115 mol/l Sucrose; 0,005 mol/l HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) pH 7,1	Präpariermedium

Mowiol	4.8g Mowiol 4-88; 12g Glycerol; 36ml PBS pH 7,4	Einbettungsmedium
0,4% Osmiumtetroxid (OsO ₄)	2ml 2% OsO ₄ ; 8ml Cacodylat-Puffer 0,1M	Kontrastierung, Mikrowelle
10x PBS (Phosphat-Puffer-Lösung)	1,37 mol/l NaCl; 0,027 mol/l KCl; 0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ ; 0,018 mol/l KH ₂ PO ₄	Waschpuffer Stammlösung (Arbeitslösung zehnfach mit H ₂ O verdünnt)
PFA	PBS (1x); 4% PFA (Paraformaldehyd)	Fixationslösung
Pioloform	Chloroform; 1,5% Polyvinylbutyral	Gridbeschichtung für TEM
Uranylacetat	H ₂ O; 2% Uranylacetat	Nachkontrastierung

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Lösungen.

2.1.2 Geräte und Software

Geräte

- Automatische Mikrowelle Leica EM AMW
- Pyramitom Bromma 11800
- Ultramikrotom Leica EM UC7
- Transmissionselektronenmikroskop Zeiss TEM 902
- Fluoreszenzbinokular Leica MZ 10F
- Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss LSM 710

Software

- SYSPROG Image SP (Betriebsprogramm TEM)
- Adobe Photoshop CS5 (Bildbearbeitungsprogramm)
- Zeiss ZEN 2011 (Betriebsprogramm LSM)
- Image J (Auswertung der Fluoreszenz-Werte)
- Microsoft Word 2010 (Schreibprogramm)
- Microsoft Excel 2010 (Tabellenkalkulationsprogramm)
- Microsoft Paint (Bildbearbeitungsprogramm)

- Swiss Academic Software Citavi (Literaturverwaltungsprogramm)

2.1.3 Fliegenstämme

Für die Herunterregulation der Kandidatengene und die Überexpression der mir210 wurden transgene Fliegen mit einer Upstream-Activating-Sequenz (UAS) vor dem Zielgen mit transgenen Fliegen gekreuzt, welche kontrolliert durch den für Garland-Nephrozyten spezifischen Promotor *sns::GAL4* in den Nephrozyten den Transkriptionsfaktor GAL4 exprimieren (siehe 1.5.1). Diese Treiberlinie wurde vom Institut für Anatomie und Zellbiologie des „Stowers Institut for Medical Research“ in Kansas City, Missouri, zur Verfügung gestellt. Die anderen Fliegen stammen von dem Vienna Drosophila Resource Center (VRDR) oder dem National Institute of Genetics (NIG-FLY). Der Genotyp, bei dem das Zielgen für die microRNA 210 kodierte, wurde im Institut für molekulare und zelluläre Anatomie der Universität Regensburg selbst hergestellt.

Genotyp	Chromosom	Stammnummer	Kategorie
<i>Sns::GAL4</i>	2	Stowers Institut	Treiberlinie
<i>UAS::SNFAγ RNAi</i>	2	17299R-1 (NIG-FLY)	RNAi
<i>UAS::CG9413 RNAi</i>	3	45178 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::CG16717 RNAi</i>	2	105831 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::CG32702 RNAi</i>	3	14613, 14614 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::Dachshund</i>	2	106040 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::Dp RNAi</i>	2	12722 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::PIP5K59B RNAi</i>	3	47027 (VRDR)	RNAi
<i>UAS::mir210</i>	2	Universität Regensburg	RNAi

Tabelle 3: Verwendete Fliegenstämme.

2.2 Methoden

2.2.1 Untersuchung der Morphologie

Um die Morphologie der Nephrozyten beurteilen zu können, wurden Nephrozyten-Gewebeproben für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet. Dazu waren mehrere Arbeitsschritte erforderlich.

Präparation

Zur Präparation der Garland-Nephrozyten wurden *Drosophila*-Larven im dritten Larvenstadium herangezogen. Die Larven wurden ab dem ersten Larvenstadium auf konstant 29°C

gehalten. Zum bestmöglichen Erhalt der Nephrozyten wurde die Präparation in kalter HL3.1 Saline durchgeführt, wobei der Ventrikel mit den Blindschläuchen und dem Proventrikel zusammen mit dem Ösophagus und den darum liegenden Nephrozyten vom restlichen Darm abgetrennt wurde. Dieses Gewebestück wurde anschließend in 2% Glutardialdehyd in PBS (Phosphat Buffer Solution) eine Stunde lang auf einem Schüttler fixiert.

Einbettung

Danach sollten die Nephrozyten in Epoxidharzblöcke (Eponblöcke) eingebettet werden.

Dazu wurde zunächst 1% low-melt-Agarose (in PBS) im Wasserbad auf 37-40°C erwärmt. Das seziierte Gewebestück wurde in ca. 15µl flüssiger Agarose aufgenommen und auf einen kalten Metallblock getropft. Durch Kühlung härtete die Agarose aus.

Die Agarose-Tropfen mit den Nephrozyten wurden dann mithilfe der Automatischen Mikrowelle in Eponblöcke eingebettet. Dazu wurden die Agarosetropfen in den Plastiksieben des Geräts platziert und durchliefen dann die unten aufgelisteten Schritte des Programms „Dro-nephroc-fast 1“. Die Gefäße mussten vorher entsprechend des Protokolls befüllt werden.

Gefäß	Arbeits-schritt	Zeit (hh:mm:ss)	Max. Temp. (°C)	Reagenz	Modus	Max. Leistung (W)
1	1	00:02:30	37	0.1M Cacodylat (pH 7.3)	kontinuierlich	25
	2	00:00:10	20		kontinuierlich	0
2	1	00:02:30	37	0.1M Cacodylat (pH 7.3)	kontinuierlich	25
	2	00:00:10	20		kontinuierlich	0
3	1	00:05:20	37	0.1M Cacodylat (pH 7.3)	kontinuierlich	25
	2	00:00:10	20		kontinuierlich	0
	3	00:00:10	20		kontinuierlich	25
4	1	00:02:00	37	0.4% OsO ₄ , 0,1 M Cacodylat	pulsierend	15
	2	00:02:00	37		kontinuierlich	0
	3	00:02:00	37		steigend	15
	4	00:02:00	37		pulsierend	20
	5	00:02:00	37		kontinuierlich	0
	6	00:02:00	37		pulsierend	15
5	1	00:05:40	37	Aceton 50%	kontinuierlich	10
6	1	00:05:40	37	Aceton 70%	kontinuierlich	10
7	1	00:05:40	37	Aceton 95%	kontinuierlich	10
8	1	00:05:00	37	Aceton abs.	kontinuierlich	10
9	1	00:05:30	37	Aceton abs.	kontinuierlich	20
10	1	00:10:00	37	Epon 3:1 (7,5 ml Aceton +2,5 ml Epon)	kontinuierlich	20
11	1	00:15:00	37	Epon 1:1 (5 ml Aceton + 5ml Epon)	kontinuierlich	20
12	1	00:20:00	37	Epon 1:3 (2,5 ml Aceton +7,5 ml Epon)	kontinuierlich	20
13	1	00:10:00	40	Epon	kontinuierlich	10
14	1	00:30:00	50	Epon	kontinuierlich	12

Tabelle 4: Automatische Mikrowelle, Programm „Dro-nephroc-fast 1“.

Cacodylat, auch Dimethylarsinsäure, ist eine metallorganische Verbindung des Arsens und mit der verwendeten 0,1M Cacodylat-Pufferlösung wurde das Fixans ausgewaschen. Osmiumtetroxid diente zur Kontrastierung für das Transmissionselektronenmikroskop.

Als nächstes erfolgte eine Dehydratation, wobei das Wasser durch Aceton ersetzt wurde. Dieses wurde wiederum schließlich in den nachfolgenden Schritten vom Epon verdrängt.

Das Ergebnis dieses Durchlaufs waren kleine Plättchen aus Epon und Agarose, die die Nephrozyten enthielten. Sie wurden nun in einem Förmchen platziert und dieses mit frischem Epon aufgefüllt. Die Förmchen wurden gestapelt und erneut in die Mikrowelle gegeben. Durch das Programm „Poly Epon“ polymerisierte das Epon aus.

Gefäß	Arbeits-schritt	Zeit (s)	Max. Temp. (°C)	Reagenz	Pause	Modus	Max. Leistung (W)
1	1	300	63	Epon	Keine	steigend	30
	2	300	75		Keine	steigend	30
	3	900	83		Keine	steigend	30
	4	6300	83		Keine	kontinuierlich	30

Tabelle 5: Automatische Mikrowelle, Programm „Poly Epon“.

Schneiden:

Die Eponblöcke wurden mit dem Pyramitom auf eine optimale Form zur Herstellung von Ultradünnschnitten (50-70nm Dicke) vorbereitet. Diese Schnitte wurden mithilfe eines Ultramikrotoms hergestellt und jeweils auf einem Pioloform-Grid fixiert.

Nachkontrastierung:

Für einen optimalen Kontrast im Transmissionselektronenmikroskop wurden die Schnitte mit 2% Uranylacetat in Wasser 20-30min im Dunkeln nachkontrastiert. Danach wurden die Grids fünf- bis sechsmal mit Bidest gewaschen und vollständig getrocknet.

Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Anschließend wurden die Schnitte im Zeiss TEM 902 betrachtet und die Nephrozyten konnten hinsichtlich ihrer Morphologie beurteilt werden.

2.2.2 Untersuchung der Funktion

Um festzustellen, inwiefern die Funktionalität der Garland-Nephrozyten durch die Ausschaltung der Kandidatengene beeinträchtigt ist, sollte die Filtrationsfähigkeit bzw. -aktivität bestimmt werden. Diese ließ sich über einen Fluoreszenz-Assay quantifizieren, indem der relative Gehalt an filtriertem GFP (grün fluoreszierendes Protein) in den Nephrozyten bestimmt wurde.

Bei den in diesem Experiment untersuchten Larven musste demnach nicht nur das Zielgen über das UAS/GAL4-System ausgeschaltet sein, sondern sie mussten auch GFP in die Hämolymphe sezernieren. Über das Konstrukt Ubi::ANP-GFP-GFP wurde in den Larven eine ubiquitäre Produktion und Ausschüttung von GFP in die Hämolymphe erreicht.

Es wurden dann Fliegen nach folgendem Schema gekreuzt:

$$\frac{\text{sns::GAL4, ANP-GFP-GFP}}{\text{CyO}} \quad \times \quad \frac{\text{UAS::Kandidatengen-RNAi}}{\text{UAS::Kandidatengen-RNAi}}$$

„CyO“ steht für „Curly of Oyster“ und ist ein Balancer des Chromosoms 2. Dieser verhinderte, dass die Transgene *sns::GAL4* und *ANP-GFP-GFP*, deren Sequenzen ebenfalls auf Chromosom 2 lagen, durch Rekombination mit dem Schwesterchromosom verloren gingen.

Das Gen, das die Kandidatengen-RNAi kodierte, lag hinter der UAS-Sequenz. Dieser Fliegenstamm war homozygot.

Die erste Generation der Nachkommen wies demnach im Verhältnis 1:1 folgende Genotypen auf:

$$\frac{\text{sns::GAL4, ANP-GFP-GFP}}{+} ; \frac{\text{Kandidatengen-RNAi}}{+}$$

oder

$$\frac{\text{CyO}}{+} ; \frac{\text{Kandidatengen-RNAi}}{+},$$

wobei „+“ für das wildtypische Allel des jeweiligen Chromosoms steht.

Die Larven der zwei verschiedenen Genotypen wurden mithilfe eines Fluoreszenz-Binokulars unterschieden. Nur die GFP-produzierenden Larven konnten für diesen Versuch verwendet werden.

Die Garland-Nephrozyten der GFP-positiven Larven wurden dann in HL3.1 Saline entnommen und für eine Stunde in frischem 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS fixiert.

Danach erfolgten mehrere Waschgänge: Zunächst ließ man für 20min DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Arbeitskonzentration 25µg/ml) in PBS einwirken. Dann wurde dreimal 15min lang mit PBS gewaschen.

Zuletzt wurden die Präparate auf einen Objektträger übertragen und in Mowiol eingebettet.

Nach dem Trocknen (über Nacht) wurde die GFP-Intensität der Nephrozyten mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemessen und mithilfe des Programms „Image J“ ausgewertet.

Die GFP-Intensität der Nephrozyten der untersuchten Genotypen wurde mit der von wildtypischen Nephrozyten verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Morphologie

3.1.1 Wildtyp

Das elektronenmikroskopische Bild eines wildtypischen *Drosophila*-Nephrozyten wurde bereits in der Einleitung beschrieben (siehe 1.4). Der in Abbildung 1.4 und 1.5 dargestellte Nephrozyt ist wie die Nephrozyten der transgenen Larven entsprechend der in 2.2.1 beschriebenen Methodik untersucht worden.

3.1.2 *AMPK γ*

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *AMPK γ* herunterreguliert worden war, waren mit einem Quer- und Längsdurchmesser von etwa 20 μm x 30 μm im Vergleich zu den Nephrozyten anderer Genotypen leicht vergrößert und wiesen nur eine sehr schmale Randzone mit Lakunenstruktur auf. Die Fußfortsätze und Diaphragmata, sowie die Basalmembran waren allerdings gut ausgebildet (siehe Abbildung 3.1b). Hinsichtlich der Zellorganellen fiel auf, dass die untersuchten Zellen über ein stark ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum verfügten (siehe Abbildung 3.1a).

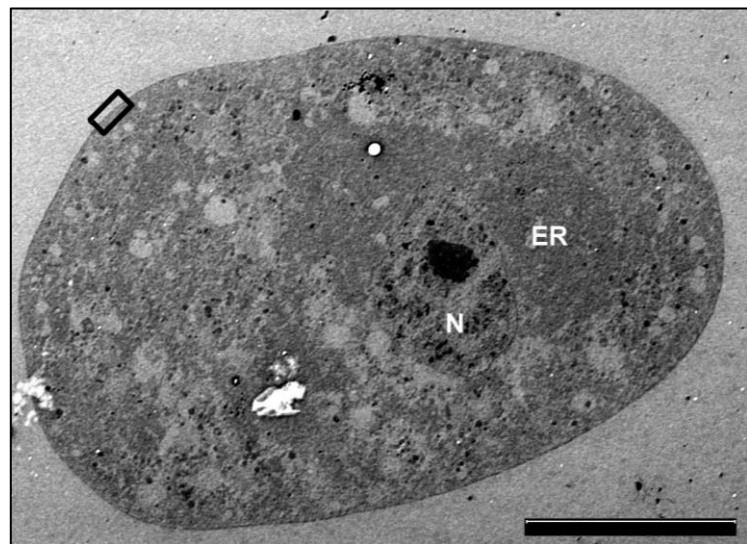


Abbildung 3.1a: Nephrozyt des Genotyps *AMPK γ* im Überblick. Maßstabsbalken entspricht 10000nm. In der Vergrößerung ist sichtbar, dass das endoplasmatische Retikulum stark ausgebildet ist. ER= Endoplasmatisches Retikulum; N= Nukleus

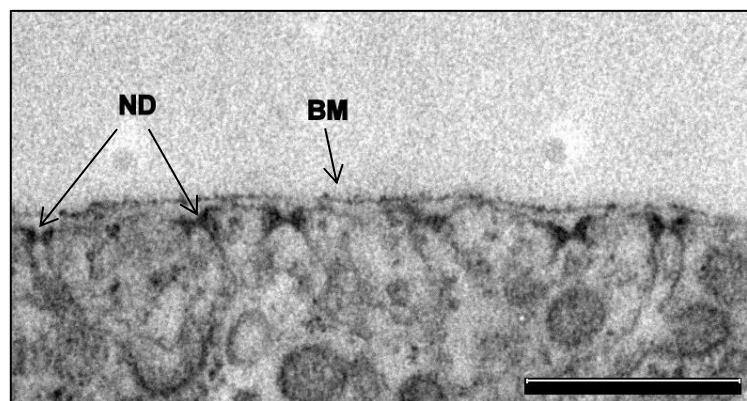


Abbildung 3.1b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *AMPK γ* . Maßstabsbalken entspricht 500nm. In der schmalen Randzone sind die Nephrozytendiaphragmata und die Basalmembran deutlich zu erkennen. BM= Basalmembran; ND= Nephrozytendiaphragma

3.1.3 CG9413

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *CG9413* herunterreguliert worden war, zeigten hinsichtlich der Morphologie keine Veränderungen. Dem Wildtyp entsprechend war der Randbereich, wie in Abbildung 3.2b zu sehen, komplex entwickelt und wies Lakunen, Fußfortsätze, Diaphragmata und eine Basalmembran auf. Das Zytoplasma enthielt regelrecht erscheinende Zellorganellen (siehe Abbildung 3.2a).

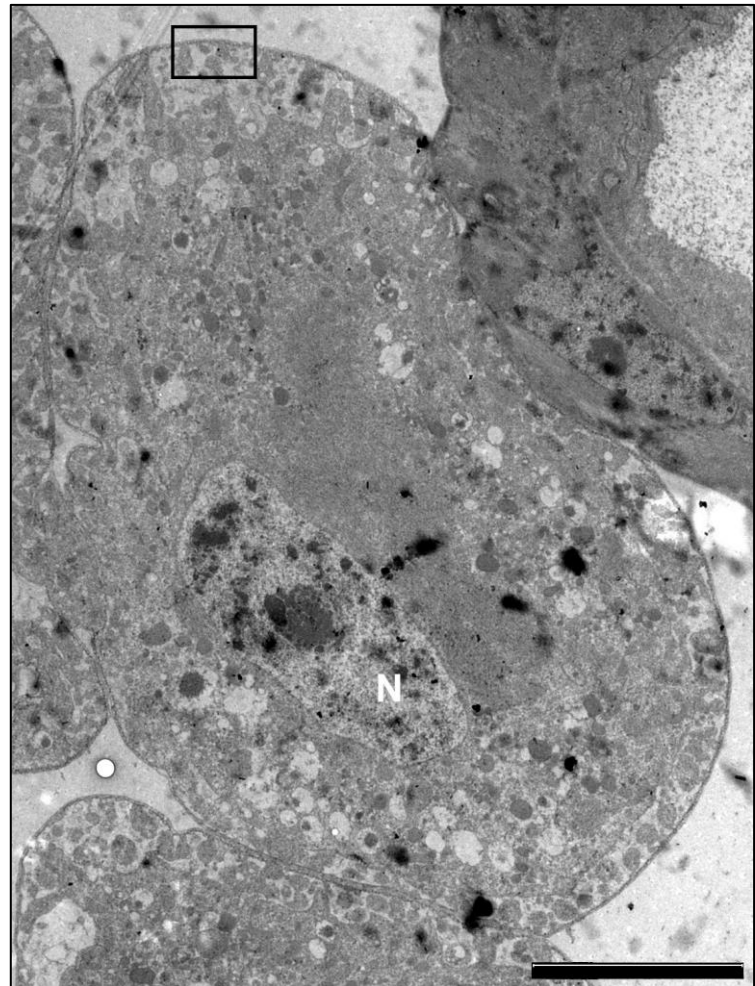


Abbildung 3.2a: Nephrozyt des Genotyps *CG9413* im Überblick. Maßstabsbalken entspricht 5000nm. Der Nephrozyt ist regelrecht geformt und weist keine Auffälligkeiten auf. N= Nukleus

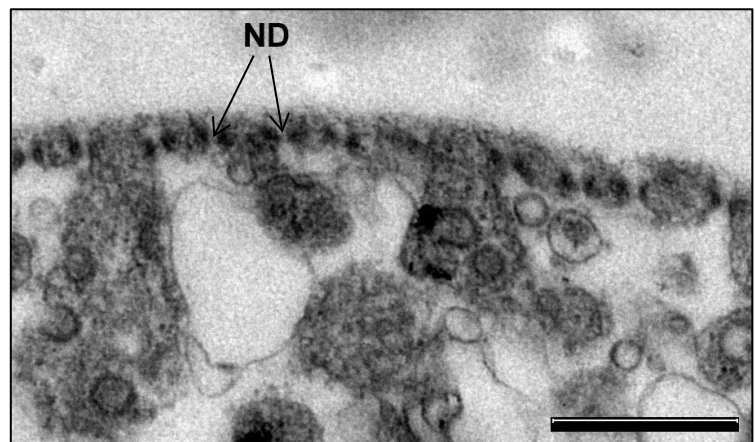


Abbildung 3.2b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG9413*. Maßstabsbalken entspricht 500nm. Die Randzone weist Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf. N= Nephrozytendiaphragma

3.1.4 CG16717

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *CG16717* herunterreguliert worden war, wiesen keine morphologischen Besonderheiten auf. Wie in Abbildung 3.3b zu sehen, war im Randbereich die Lakunenstruktur gut ausgebildet und es ließen sich die Fußfortsätze, Diaphragmata und die Basalmembran deutlich erkennen. Auch die Zellorganellen waren regelrecht entwickelt (siehe Abbildung 3.3a).

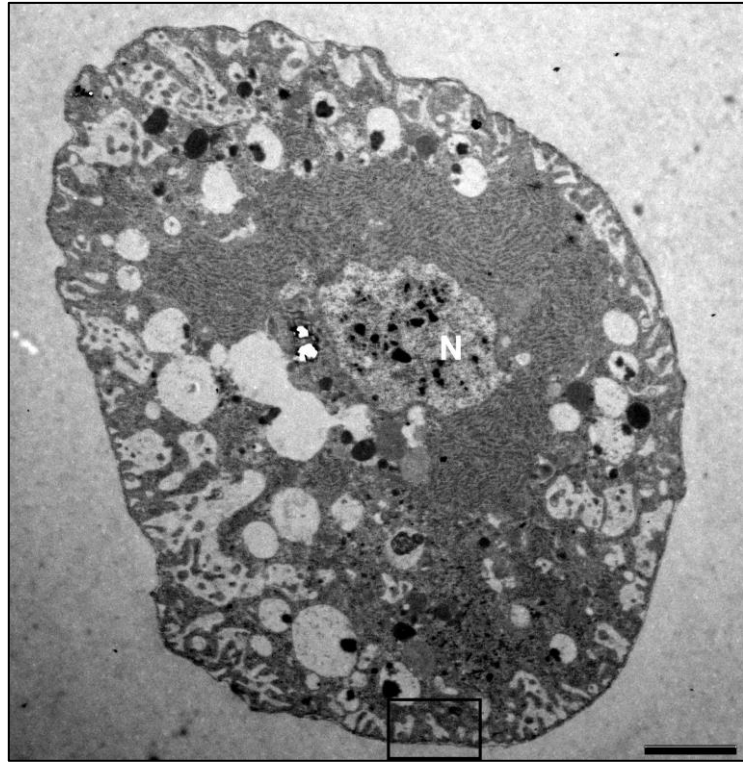


Abbildung 3.3a: Nephrozyt des Genotyps *CG16717* im Überblick. Maßstabsbalken entspricht 2500nm.

Der Nephrozyt ist regelrecht geformt und weist keine Auffälligkeiten auf.

N= Nukleus

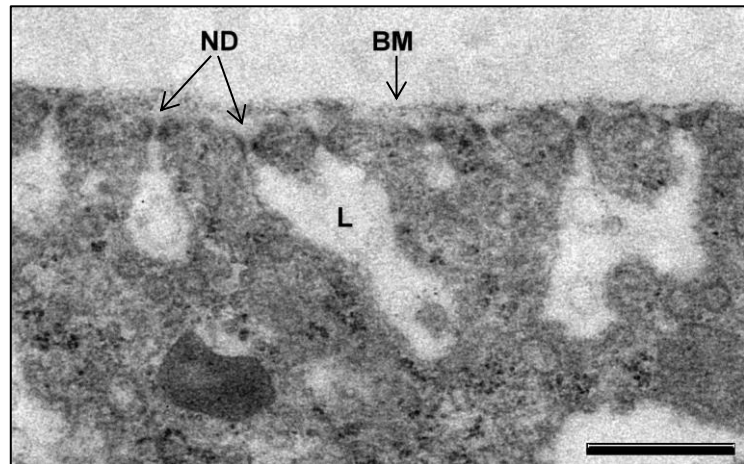


Abbildung 3.3b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG16717*. Maßstabsbalken entspricht 500nm.

Die Randzone weist Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf.

BM= Basalmembran; L= Lakune; ND= Nephrozytendiaphragma

3.1.5 CG32702

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *CG32702* herunterreguliert worden war, waren regelrecht geformt, wiesen allerdings, wie in den Abbildungen 3.4a und b zu sehen, in der Kontaktzone zu anderen Nephrozyten stark verzweigte Randbereiche auf. Es ließen sich keine Diaphragmata erkennen und der Abstand zwischen den Fußfortsätzen war zum Teil

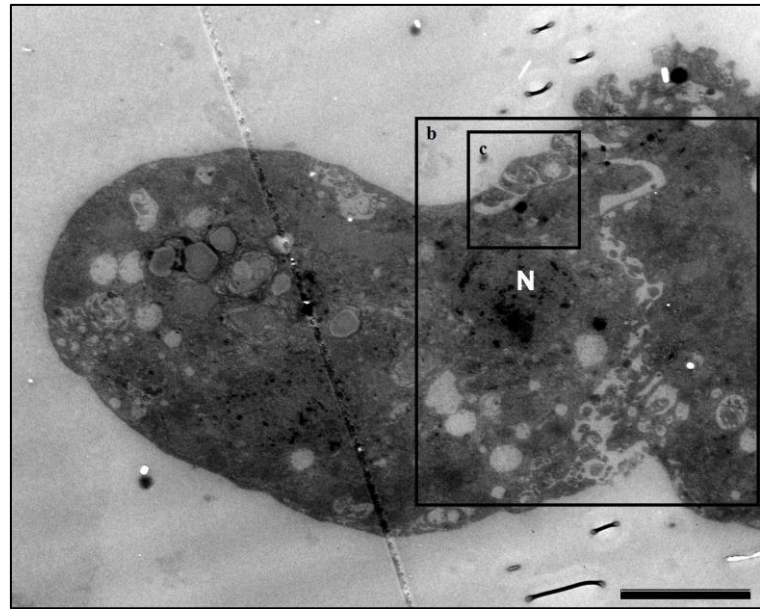


Abbildung 3.4a: Nephrozyt des Genotyps *CG32702* im Überblick.
Maßstabsbalken entspricht 5000nm.
N= Nukleus

vergrößert (siehe Abbildung 3.4c). Eine Basalmembran war aber entwickelt und auch das Zellinnere glich dem Wildtyp (siehe Abbildung 3.4c).

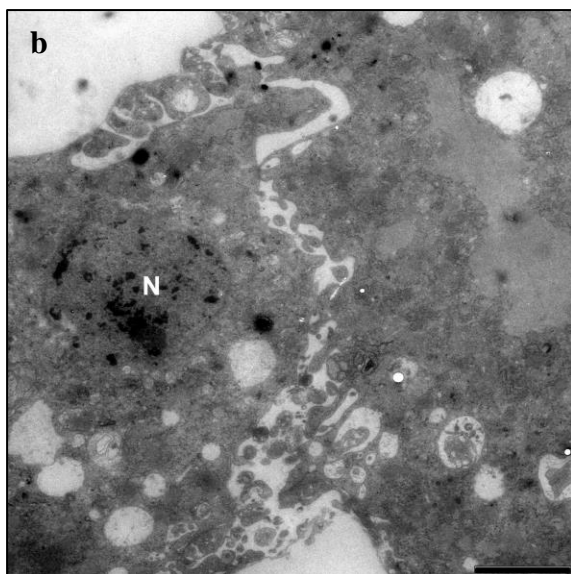


Abbildung 3.4b: Kontaktzone zweier Nephrozyten des Genotyps *CG32702*.
Maßstabsbalken entspricht 2500nm.
Der Nephrozyt weist eine stark verzweigte Kontaktzone zum benachbarten Nephrozyten auf.
BM= Basalmembran; L= Lakune; N= Nukleus

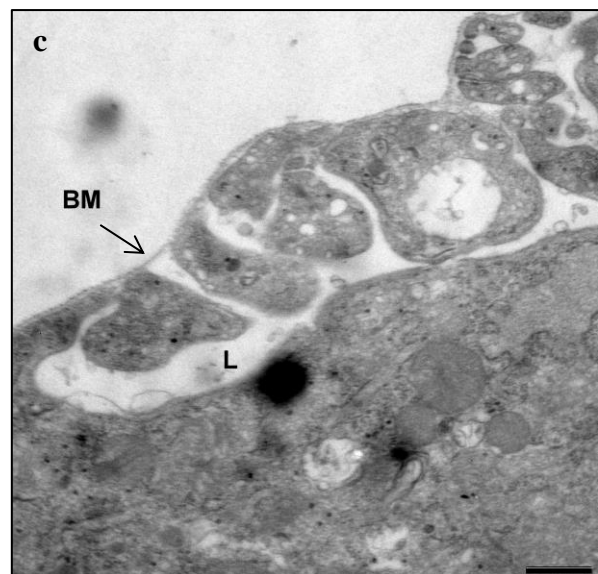


Abbildung 3.4c: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG32702*.
Maßstabsbalken entspricht 500nm.
Es sind keine Diaphragmata, aber eine Basalmembran vorhanden.
BM= Basalmembran; L= Lakune

3.1.6 Dachshund

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *Dachshund* herunterreguliert worden war, wiesen einen deformierten Phänotypen auf (siehe Abbildung 3.5a). Im Gegensatz zum Wildtypen waren die Zellen nicht rundlich, sondern unregelmäßig geformt und nicht glatt berandet. Die Lakunenstruktur des Randbereiches mit Fußfortsätzen, Diaphragmata und der Basalmembran war allerdings erhalten (siehe Abbildung 3.5b). Das Zellinnere mit den Zellorganellen wies keine Besonderheiten auf.

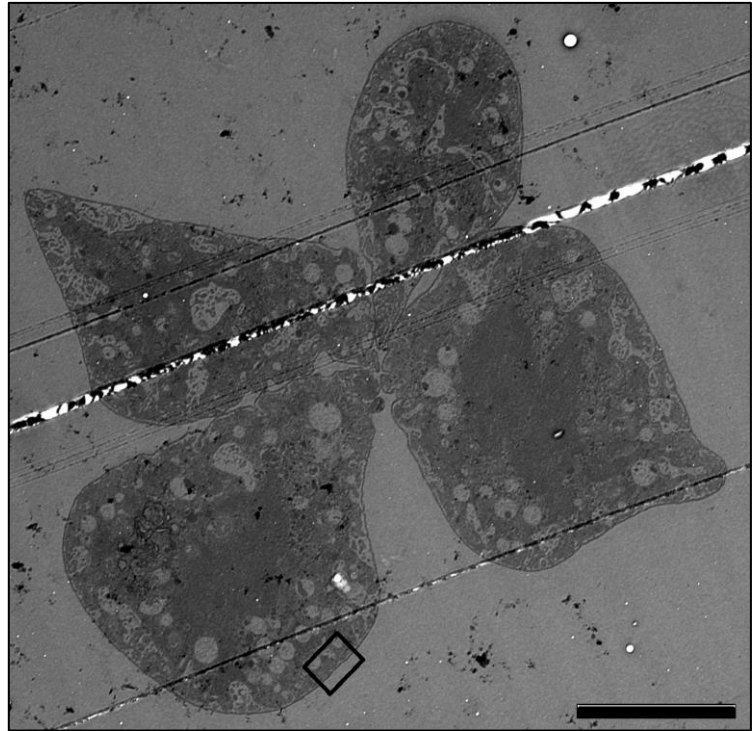


Abbildung 3.5a: Nephrozyt des Genotyps *Dachshund* im Überblick.

Maßstabsbalken entspricht 10000nm.

Die Nephrozyten sind unregelmäßig geformt und nicht glatt berandet.

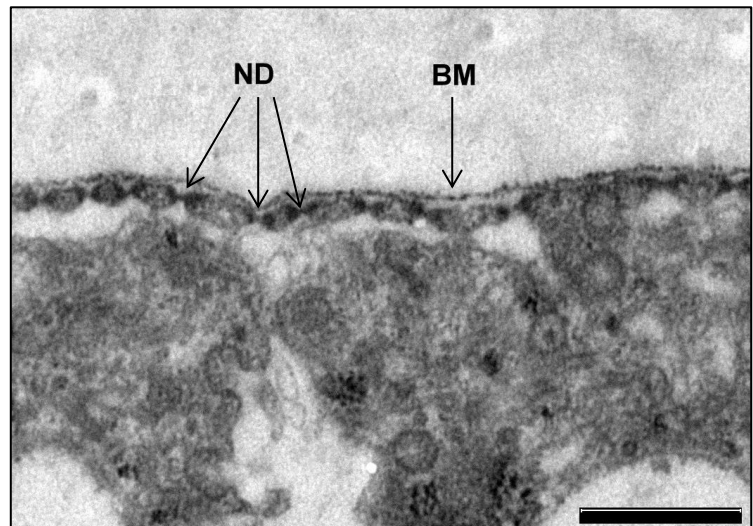


Abbildung 3.5b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *Dachshund*.

Maßstabsbalken entspricht 500nm.

Die Randzone weist Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf.

BM= Basalmembran; ND= Nephrozytendiaphragma

3.1.7 *DP* Transkriptionsfaktor

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *DP Transkriptionsfaktor* herunterreguliert worden war, wiesen, wie in Abbildung 3.6a zu sehen, einen welligen Umriss und eine unregelmäßige Randzone auf. Der periphere Bereich mit Lakunenstruktur, Fußfortsätzen und Diaphragmata war streckenweise verbreitert und erstreckte sich zum Teil bis zur Zellmitte (siehe Abbildung 3.6a), an anderen Stellen war die komplexe Struktur gar nicht ausgebildet (siehe Abbildung 3.6b). Die Basalmembran und die Zellorganellen waren regelrecht entwickelt.

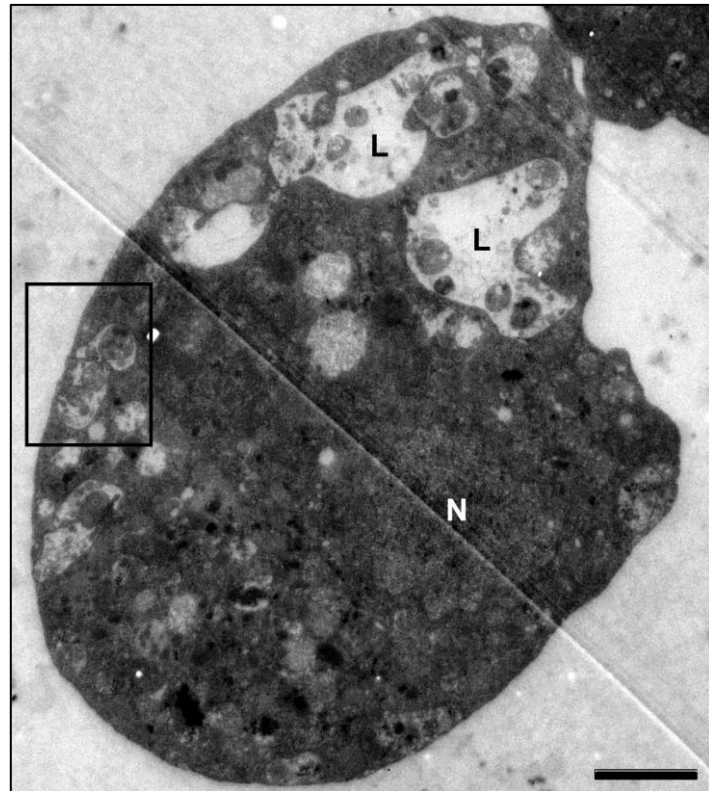


Abbildung 3.6a: Nephrozyt des Genotyps *DP Transkriptionsfaktor* im Überblick.

Maßstabsbalken entspricht 2500nm.

Der Nephrozyt hat einen welligen Umriss. Die Randzone mit Lakunenstruktur ist zum Teil stark verbreitert (z.B. oben), an anderen Stellen ist dagegen keine Randzone erkennbar (z.B. unten). L= Lakune; N= Nukleus

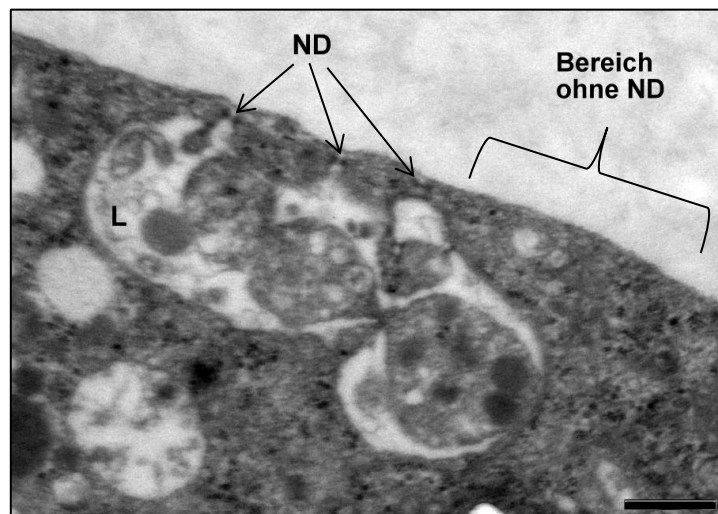


Abbildung 3.6b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *DP Transkriptionsfaktor*.

Maßstabsbalken entspricht 500nm.

Die Randzone weist stellenweise Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf, an anderen Stellen ist die komplexe Struktur der Randzone dafür gar nicht ausgebildet. L= Lakune; ND= Nephrozytendiaphragma

3.1.8 *PIP5K59B*

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen das Gen *PIP5K59B* herunterreguliert worden war, stellten sich als rundliche Zellen dar (siehe Abbildung 3.7a). Wie der Wildtyp wiesen sie einen komplexen Randbereich mit Fußfortsätzen, Diaphragmata und einer Basalmembran auf (siehe Abbildung 3.7b). Auch die Zellorganellen waren regelrecht entwickelt, allerdings fielen im Zellinneren helle, rundliche Bereiche auf, die schwarze Fragmente enthielten (siehe Abbildung 3.7a). Diese stellten möglicherweise Vesikel mit aus der Hämolymphe eliminierten Stoffen dar. Sie waren zum Teil nur unscharf begrenzt, was auf ein Artefakt hinweisen könnte.

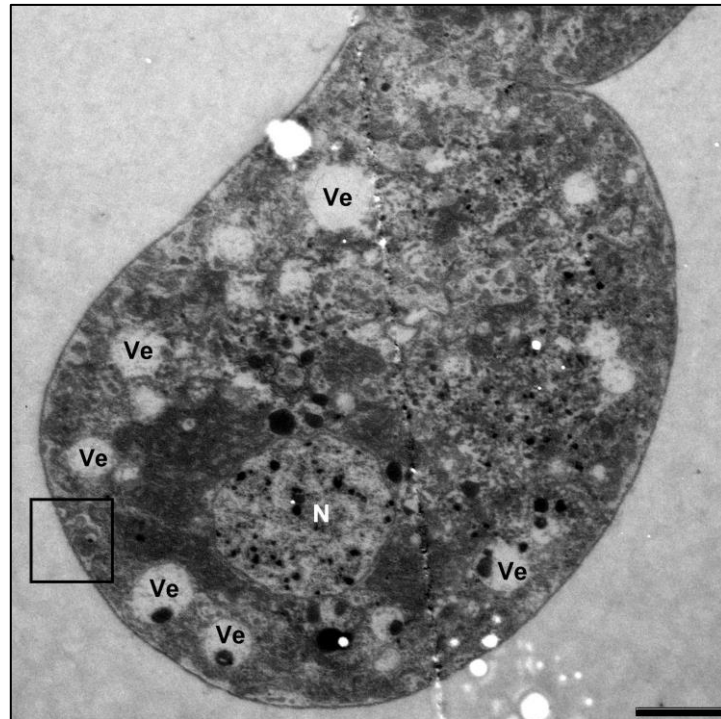


Abbildung 3.7a: Nephrozyt des Genotyps *PIP5K59B* im Überblick.

Maßstabsbalken entspricht 2500nm.

Der Nephrozyt ist regelrecht geformt. Er weist im Elektronenmikroskop helle, zum Teil nicht klar begrenzte Bereiche auf.

N= Nukleus; Ve= Vesikel

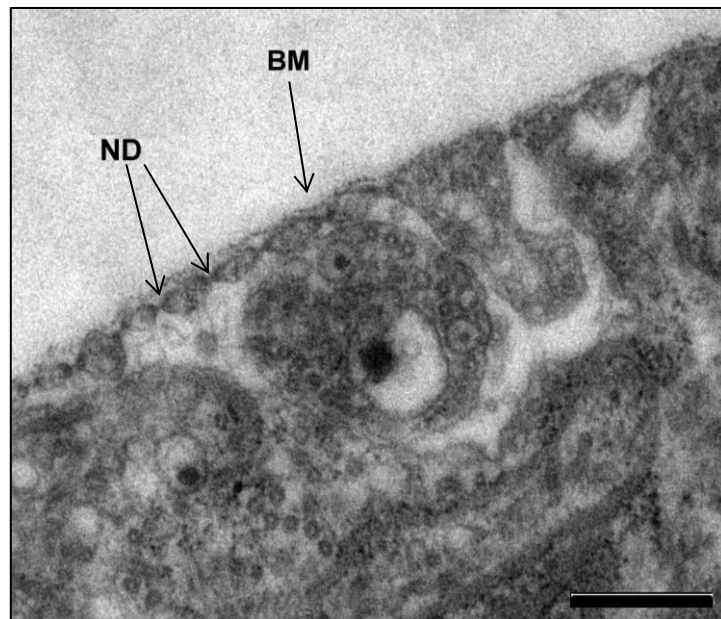


Abbildung 3.7b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *PIP5K59B*.

Maßstabsbalken entspricht 500nm.

Die Randzone weist Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf.

BM= Basalmembran; ND= Nephrozytendiaphragma

3.1.9 MicroRNA 210

Die Nephrozyten der *Drosophila*-Larven, bei denen mir210 überexprimiert worden war, waren regelrecht geformt und wiesen gut entwickelte Fußfortsätze, Diaphragmata und eine Basalmembran auf (siehe Abbildung 3.8b). Hinsichtlich der Zellorganellen war eine große Zahl an Vesikeln zu verzeichnen (siehe Abbildung 3.8a). Außerdem waren vermehrt schwarze, runde Strukturen zu erkennen, die allerdings Überreste der Nachkontrastierung gewesen sein könnten.

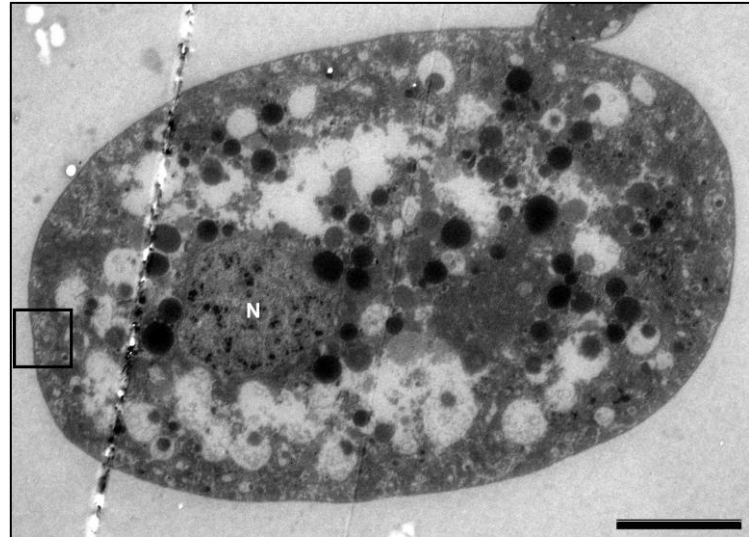


Abbildung 3.8a: Nephrozyt des Genotyps *mir210* im Überblick. Maßstabsbalken entspricht 5000nm. Der Nephrozyt weist eine Vielzahl an Vesikeln und schwarzen runden Strukturen auf. N= Nukleus

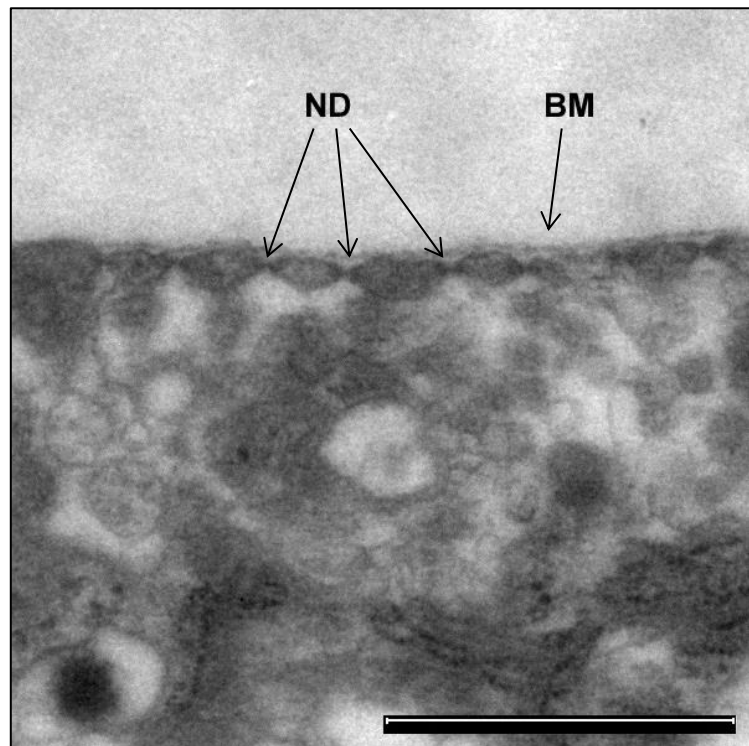


Abbildung 3.8b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *mir210*. Maßstabsbalken entspricht 1000nm. Die Randzone weist Lakunen, Fußfortsätze, Nephrozytendiaphragmata und eine Basalmembran auf. BM= Basalmembran; ND= Nephrozytendiaphragma

3.2 Ergebnisse der Funktionsanalyse

Die GFP-Intensität der entsprechend der in 2.2.2 beschriebenen Arbeitsschritte präparierten Nephrozyten wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop gemessen. Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen die Darstellungsweise des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. Dabei gibt es zwei verschiedene Kanäle: Im DAPI-Kanal (Abbildung 3.9) sind die Zellkerne der Nephrozyten stark cyanoblau gefärbt, außerdem lassen sich die Umrisse der Nephrozyten gut erkennen. Auch der Proventrikulus ist sichtbar. Im GFP-Kanal wird dagegen die GFP-Intensität der Nephrozyten dargestellt. Mithilfe des Programms „Image J“ wurden im DAPI-Kanal (Abbildung 3.9) die einzelnen Nephrozyten umrandet, dann erfolgte die Umschaltung auf den GFP-Kanal (Abbildung 3.10) und in dieser Einstellung wurden die Fluoreszenz des Flächeninhalts sowie die Flächengröße analysiert. Die durchschnittlichen auf die Fläche bezogenen Fluoreszenzwerte der Nephrozyten der jeweiligen Genotypen sind in Tabelle 6a dargestellt.

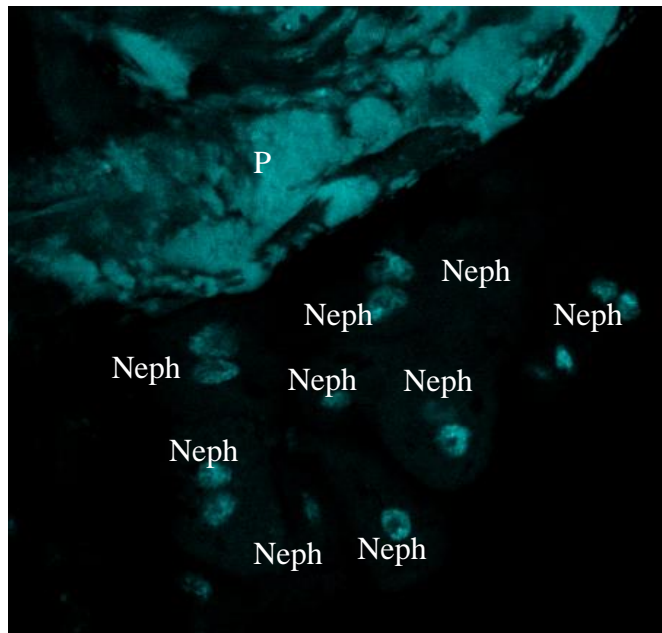


Abbildung 3.9: Darstellung der Nephrozyten mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops im DAPI-Kanal.

Neph= Nephrozyt; P= Proventrikulus

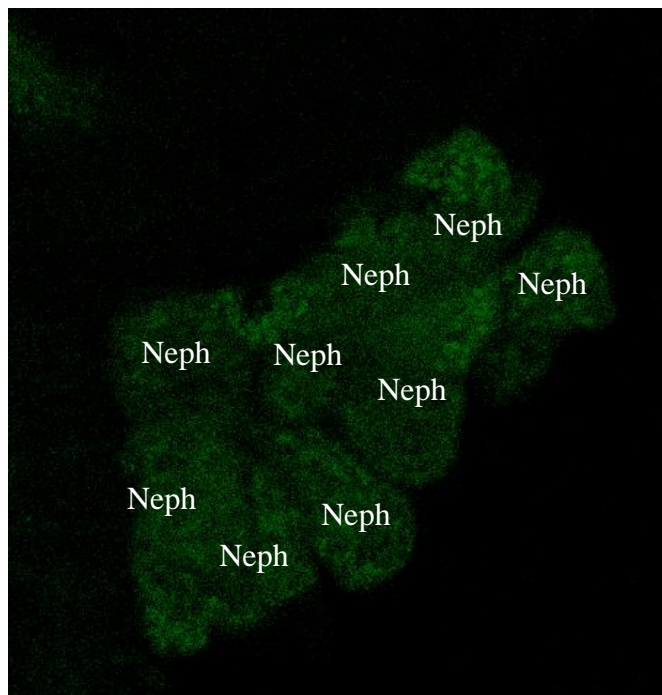


Abbildung 2.10: Darstellung der Nephrozyten mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops im GFP-Kanal.

Neph= Nephrozyt

	Ctcf-Mittelwert aller Larven/Fläche	SD	SEM	ctcf (%)	SD (%)
Wildtyp	2059	409	183	100%	20%
<i>AMPKγ</i>	1605	1779	536	78%	86%
<i>AMPKγ</i> hohe	3285	1185	530	160%	58%
<i>AMPKγ</i> tiefe	205	181	74	10%	9%
<i>CG9413</i>	482	219	78	23%	11%
<i>CG16717</i>	767	283	85	30%	14%
<i>CG32702</i>	-41	52	14	-2%	3%
<i>Dac</i>	339	221	74	16%	11%
<i>DP</i>	187	148	49	9%	7%
<i>PIP5K59B</i>	327	226	72	16%	11%
mir210	1452	614	275	71%	30%

Tabelle 6a: Ergebnisse der Funktionsanalyse.

	SEM(%)	1,96*SEM	Konfidenzintervall		N	p-Werte
Wildtyp	9%	17%	83%	117%	5	
<i>AMPKγ</i>	26%	51%	27%	129%	11	0,07
<i>AMPKγ</i> hohe	26%	50%	109%	210%	5	$9 \cdot 10^{-3}$
<i>AMPKγ</i> tiefe	4%	7%	3%	17%	6	$7 \cdot 10^{-4}$
<i>CG9413</i>	4%	7%	16%	31%	9	$1 \cdot 10^{-4}$
<i>CG16717</i>	4%	8%	22%	38%	12	$1 \cdot 10^{-4}$
<i>CG32702</i>	1%	1%	-3%	-1%	15	$1 \cdot 10^{-7}$
<i>Dac</i>	4%	7%	9%	24%	9	$7 \cdot 10^{-5}$
<i>DP</i>	2%	5%	4%	14%	9	$4 \cdot 10^{-5}$
<i>PIP5K59B</i>	3%	7%	9%	23%	10	$3 \cdot 10^{-5}$
mir210	13%	26%	44%	97%	5	0,08

Tabelle 6b: Ergebnisse der Funktionsanalyse.

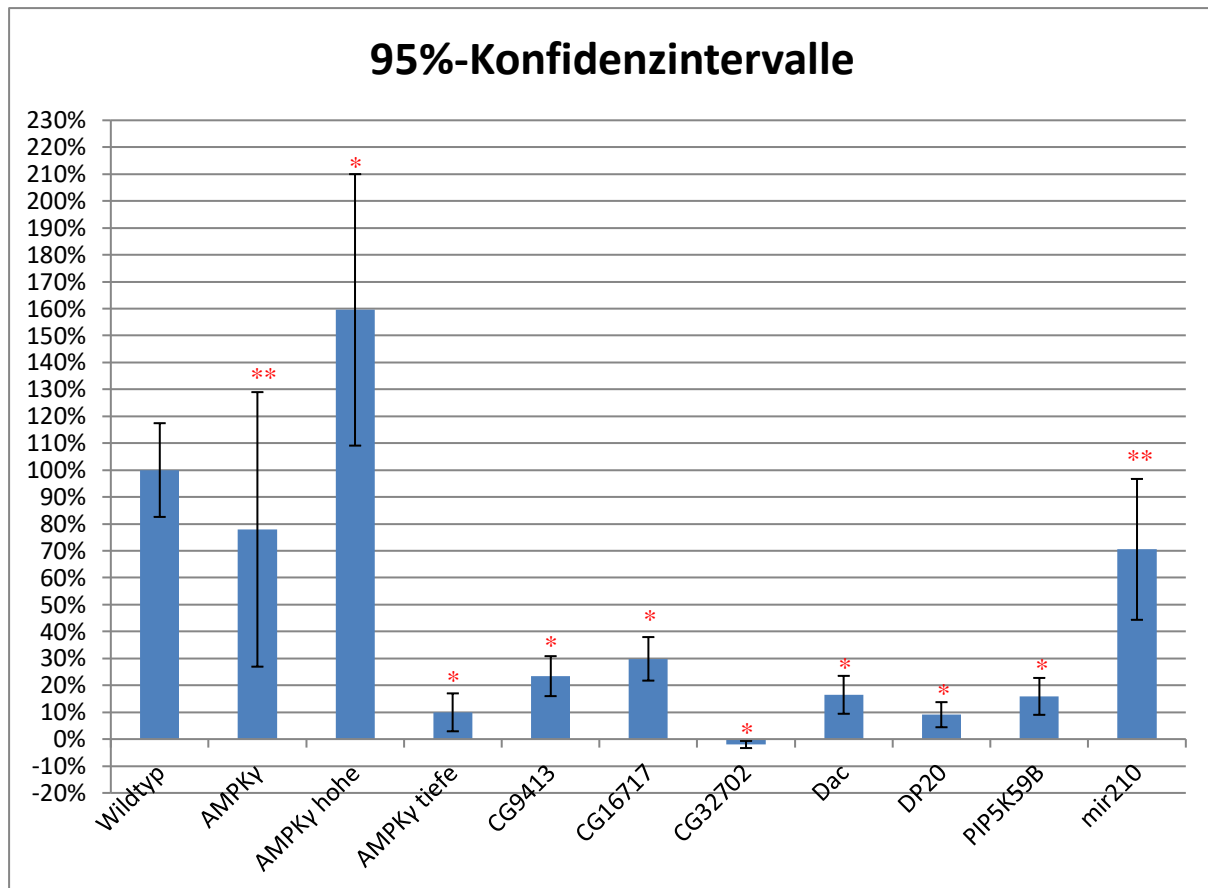


Abbildung 3.11: Ergebnisse der Funktionsanalyse als Diagramm.

Das Diagramm stellt die durchschnittliche Filtration im Vergleich zum Wildtyp dar (100%). Außerdem sind die 95%-Konfidenzintervalle eingezeichnet.

*= signifikant ($p < 0,05$); **= nicht signifikant ($p > 0,05$)

Die Nephrozyten der Larven, bei denen *CG9413*, *CG16717*, *CG32702*, *Dachshund*, *DP* *Transkriptionsfaktor* bzw. *PIP5K59B* herunterreguliert worden waren, zeigten signifikant ($p < 0,05$) abweichende Filtrationsraten (siehe Abbildung 3.10).

Die Werte der Larven, bei denen das Gen *AMPK γ* herunterreguliert worden war, wichen auch nach mehrfacher Durchführung des Experiments stark voneinander ab. Etwa die Hälfte der Larven wies sehr niedrige, die andere Hälfte sehr hohe Filtrationsraten auf, wobei der Mittelwert dieser hohen Werte sogar den des Wildtyps übersteigt. Während der Mittelwert aller Larven, bei denen *AMPK γ* herunterreguliert worden war, dadurch keine signifikante Differenz zum wildtypischen Mittelwert aufwies, waren die Mittelwerte der hohen und tiefen Filtrationsraten getrennt betrachtet jeweils signifikant abweichend (siehe Abbildung 3.11). Die unterschiedlichen Werte sind möglicherweise ein Resultat biologischer Varianz und ich werde in der Diskussion genauer darauf eingehen, wie sie interpretiert werden könnten.

Die Überexpression von *mir210* führte in meinen Untersuchungen zu keiner signifikanten Abweichung der Filtrationsrate (siehe Abbildung 3.11).

Außerdem fällt bei Betrachtung der Ergebnistabelle der negative Mittelwert des Genotyps auf, bei dem *CG32702* herunterreguliert worden war. Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass bei der Fluoreszenzmessung die Eigenfluoreszenz des Proventrikels als Referenz diente und also dessen Fluoreszenzwert von dem der Nephrozyten subtrahiert wurde. Durch Herunterregulation von *CG32702* scheint die Filtrationsfähigkeit der Nephrozyten so stark eingeschränkt zu sein, dass der Referenzwert größer ist, als der der Nephrozyten.

4. Diskussion

Wie in 3.1 beschrieben konnten nach Herunterregulation der Kandidatengene und der Überexpression von mir210 in den Nephrozyten verschiedene Phänotypen beobachtet werden. Dabei wurde neben der Morphologie die Filtrationsrate als Merkmal für die Funktion beurteilt und die Ergebnisse sollen nun mit den bisherigen Erkenntnissen über die Gene bzw. die microRNA in einen Zusammenhang gestellt werden. Mithilfe der Literatur sollen mögliche Erklärungen für die beobachteten Veränderungen gefunden und diskutiert werden.

Es liegt nahe, zu vermuten, dass eine Funktionseinschränkung durch morphologische Pathologien der Filtrationsbarriere, also der Basalmembran, der Fußfortsätze mit den Diaphragmata und der Lakunenstruktur, verursacht wird. Doch obwohl eine signifikante Minderung der Filtrationsrate bei allen Genotypen zu verzeichnen war, wiesen nur die Nephrozyten von Larven, bei denen *AMPK γ* , *CG32702* oder *DP Transkriptionsfaktor* herunterreguliert worden waren, morphologische Veränderungen der für die Filtration wichtigen kortikalen Randzone auf.

Die *AMPK γ* -mutierten Nephrozyten waren größer als die wildtypischen, während der Randbereich mit Lakunenstruktur allerdings verschmälert war. Da die AMP-aktivierte Proteinkinase, wie in 1.6.1 beschrieben, über Inhibition von mTOR einen negativen Einfluss auf die Zellproliferation hat (Lieberthal und Levine 2009), war zu erwarten, dass die Herunterregulation von *AMPK γ* in den Nephrozyten zu einem verstärkten Wachstum führt. Dieses könnte die Differenzierung der Lakunenstruktur beeinträchtigt und damit die Endozytose der filtrierte Stoffe eingeschränkt haben. Diese Theorie deckt sich mit den Studien von Hostetter (1995, 2003), die ergaben, dass eine glomeruläre Hypertrophie, bei der laut Chen *et al.* (2005) und Lee *et al.* (2007) mTOR eine Rolle spielt, zu einer Beschädigung der Podozyten und einem Funktionsverlust der Nieren führen kann. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung fiel zudem ein Reichtum an Endoplasmatischem Retikulum auf, der auf eine verstärkte Proteinbiosynthese hindeutete. Dies ließe sich dadurch erklären, dass die Herunterregulation der AMPK die Hemmung anaboler Stoffwechselwege aufhebt (Moffat und Harper 2010), was in 1.6.1 genauer erklärt wurde. Wie im Ergebnisteil beschrieben ergab sich bei der Funktionstestung neben den niedrigen Messwerten auch noch eine nicht zu vernachlässigende Anzahl sehr hoher Messwerte für *AMPK γ* -mutierte Nephrozyten, was sich möglicherweise mit biologischer Variabilität begründen lässt. Vielleicht gibt es eine grenzwertige Menge an AMPK, bei der die Nephrozyten zwar an Volumen zunehmen und eine verringerte Lakunenstruktur aufweisen, aber noch

funktionsfähig sind und durch ihre Größe mehr GFP akkumulieren können als die wildtypischen Nephrozyten. Bei einer größeren Probenzahl wäre dann auch denkbar, dass bei der morphologischen Untersuchung Unterschiede zwischen den Nephrozyten aufgefallen wären.

Das Gen *CG32702* kodiert für das periphere Membranprotein Cubilin, welches nach Studien von Zhang *et al.* (2013a) in Nephrozyten exprimiert wird und an der Endozytose von verschiedenen Proteinen beteiligt ist (siehe 1.6.4), sodass eine Minderung der Filtrationsrate als Folge der Herunterregulation von *CG32702* logisch erscheint. Die genmanipulierten Nephrozyten wiesen aber auch keine Diaphragmata auf, was einen zusätzlichen Einfluss des Gens auf die Zellentwicklung impliziert und neben der verminderten Expression von Cubilin einen zweiten Mechanismus darstellt, über den *CG32702* die Filtrationsrate verringern könnte. Die Ergebnisse der Untersuchungen von Zhang *et al.* (2013a), die meinen Experimenten stark ähnelten, stimmen dabei mit meinen Beobachtungen überein. Auch sie verzeichneten eine verringerte Filtrationsrate bei Testungen mit GFP und die fehlende Ausbildung von Diaphragmata. Über welche Signalwege *CG32702* allerdings die morphologische Entwicklung beeinflusst, bleibt noch zu erforschen. Bislang gibt es in der Literatur keine Ansätze für mögliche Erklärungen. Festzuhalten ist außerdem, dass die untersuchten Nephrozyten trotz fehlender Diaphragmata Fußfortsätze aufwiesen. Dies widerspricht den in der Einleitung erwähnten Beobachtungen von Weavers *et al.* (2009), dass den Nephrozyten mit Mutationen von *sns* oder *kirre*, den Orthologen der humanen Schlitzmembranproteine, neben den Diaphragmata auch die von den Fußfortsätzen gebildete Lakunenstruktur fehlte, und ihrer daraus abgeleiteten Hypothese, dass die Diaphragmata wahrscheinlich die Fußfortsätze stabilisieren.

Bei den Nephrozyten, bei denen *Transkriptionsfaktor DP* herunterreguliert worden war, war der Randbereich nicht überall differenziert, dafür reichte er an manchen Stellen bis in das Zellinnere hinein. Diese abnorme Differenzierung könnte der Grund für die verringerte Filtrationsrate gewesen sein und auf einer Dysregulation des DP-Zielgenes *D-raf* beruhen, welches durch Vermittlung extrazellulärer Signale die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflusst (Crews und Erikson 1993; Davis 1993; Morrison *et al.* 1989; Rapp 1991; Roberts 1992). Natürlich können aber auch ganz andere, noch nicht als Zielgen des Transkriptionsfaktors DP identifizierte Gene für die Veränderung in der Morphologie und Funktion der untersuchten Nephrozyten verantwortlich gewesen sein.

Drei weitere Genotypen wiesen ebenfalls morphologische Veränderungen auf, die allerdings nicht die für die Filtration wichtige Randzone betrafen. Die Basalmembran, die Fußfortsätze

mit Diaphragmata und die Lakunenstruktur waren regelrecht ausgebildet. Eine Kausalität zwischen den Auffälligkeiten in der Morphologie der Nephrozyten und der Funktionseinschränkung ist daher zunächst einmal nicht ersichtlich.

Der Phänotyp der Nephrozyten, bei denen das Gen *Dachsund* herunterreguliert worden war, war durch eine Deformation der gesamten Zelle charakterisiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Expression des humanen Orthologs von *Dachshund* bei vielen Tumorarten invers mit dem Tumorgrad und dem TNM-Staging korreliert (Chu *et al.* 2014; Wu *et al.* 2011) und auch an der Entstehung von Nierendysplasien beteiligt sein soll (Jain *et al.* 2007; Vats *et al.* 2003). Dies lässt sich durch den Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege begründen, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung beeinflussen (siehe 1.6.5). Daraus lässt sich für mich aber noch keine Erklärung für den beobachteten Verlust der rundlichen Form des Nephrozyten ableiten. Dies deutet eher auf einen Defekt bezüglich des Zytoskeletts hin und nachdem Dachshund Interaktionen mit so vielen verschiedenen Proteinen aufweist (siehe 1.6.5), halte ich es für durchaus möglich, dass es über einen noch nicht bekannten Weg auch das Zytoskelett beeinflusst.

Die Nephrozyten, bei denen *PIP5K59B* herunterreguliert worden war, wiesen im Zellinneren zahl-reiche, große, helle Bereiche auf – vermutlich Vesikel, die aus der Hämolymphe eliminierte Stoffe enthalten haben könnten. Das Substrat der Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase (PIP5K), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI(4)P), das bei Herunterregulation der PIP5K vermehrt anfallen müsste, ist vor allem in der Membran des Golgi-Apparats zu finden und nachdem dieser für die Bildung sekretorischer Vesikel verantwortlich ist, könnte hier ein Zusammenhang bestehen. Dann würde der Inhalt der Vesikel allerdings nicht aus filtrierten Stoffen, sondern aus in der Zelle synthetisierten Proteinen bestehen. Obwohl Phosphoinositide, zu denen sowohl das Substrat, als auch das Produkt der PIP5K gehören, eine wichtige Rolle bei der Polarität und wahrscheinlich auch bei der Entwicklung der Nephrozytenfortsätze spielen (siehe 1.6.7), ließen sich in diesem Bereich keine morphologischen Veränderungen feststellen. Dies könnte wie schon in 1.6.7 vermutet, an den zwei weiteren PIP5Ks in *Drosophila* liegen, die die Herunterregulation der von *PIP5K59B* kodierten PIP5K möglicherweise kompensieren konnten. Da die Funktion der Nephrozyten aber dennoch eingeschränkt war, war die angenommene Kompensation möglicherweise nicht vollständig ausreichend. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), das Produkt der PIP5K, ist, wie in 1.6.7 beschrieben, Bestandteil vor allem der apikalen Membran von polarisierten Epithelzellen in Säugern (Martin-Belmonte *et al.* 2007). Durch Rekrutierung bestimmter Proteine hat es einen großen Einfluss auf die weitere Zusammensetzung der Plasmamembran

(Krahn und Wodarz 2012). Nimmt man an, dass PIP_2 ebenfalls in der Plasmamembran von Nephrozyten exprimiert wird und hier eine analoge Funktion wie in der apikalen Membran von Epithelzellen in Säugern ausübt, könnte die Herunterregulation von *PIP5K59B* bewirkt haben, dass die Plasmamembran der Nephrozyten weniger PIP_2 enthielt, was zu einer fehlenden oder fehlerhaften Lokalisation von für die Filtration wichtigen Rezeptoren oder Kanälen geführt haben könnte. Diese Überlegung bleibt aber zu verifizieren.

Die microRNA 210 hat ein breites Wirkungsspektrum, das neben Anpassung an hypoxische Verhältnisse und Inhibition von T-Zellen vermittelter Immunantworten auch die Hemmung des Zellzyklus und damit Tumorprotektion einschließt (siehe 1.7). Für die stark vermehrte Vesikelbildung, die in den Nephrozyten mit überexprimierter mir210 zu beobachten war, finde ich anhand der Literatur allerdings keine schlüssige Erklärung. Die physiologische Morphologie der kortikalen Randzone mit Podozytenfortsätzen, Nephrozytendiaphragmata und einer Basalmembran ist die Grundlage für die in der Funktionsanalyse festgestellte nicht signifikant abweichende Filtrationsrate. Es ließen sich damit keine Hinweise für einen möglichen Einfluss von mir210 auf die Nierenfunktion finden.

Die zwei letzten Genotypen wiesen morphologisch unauffällige Nephrozyten auf. Das jeweilige elektronenmikroskopische Bild deutete nicht auf eine fehlerhafte Zellentwicklung hin oder zeigte strukturelle Besonderheiten, die Folge eines funktionellen Defekts sein könnten. Trotzdem war bei beiden Genotypen die Filtrationsrate signifikant verringert.

Die Funktionseinschränkungen der Nephrozyten, bei denen *CG9413* herunterreguliert worden war, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das vom Gen kodierte Protein direkt an der Filtration beteiligt ist. *SLC7A9*, das humane Ortholog von *CG9413*, kodiert für den Aminosäuren-transporter $b^{0,+}$, der den Transport von Cystin und dibasischen Aminosäuren in die Zelle vermittelt (siehe 1.6.2). Da *CG9413* in *Drosophila* wie in 1.6.2 beschrieben auch noch für weitere Aminosäuretransporter kodiert, ist es nicht überraschend, dass durch die Herunterregulation dieses Gens auch die Filtration von GFP beeinflusst wurde. Die Auswirkung lässt sich aber nicht allein auf das in der Studie von Köttgen *et al.* (2010) mit der verminderten GFR assoziierte Gen *SLC7A9* zurückführen. Diese Assoziation lässt sich meiner Meinung nach am besten mit den Ergebnissen der Studie von Assimos *et al.* (2002) begründen, die einen Zusammenhang zwischen durch Zystinurie bedingten Nierensteinen und pathologisch erhöhten Kreatininwerten fanden.

Das von *CG16717* kodierte Protein gehört der Familie der Metallophosphoesterasen an. Während das humane Ortholog, das Metallophosphoesterase-Domäne enthaltende Protein 2 (MPPED2), laut Studien von Liguori *et al.* (2012) hemmend auf das Zellwachstum wirkt, gibt

es diesbezüglich in *Drosophila* bislang keine Untersuchungen und meine Beobachtungen ergaben auch keine verminderte Zellgröße. Liguori *et al.* (2012) beschrieben außerdem eine erhöhte Expression von MPPED2 während der embryonalen Entwicklung der Niere, ich konnte allerdings nach Herunterregulation von *CG16717* in den Nephrozyten keine morphologischen Auffälligkeiten feststellen. Da zum jetzigen Zeitpunkt keine weiteren Funktionen der von *CG16717* bzw. *MPPED2* kodierten Metallophosphoesterase bekannt sind, lässt sich für die eingeschränkte Filtrationsleistung aktuell keine Erklärung finden. Die Erforschung dieses Enzyms ist aber noch längst nicht abgeschlossen.

Insgesamt sind die Ergebnisse meiner Literaturrecherche gut mit denen meiner Laboruntersuchungen vereinbar und es ließen sich einige schlüssige Hypothesen zur Erklärung der phänotypischen Veränderungen finden.

Bei all meinen Beobachtungen ist allerdings zu berücksichtigen, dass Experimente mit lebenden Organismen immer einer biologischen Variabilität unterliegen. Außerdem ist noch nicht untersucht worden, ob die Nephrozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb des dritten Larvenstadiums variieren und festgestellte Abweichungen teilweise darauf zurückzuführen sein könnten. Um die Aussagekraft meiner Ergebnisse zu erhöhen, hätte ich daher eine größere Zahl Nephrozyten und mehrere Linien der RNAi-Konstrukte untersuchen können.

Hinsichtlich der Studien von Köttgen *et al.* (2010), Pattaro *et al.* (2012) und Reznichenko *et al.* (2012) ist letztendlich festzuhalten, dass in meinen Untersuchungen die Herunterregulation der Kandidatengene die Filtrationsrate in den Nephrozyten der *Drosophila*-Larven in signifikantem Ausmaß verringerte und dies die Annahme bestärkt, dass die menschlichen Orthologe die Funktion der Niere beeinträchtigen. Weitere Forschungen könnten daher darauf abzielen, herauszufinden, ob Mutationen der verschiedenen Gene mit bestimmten Nierenerkrankungen assoziiert sind, was wiederum zur Entwicklung entsprechender Therapien beitragen könnte.

Da beispielsweise die AMP-aktivierte Proteinkinase den mTOR-Signalweg beeinflusst und dieser eine Rolle bei chronischen Nierenerkrankungen (Chen *et al.* 2005; Lee *et al.* 2007) und bei der diabetischen Nephropathie (Kasinath *et al.* 2006; Mariappan *et al.* 2007; Sataranatarajan *et al.* 2007) spielt, wäre es interessant zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zu der Expression von *AMPK γ* bzw. *PRKAG2* besteht.

Studien von Grasbeck (2006) zeigten, dass Defekte von Cubilin zu Proteinurie und Albuminurie führen, sodass Mutationen im Gen *CG32702* bzw. *CUBN* frühzeitig darauf hinweisen könnten. Bei der Cystinurie, die autosomal rezessiv vererbt und durch ein

fehlerhaftes $b^{0,+}AT/rBAT$ -Transportsystem verursacht wird, könnte man über eine Genanalyse der Eltern sogar das Risiko der Kinder bestimmen oder ausschließen.

Eine ursächliche Therapie von Gendefekten ist in der Regel schwierig, bei Assoziation von Pathologien mit Mutationen in einem der Kandidatengene, könnte jedoch an anderen Stellen des Wirkungsmechanismus angesetzt werden, sofern dieser dann erfolgreich erforscht worden ist. Im Gegensatz dazu hätte mir210 selbst als Ziel für therapeutische Maßnahmen dienen können. Dies wurde hinsichtlich von Erkrankungen, die nicht zwingend die Niere betreffen, schon thematisiert. Wang *et al.* (2014) halten dies für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen für realistisch und Magenta *et al.* (2013) mutmaßen, dass die Hochregulation der Expression von mir210 die Zellen vor oxidativem Stress schützen könnten. Für Qiu *et al.* (2014) stellt die Herunterregulation von mir210 eine potentielle neue Therapiemöglichkeit von neonataler ischämischen Hypoxie dar. Die Weiterverfolgung und Verifizierung dieser Theorien könnte neue Erkenntnisse für die Erkennung und Behandlung der mit mir210 assoziierten Pathologien ergeben. Dafür, dass diese auch die Nierenfunktion betreffen, konnte ich in meinen Untersuchungen allerdings keine Hinweise finden.

Die von mir untersuchten Kandidatengene wirken nicht nur auf den Nephrozyten und damit wahrscheinlich auf die Niere des Menschen, sondern in der Literatur werden Einflüsse auf verschiedenste Zellen und Mechanismen im gesamten Organismus beschrieben. Deshalb könnte die Erforschung der Gene im Zusammenhang mit Pathologien anderer Organe interessant sein. Beispielsweise war die Rolle von DACH1 in der Pathogenese von Tumorerkrankungen schon Gegenstand zahlreicher Studien (Chen *et al.* 2013; Chu *et al.* 2014; Wu *et al.* 2006a, 2011; Zhu *et al.* 2013) und es scheint nach neusten Erkenntnissen von Powe *et al.* (2014) sogar als Biomarker für Brustkrebs vom Luminal-A-Typ fungieren zu können. Da die Gene *AMPK γ* bzw. *PRKAG2*, *CG16717* bzw. *MPPED2*, *DP Transkriptionsfaktor* bzw. *TFDP2* und die microRNA 210 ebenfalls auf den Zellzyklus einwirken, könnten sie möglicherweise eine ähnliche Bedeutung haben. Die Expression von MPPED2 und mir210 in Tumorzellen wurde schon untersucht. Die Menge von MPPED2 korrelierte negativ mit der Progression von Neuroblastomen (Liguori *et al.* 2012) und es konnte auch in Zelllinien des Medulloblastoms, Mamma- und Zervixkarzinoms nachgewiesen werden (Barnes *et al.* 1981; Kanda *et al.* 1983; Ross *et al.* 1983). Von Valera *et al.* (2011) wurden erhöhte Level an mir210 in höhergradigen Tumoren festgestellt. Die genauen Wirkmechanismen sind allerdings noch unklar, weitere Forschungen könnten jedoch Ansätze für die Früherkennung oder Therapie ergeben.

Um am Ende aber noch einmal auf die Ausgangsfragestellung nach der Auswirkung von Genmutationen bzw. Varianten auf die Niere zurückzukommen, lässt sich schließlich zusammenfassend sagen, dass ich im Rahmen meiner Dissertation Hinweise auf Zusammenhänge zwischen den Kandidatengen und der Nierenfunktion, sowie zum Teil auch der Entwicklung von Nierenzellen finden konnte. Meine Funktionsanalyse unterstützt die Ergebnisse der GWAS von Köttgen *et al.* (2010) und Pattaro *et al.* (2012) bezüglich der verringerten glomerulären Filtrationsrate von *PRKAG2*, *SLC7A9*, *MPPED2*, *DACHI*, *TFDP2* und *PIP5K1B* sowie die von Reznichenko *et al.* (2012) gefundene Assoziation von *CUBN* mit einer terminalen Niereninsuffizienz und mithilfe meiner Untersuchungen der Morphologie der genmanipulierten *Drosophila*-Nephrozyten konnte ich mögliche Erklärungsansätze dafür finden. Mir210 zeigte dagegen in meinen Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss auf die Morphologie der für die Filtration wichtigen kortikalen Randzone oder die Nephrozytenfunktion.

Die Genforschung im Bereich der Nierenerkrankungen bietet zahlreiche Möglichkeiten und ich hoffe, dass sie dazu beitragen kann, diese in nächster Zukunft besser erkennen und behandeln zu können.

5. Zusammenfassung

Im Zuge dieser Arbeit wurden die in GWAS mit einer veränderten GFR assoziierten Gene *AMPK γ* , *CG9413*, *CG16717*, *CG32702*, *Dachshund*, *DP Transkriptionsfaktor* und *PIP5K59B*, sowie die microRNA 210 (mir210) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Morphologie und Funktion der Filtrationsbarriere der Niere untersucht. Dies geschah am Modell der *Drosophila melanogaster*, deren Nephrozyten bezüglich Entwicklung, Morphologie und Funktion stark den menschlichen Podozyten ähneln (Weavers *et al.* 2009).

Mithilfe des UAS/GAL4-Systems wurden die Expression der Kandidatengene in den Garland-Nephrozyten von *Drosophila melanogaster* herunterreguliert und mir210 überexprimiert. Die Morphologie der Garland-Nephrozyten von Larven des dritten Larvenstadiums konnte nach entsprechender Präparation mithilfe des Transmissionselektronenmikroskops gut beurteilt werden. Da die Randzone der Nephrozyten für die Filtration und damit Funktion entscheidend ist (Weavers *et al.* 2009), wurde dieser Bereich genauer auf morphologische Veränderungen hin untersucht. Es fanden sich dort allerdings nur bei drei Genotypen Auffälligkeiten, nämlich bei den Larven, bei denen *AMPK γ* , *CG32702* oder *DP Transkriptionsfaktor* herunterreguliert worden waren. Trotzdem zeigten bei der Funktionsanalyse, bei der die Filtrationsfähigkeit anhand eines Fluoreszenz-Assays mit GFP quantifiziert wurde, alle Larven, bei denen eins der Kandidatengene herunterreguliert worden war, im Vergleich zum Wildtyp signifikant ($p < 0,05$) verminderte Werte. Die Überexpression von mir210 führte allerdings zu keiner signifikant veränderten Filtrationsrate.

Insgesamt konnten meine Untersuchungen einen Einfluss der Kandidatengene auf die Funktion und teilweise auch auf die Morphologie der Nephrozyten zeigen und damit die Ergebnisse der GWAS von Köttgen *et al.* (2010), Pattaro *et al.* (2012) und Reznichenko *et al.* (2012) unterstützen, die bei der Untersuchung der Genome von 67093, 130600, 63153 bzw. 2328 Menschen europäischer Herkunft Assoziationen zwischen Varianten der humanen Orthologe der Kandidatengene und der Nierenfunktion feststellten. Für einen Zusammenhang zwischen mir210 und der Nierenfunktion konnte ich in meinen Untersuchungen keinen Hinweis finden, da weder die Morphologie der für die Filtration wichtigen kortikalen Randzone noch die Nephrozytenfunktion beeinträchtigt waren.

In weiterführenden Studien könnten diese Kandidatengene hinsichtlich ihrer Funktion bei der Etablierung des Filtrationsapparates in *Drosophila*-Nephrozyten zellbiologisch näher untersucht werden. Somit stellen *Drosophila*-Nephrozyten ein einfaches und schnelles Werkzeug dar, um die Funktion konservierter Gene für die Filtrationsbarriere zu analysieren und mögliche Kandidatengene zu validieren.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
Ago-Protein	Argonautenprotein
AKH	Adipokinetischem Hormon
AMN	Amnionless
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APC	Adenomatöse-Polyposis-coli-Protein
aPKC	atypische Proteinkinase C
Apo	Apolipoprotein
ATP	Adenosintriphosphat
AUG	Adenin – Uracil – Guanin
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
CBP	CREB-binding-Protein
CBS	Cystathion- β -sheet
CDK	Zyclin abhängige Kinase
ClrC	Clr4-Methyltransferase-Komplex
CoA	Coenzym A
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
Ctcf	Corrected total cell fluorescence
CyO	Curly of Oyster
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDSA	Dodecanyl Succinic Anhydrid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig
dsRBD	doppelsträngige RNA-Bindedomäne
duff, kirre	Dumbfounded
Efna3	Angiogenese-Inhibitor Ephrin A3

Egfr	epidermaler Wachstumsfaktor
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FECH	Ferrochelatase
Folr1	Folatzeptors
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT	Glukosetransporter
GPDL1	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase-Ähnliche 1
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
Hbs	Hibris
HDL	High Density Lipoprotein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HREs	Hypoxie-ansprechende Elemente
IP₃	Inositoltriphosphat
K⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
L	Lakune
LAT	L-Typ-Aminosäuretransporter
LDH	Laktatdehydrogenase A
m7G	7 Methyl-Guanosin-Cap
MAPK-Kaskade	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
mir210	microRNA 210
miRNA	microRNA
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPPED	Metallophosphoesterase-Domäne enthaltende Protein
mRNA	messenger RNA
mTor	mammalian target of Rapamycin

N	Nukleus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ND	Nephrozytendiaphragma
Neph	Nephrozyt
nm	Nanometer
Nu	Nukleolus
OsO₄	Osmiumtetroxid
P	Proventrikulus
p21Cip1	Zyklin-abhängiger Kinase-Inhibitor
PABP	polyA-bindendes Protein
PBS	Phosphat-Puffer-Lösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PDK	Pyruvatdehydrogenasekinase
PFA	Paraformaldehyd
PFK	Phosphofruktokinase
PHD	HIF α -Prolyl-Hydroxylase
PI	Phosphatidylinositol
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP₃	Phosphatidyl-3,4,5-triphosphat
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-kinase
piRNA	piwi-interacting RNA
PLK1	Polo-like Kinase 1
pre-	Vorläufer- (engl.: precursor)
pri-miRNA	primäre miRNA (engl.: primary miRNA)
PS	Pseudosubstrat-Sequenz
Ptp	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Ran	Ras-related nuclear protein
RAP	Rezeptor-assoziierte Protein
RBD	RNA-bindende Domäne
Rbf-Proteine	Retinoblastom-Familien-Proteine
rbp	Retinolbindeprotein
Rb-Protein	Retinoblastomprotein
RDGN	retinales Determinations-Gen-Netzwerk

RDRC	RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex
RISC	RNA-induzierten Silencing Komplex
RITS-Komplex	RNA-induzierter transkriptioneller Silencing-Komplex
RLC	RISC loading Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Interferierende RNA
rst	Roughest
S	Sedimentationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
shh	sonic-hedgehog-Protein
siRNA	small interfering RNA
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl.: single nucleotid polymorphism)
sns	sticks and stones
ss	einzelsträngig
TE	transposables Element
TEM	Transmissions-Elektronen-Mikroskop
TGF β	profibrotischer transformierender Wachstumsfaktor β
TNF	Tumornekrosefaktor
TRBP	HIV transactivating response RNA-binding Protein
TSC	tuberöser Sklerose-Komplex
TSC1	Hamartin
TSC2	Tuberin
Ttr	Transthyretin
UAS	Upstream Activating Sequenz
UTR	untranslatierte Region
Vak	Vakuole
Ve	Vesikel
VitB12-IF	intrinsischer Faktor-Vitamin B12-Komplex
YB-1	Y-Box-bindendes Protein 1

6.2 Liste der Tabellen

Tabelle 1: Orthologe von *CG9413*

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Fliegenstöcke

Tabelle 4: Automatische Mikrowelle, Programm „Dro-nephroc-fast 1“

Tabelle 5: Automatische Mikrowelle, Programm „Poly Epon“

Tabelle 6: Ergebnisse der Funktionsanalyse

6.3 Liste der Abbildungen

Abbildung 1.1: Die Filtrationsbarriere

Abbildung 1.2: Anatomie der Larve von *Drosophila melanogaster*

Abbildung 1.3: Partielles Schema des Verdauungstraktes mit Garland-Nephrozyten

Abbildung 1.4: Elektronenmikroskopisches Bild eines Nephrozyten

Abbildung 1.5: Randzonen-Abschnitt eines Nephrozyten (Elektronenmikroskopisches Bild)

Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau eines UAS/GAL4-Systems

Abbildung 1.7: Prozessierung der pre-miRNA

Abbildung 1.8: Schemata der Domänenabfolge und Struktur der Ago-Proteine

Abbildung 1.9: Entstehung des RNA-induzierten Silencing Komplexes

Abbildung 1.10: Abbau der mRNA nach Bindung durch den RISC

Abbildung 1.11: Gen-Silencing durch den RISC

Abbildung 1.12: Rekrutierung und H3K9-Methylierung

Abbildung 1.13: Lokalisation von *AMPK γ*

Abbildung 1.14: Modell für den Effekt der AMPK auf die Oxidation der Fettsäuren

Abbildung 1.15: Regulation der Glykolyse

Abbildung 1.16: Einfluss der AMPK auf mTOR

Abbildung 1.17: Effekte von mTOR

Abbildung 1.18: Lokalisation von *CG9413*

Abbildung 1.19: Modell der heterodimere Präsentation von $b^{0,+}$ und rBAT

Abbildung 1.20: Expressionsgradienten von $b^{0,+}$ und rBAT

Abbildung 1.21: Lokalisation von *CG16717*

Abbildung 1.22: Zellzyklus

Abbildung 1.23: Lokalisation von *CG32702*

Abbildung 1.24: Modell von Cubilin und Megalin

Abbildung 1.25: Lokalisation von *Dachshund*

Abbildung 1.26: Effekte von p53

Abbildung 1.27: Smad-abhängiger Signalweg aktiviert durch TGF β

- Abbildung 1.28: Smad-abhängiger Signalweg aktiviert durch TGF β
- Abbildung 1.29: Lokalisation von *DP Transkriptionsfaktor*
- Abbildung 1.30: Aktivierung der Transkription viraler oder S-Phase-Gene durch E2F/DP
- Abbildung 1.31: Lokalisation von *PIP5K59B*
- Abbildung 1.32: Phosphoinositide
- Abbildung 1.33: Regulation von HIF-1 α
- Abbildung 1.34: Einfluss von HIF-1 α auf die mitochondriale Atmung
- Abbildung 3.1a: Nephrozyt des Genotyps *AMPK γ* im Überblick
- Abbildung 3.1b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *AMPK γ*
- Abbildung 3.2a: Nephrozyt des Genotyps *CG9413* im Überblick
- Abbildung 3.2b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG9413*
- Abbildung 3.3a: Nephrozyt des Genotyps *CG16717* im Überblick
- Abbildung 3.3b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG16717*
- Abbildung 3.4a: Nephrozyt des Genotyps *CG32702* im Überblick
- Abbildung 3.4b: Kontaktzone zweier Nephrozyten des Genotyps *CG32702*
- Abbildung 3.4c: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *CG32702*
- Abbildung 3.5a: Nephrozyt des Genotyps *Dachshund* im Überblick
- Abbildung 3.5b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *Dachshund*
- Abbildung 3.6a: Nephrozyt des Genotyps *DP Transkriptionsfaktor* im Überblick
- Abbildung 3.6b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *DP Transkriptionsfaktor*
- Abbildung 3.7a: Nephrozyt des Genotyps *PIP5K59B* im Überblick
- Abbildung 3.7b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *PIP5K59B*
- Abbildung 3.8a: Nephrozyt des Genotyps *mir210* im Überblick
- Abbildung 3.8b: Nephrozyten-Randzone des Genotyps *mir210*
- Abbildung 3.9: Darstellung der Nephrozyten mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops im DAPI-Kanal
- Abbildung 3.10: Darstellung der Nephrozyten mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops im GFP-Kanal
- Abbildung 3.11: Ergebnisse der Funktionsanalyse als Diagramm

7. Literaturverzeichnis

Abdelwahid, Eltyeb; Yokokura, Takakazu; Krieser, Ronald J.; Balasundaram, Sujatha; Fowle, William H.; White, Kristin (2007): Mitochondrial disruption in *Drosophila* apoptosis. In: *Dev Cell* 12 (5), S. 793–806. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.04.004.

Aggarwal, S. K.; King, R. C. (1967): The ultrastructure of the wreath cells of *Drosophila melanogaster* larvae. In: *Protoplasma* 63 (4), S. 343–352.

Aleman, Lourdes M.; Doench, John; Sharp, Phillip A. (2007): Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. In: *RNA (New York, N.Y.)* 13 (3), S. 385–395. DOI: 10.1261/rna.352507.

Alvarado, Carlos G.; Maruyama, Satoshi; Cheng, Jun; Ida-Yonemochi, Hiroko; Kobayashi, Takanori; Yamazaki, Manabu *et al.* (2011): Nuclear translocation of beta-catenin synchronized with loss of E-cadherin in oral epithelial dysplasia with a characteristic two-phase appearance. In: *Histopathology* 59 (2), S. 283–291. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03929.x.

Ambros, Victor (2003): MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. In: *Cell* 113 (6), S. 673–676.

Ambros, Victor (2004): The functions of animal microRNAs. In: *Nature* 431 (7006), S. 350–355. DOI: 10.1038/nature02871.

Ambrus, Aaron M.; Islam, Abul B. M. M. K.; Holmes, Katherine B.; Moon, Nam Sung; Lopez-Bigas, Nuria; Benevolenskaya, Elizaveta V.; Frolov, Maxim V. (2013): Loss of dE2F compromises mitochondrial function. In: *Dev Cell* 27 (4), S. 438–451. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.10.002.

Aminoff, M.; Carter, J. E.; Chadwick, R. B.; Johnson, C.; Grasbeck, R.; Abdelaal, M. A. *et al.* (1999): Mutations in CUBN, encoding the intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, cause hereditary megaloblastic anaemia 1. In: *Nat Genet* 21 (3), S. 309–313. DOI: 10.1038/6831.

Arnlov, Johan; Evans, Jane C.; Meigs, James B.; Wang, Thomas J.; Fox, Caroline S.; Levy, Daniel *et al.* (2005): Low-grade albuminuria and incidence of cardiovascular disease events in nonhypertensive and nondiabetic individuals: the Framingham Heart Study. In: *Circulation* 112 (7), S. 969–975. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.538132.

Aseem, Obaidullah; Smith, Brian T.; Cooley, Marion A.; Wilkerson, Brent A.; Argraves, Kelley M.; Remaley, Alan T.; Argraves, W. Scott (2014): Cubilin maintains blood levels of HDL and albumin. In: *J Am Soc Nephrol* 25 (5), S. 1028–1036. DOI: 10.1681/ASN.2013060671.

Aslanian, Aaron; Iaquinta, Phillip J.; Verona, Raluca; Lees, Jacqueline A. (2004): Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. In: *Genes Dev* 18 (12), S. 1413–1422. DOI: 10.1101/gad.1196704.

- Assimos, Dean G.; Leslie, Stephen W.; Ng, Christopher; Strem, Stevan B.; Hart, Lois J. (2002): The impact of cystinuria on renal function. In: *The Journal of urology* 168 (1), S. 27–30.
- Assmann, G.; Schulte, H.; Eckardstein, A. von; Huang, Y. (1996): High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. In: *Atherosclerosis* 124 Suppl, S11-20.
- Augustin, Hrvoje; Grosjean, Yael; Chen, Kaiyun; Sheng, Qi; Featherstone, David E. (2007): Nonvesicular release of glutamate by glial xCT transporters suppresses glutamate receptor clustering in vivo. In: *J Neurosci* 27 (1), S. 111–123. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4770-06.2007.
- Azuma, Haruhito; Ehata, Shogo; Miyazaki, Hideyo; Watabe, Tetsuro; Maruyama, Osamu; Imamura, Takeshi *et al.* (2005): Effect of Smad7 expression on metastasis of mouse mammary carcinoma JygMC(A) cells. In: *J Natl Cancer Inst* 97 (23), S. 1734–1746. DOI: 10.1093/jnci/dji399.
- Bagchi, S.; Raychaudhuri, P.; Nevins, J. R. (1990): Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. In: *Cell* 62 (4), S. 659–669.
- Bandara, L. R.; Buck, V. M.; Zamanian, M.; Johnston, L. H.; La Thangue, N B (1993): Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. In: *EMBO J* 12 (11), S. 4317–4324.
- Bandara, L. R.; La Thangue, N. B. (1991): Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. In: *Nature* 351 (6326), S. 494–497. DOI: 10.1038/351494a0.
- Bannai, S.; Christensen, H. N.; Vadgama, J. V.; Ellory, J. C.; Englesberg, E.; Guidotti, G. G. *et al.* (1984): Amino acid transport systems. In: *Nature* 311 (5984), S. 308.
- Bannai, S.; Ishii, T. (1982): Transport of cystine and cysteine and cell growth in cultured human diploid fibroblasts: effect of glutamate and homocysteate. In: *J Cell Physiol* 112 (2), S. 265–272. DOI: 10.1002/jcp.1041120216.
- Barletta, Gina-Marie; Kovari, Iulia A.; Verma, Rakesh K.; Kerjaschki, Dentscho; Holzman, Lawrence B. (2003): Nephin and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. In: *J Biol Chem* 278 (21), S. 19266–19271. DOI: 10.1074/jbc.M301279200.
- Barnes, E. N.; Biedler, J. L.; Spengler, B. A.; Lyser, K. M. (1981): The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. In: *In Vitro* 17 (7), S. 619–631.
- Bartel, David P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297.
- Bartkova, Jirina; Gron, Birgitte; Dabelsteen, Erik; Bartek, Jiri (2003): Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing. In: *Arch Oral Biol* 48 (2), S. 125–132.

- Becker, Dr. Renate (1978, leicht veränderte Neuauflage 2012): Die Taufliede im Biologieunterricht. Online verfügbar unter <http://www.schulbiologiezentrum.info/AH%2015%206%20Taufliede%20Drosophila%20221112Me.pdf>, zuletzt geprüft am 15.02.2015.
- Behm-Ansmant, Isabelle; Rehwinkel, Jan; Doerks, Tobias; Stark, Alexander; Bork, Peer; Izaurralde, Elisa (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. In: *Genes Dev* 20 (14), S. 1885–1898. DOI: 10.1101/gad.1424106.
- Behrends, Jan; Bischofberger, Josef; Deutzmann, Rainer (2012): Duale Reihe Physiologie. 2., aktualisierte Auflage. Stuttgart: Thieme (DUALE REIHE Herausgegeben von Alexander Bob und Konstantin Bob).
- Berezikov, Eugene; Chung, Wei-Jen; Willis, Jason; Cuppen, Edwin; Lai, Eric C. (2007): Mammalian mirtron genes. In: *Mol Cell* 28 (2), S. 328–336. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.09.028.
- Berk, A. J. (1986): Adenovirus promoters and E1A transactivation. In: *Annu Rev Genet* 20, S. 45–79. DOI: 10.1146/annurev.ge.20.120186.000401.
- Bernstein, E.; Caudy, A. A.; Hammond, S. M.; Hannon, G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. In: *Nature* 409 (6818), S. 363–366. DOI: 10.1038/35053110.
- Berridge, M. J.; Oschman, J. L. (1969): A structural basis for fluid secretion by malpighian tubules. In: *Tissue Cell* 1 (2), S. 247–272.
- Biology Medicine PowerPoint Presentations, Templates, Images, Diagrams, Slides (2011). Online verfügbar unter <http://site.motifolio.com/images/A-model-of-Smad-dependent-signaling-pathway-activated-by-TGF-beta-5111158.png>, zuletzt aktualisiert am 10.07.2011, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- Birk, J. B.; Wojtaszewski, J. F. P. (2006): Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. In: *J Physiol* 577 (Pt 3), S. 1021–1032. DOI: 10.1113/jphysiol.2006.120972.
- Birn, H.; Fyfe, J. C.; Jacobsen, C.; Mounier, F.; Verroust, P. J.; Orskov, H. *et al.* (2000): Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. In: *J Clin Invest* 105 (10), S. 1353–1361. DOI: 10.1172/JCI8862.
- Blake, M. C.; Azizkhan, J. C. (1989): Transcription factor E2F is required for efficient expression of the hamster dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. In: *Mol Cell Biol* 9 (11), S. 4994–5002.
- Böger, Carsten A.; Chen, Ming-Huei; Tin, Adrienne; Olden, Matthias; Kottgen, Anna; Boer, Ian H. de *et al.* (2011): CUBN is a gene locus for albuminuria. In: *J Am Soc Nephrol* 22 (3), S. 555–570. DOI: 10.1681/ASN.2010060598.
- Bonegio, Ramon G. B.; Fuhro, Robert; Wang, Zhiyong; Valeri, C. Robert; Andry, Christopher; Salant, David J.; Lieberthal, Wilfred (2005): Rapamycin ameliorates proteinuria-

- associated tubulointerstitial inflammation and fibrosis in experimental membranous nephropathy. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (7), S. 2063–2072. DOI: 10.1681/ASN.2004030180.
- Braco, Jason T.; Gillespie, Emily L.; Alberto, Gregory E.; Brenman, Jay E.; Johnson, Erik C. (2012): Energy-dependent modulation of glucagon-like signaling in *Drosophila* via the AMP-activated protein kinase. In: *Genetics* 192 (2), S. 457–466. DOI: 10.1534/genetics.112.143610.
- Bradley, T. J. (1989): Membrane dynamics in insect malpighian tubules. In: *Am J Physiol* 257 (5 Pt 2), R967-72.
- Brenneisen, P.; Wenk, J.; Wlaschek, M.; Krieg, T.; Scharffetter-Kochanek, K. (2000): Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. In: *J Biol Chem* 275 (6), S. 4336–4344.
- Brugarolas, James B.; Vazquez, Francisca; Reddy, Archana; Sellers, William R.; Kaelin, William G. Jr. (2003): TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. In: *Cancer Cell* 4 (2), S. 147–158.
- Bryant, David M.; Mostov, Keith E. (2008): From cells to organs: building polarized tissue. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (11), S. 887–901. DOI: 10.1038/nrm2523.
- Burghardt, Tillmann; Hochapfel, Florian; Salecker, Benjamin; Meese, Christine; Grone, Hermann-Josef; Rachel, Reinhard *et al.* (2015): Advanced electron microscopic techniques provide a deeper insight into the peculiar features of podocytes. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 309 (12), F1082-9. DOI: 10.1152/ajprenal.00338.2015.
- Cagan, Ross L. (2011): The *Drosophila* nephrocyte. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 20 (4), S. 409–415. DOI: 10.1097/MNH.0b013e328347ae02.
- Cai, Xuezhong; Hagedorn, Curt H.; Cullen, Bryan R. (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. In: *RNA (New York, N.Y.)* 10 (12), S. 1957–1966. DOI: 10.1261/rna.7135204.
- Calonge, M. J.; Gasparini, P.; Chillaron, J.; Chillon, M.; Gallucci, M.; Rousaud, F. *et al.* (1994): Cystinuria caused by mutations in rBAT, a gene involved in the transport of cystine. In: *Nat Genet* 6 (4), S. 420–425. DOI: 10.1038/ng0494-420.
- Calonge, M. J.; Volpini, V.; Bisceglia, L.; Rousaud, F.; Sanctis, L. de; Beccia, E. *et al.* (1995): Genetic heterogeneity in cystinuria: the SLC3A1 gene is linked to type I but not to type III cystinuria. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (21), S. 9667–9671.
- Campbell, Fiona M.; Kozak, Ray; Wagner, Alese; Altarejos, Judith Y.; Dyck, Jason R B; Belke, Darrell D. *et al.* (2002): A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. In: *J Biol Chem* 277 (6), S. 4098–4103. DOI: 10.1074/jbc.M106054200.

- Campbell, Neil A.; Reece, Jane B.; Markl, Jürgen (2003): *Biologie*. 6. Aufl. Heidelberg [u.a.]: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).
- Carpenter, C. L.; Cantley, L. C. (1990): Phosphoinositide kinases. In: *Biochemistry* 29 (51), S. 11147–11156.
- Carroll, Veronica A.; Ashcroft, Margaret (2005): Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. In: *Expert reviews in molecular medicine* 7 (6), S. 1–16. DOI: 10.1017/S1462399405009117.
- Carthew, Richard W.; Sontheimer, Erik J. (2009): Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. In: *Cell* 136 (4), S. 642–655. DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.035.
- Cell Press (2012): <http://www.cell.com/cms/attachment/612795/4921361/gr3.jpg>. Online verfügbar unter <http://www.cell.com/cms/attachment/612795/4921361/gr3.jpg>, zuletzt aktualisiert am 08.10.2012, zuletzt geprüft am 16.08.2015.
- Chan, Stephen Y.; Loscalzo, Joseph (2010): MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. In: *Cell Cycle* 9 (6), S. 1072–1083.
- Chan, Stephen Y.; Zhang, Ying-Yi; Hemann, Craig; Mahoney, Christopher E.; Zweier, Jay L.; Loscalzo, Joseph (2009): MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. In: *Cell Metab* 10 (4), S. 273–284. DOI: 10.1016/j.cmet.2009.08.015.
- Chellappan, S.; Kraus, V. B.; Kroger, B.; Munger, K.; Howley, P. M.; Phelps, W. C.; Nevins, J. R. (1992): Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (10), S. 4549–4553.
- Chellappan, S. P.; Hiebert, S.; Mudryj, M.; Horowitz, J. M.; Nevins, J. R. (1991): The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. In: *Cell* 65 (6), S. 1053–1061.
- Chen, Chang-Rung; Kang, Yibin; Siegel, Peter M.; Massague, Joan (2002): E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. In: *Cell* 110 (1), S. 19–32.
- Chen, Jian-Kang; Chen, Jianchun; Neilson, Eric G.; Harris, Raymond C. (2005): Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (5), S. 1384–1391. DOI: 10.1681/ASN.2004100894.
- Chen, Ke; Wu, Kongming; Gormley, Michael; Ertel, Adam; Wang, Jing; Zhang, Wei *et al.* (2013): Acetylation of the cell-fate factor dachshund determines p53 binding and signaling modules in breast cancer. In: *Oncotarget* 4 (6), S. 923–935.
- Chen, Z.; Li, Y.; Zhang, H.; Huang, P.; Luthra, R. (2010): Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. In: *Oncogene* 29 (30), S. 4362–4368. DOI: 10.1038/onc.2010.193.
- Chendrimada, Thimmaiah P.; Finn, Kenneth J.; Ji, Xinjun; Baillat, David; Gregory, Richard I.; Liebhaber, Stephen A. *et al.* (2007): MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. In: *Nature* 447 (7146), S. 823–828. DOI: 10.1038/nature05841.

- Cheng, M.; Sexl, V.; Sherr, C. J.; Roussel, M. F. (1998): Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (3), S. 1091–1096.
- Chillaron, J.; Estevez, R.; Mora, C.; Wagner, C. A.; Suessbrich, H.; Lang, F. *et al.* (1996): Obligatory amino acid exchange via systems bo,+L-like and y+L-like. A tertiary active transport mechanism for renal reabsorption of cystine and dibasic amino acids. In: *J Biol Chem* 271 (30), S. 17761–17770.
- Chillaron, J.; Roca, R.; Valencia, A.; Zorzano, A.; Palacin, M. (2001): Heteromeric amino acid transporters: biochemistry, genetics, and physiology. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 281 (6), F995-1018.
- Christensen, E. I.; Nielsen, R. (2007): Role of megalin and cubilin in renal physiology and pathophysiology. In: *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 158, S. 1–22.
- Christensen, Erik Ilso; Verroust, Pierre J.; Nielsen, Rikke (2009): Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. In: *Pflugers Arch* 458 (6), S. 1039–1048. DOI: 10.1007/s00424-009-0685-8.
- Christensen, H. N. (1990): Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. In: *Physiol Rev* 70 (1), S. 43–77.
- Chu, Qian; Han, Na; Yuan, Xun; Nie, Xin; Wu, Hua; Chen, Yu *et al.* (2014): DACH1 inhibits cyclin D1 expression, cellular proliferation and tumor growth of renal cancer cells. In: *J Hematol Oncol* 7 (1), S. 73. DOI: 10.1186/s13045-014-0073-5.
- Cogswell, J. P.; Brown, C. E.; Bisi, J. E.; Neill, S. D. (2000): Dominant-negative polo-like kinase 1 induces mitotic catastrophe independent of cdc25C function. In: *Cell Growth Differ* 11 (12), S. 615–623.
- Corton, J. M.; Gillespie, J. G.; Hardie, D. G. (1994): Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. In: *Curr Biol* 4 (4), S. 315–324.
- Corton, J. M.; Gillespie, J. G.; Hawley, S. A.; Hardie, D. G. (1995): 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? In: *Eur J Biochem* 229 (2), S. 558–565.
- Coudroy, Gwenaëlle; Gburek, Jakub; Kozyraki, Renata; Madsen, Mette; Trugnan, Germain; Moestrup, Soren K. *et al.* (2005): Contribution of cubilin and amnionless to processing and membrane targeting of cubilin-amnionless complex. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (8), S. 2330–2337. DOI: 10.1681/ASN.2004110925.
- Crawhall, J. C.; Scowen, E. F.; Thompson, C. J.; Watts, R. W. (1967): The renal clearance of amino acids in cystinuria. In: *J Clin Invest* 46 (7), S. 1162–1171. DOI: 10.1172/JCI105609.
- Crews, C. M.; Erikson, R. L. (1993): Extracellular signals and reversible protein phosphorylation: what to Mek of it all. In: *Cell* 74 (2), S. 215–217.
- Crossley, A. C. (1972): The ultrastructure and function of pericardial cells and other nephrocytes in an insect: *Calliphora erythrocephala*. In: *Tissue Cell* 4 (3), S. 529–560.

- Czech, Benjamin; Malone, Colin D.; Zhou, Rui; Stark, Alexander; Schlingeheyde, Catherine; Dus, Monica *et al.* (2008): An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. In: *Nature* 453 (7196), S. 798–802. DOI: 10.1038/nature07007.
- Dalton, S. (1992): Cell cycle regulation of the human *cdc2* gene. In: *EMBO J* 11 (5), S. 1797–1804.
- Dang, Eric V.; Barbi, Joseph; Yang, Huang-Yu; Jinasena, Dilini; Yu, Hong; Zheng, Ying *et al.* (2011): Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. In: *Cell* 146 (5), S. 772–784. DOI: 10.1016/j.cell.2011.07.033.
- Das, Swadesh K.; Hashimoto, Takashi; Shimizu, Kazuo; Yoshida, Tatsushi; Sakai, Toshiyuki; Sowa, Yoshihiro *et al.* (2005): Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. In: *Biochim Biophys Acta* 1726 (3), S. 328–335. DOI: 10.1016/j.bbagen.2005.09.007.
- Davidson, Jean M.; Duronio, Robert J. (2012): S phase-coupled E2f1 destruction ensures homeostasis in proliferating tissues. In: *PLoS Genet* 8 (8), e1002831. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002831.
- Davis, R. J. (1993): The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. In: *J Biol Chem* 268 (20), S. 14553–14556.
- DeGregori, J.; Leone, G.; Miron, A.; Jakoi, L.; Nevins, J. R. (1997): Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (14), S. 7245–7250.
- Denli, Ahmet M.; Tops, Bastiaan B J; Plasterk, Ronald H A; Ketting, Rene F.; Hannon, Gregory J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. In: *Nature* 432 (7014), S. 231–235. DOI: 10.1038/nature03049.
- Departement de Médecine, Division d'Histologie de l'Université de Fribourg: Blut-Harn-Schranke. Online verfügbar unter http://www.unifr.ch/anatomy/elearning/de/biochemie/harnapparat/blut_harn/d-blut_harn.php, zuletzt geprüft am 15.05.2017.
- Dermol, Urska; Janardan, Vishnu; Tyagi, Richa; Visweswariah, Sandhya S.; Podobnik, Marjetka (2011): Unique utilization of a phosphoprotein phosphatase fold by a mammalian phosphodiesterase associated with WAGR syndrome. In: *J Mol Biol* 412 (3), S. 481–494. DOI: 10.1016/j.jmb.2011.07.060.
- Dettner, Konrad; Peters, Werner (2010): Lehrbuch der Entomologie Bd 1. 2. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Devlin, Cecilia; Greco, Simona; Martelli, Fabio; Ivan, Mircea (2011): miR-210: More than a silent player in hypoxia. In: *IUBMB Life* 63 (2), S. 94–100. DOI: 10.1002/iub.427.
- DGfN Das Nierenportal : Daten und Fakten zur Nephrologie. Online verfügbar unter <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/daten-und-fakten-zur-nephrologie.html>, zuletzt geprüft am 14.05.2017.
- Divecha, N.; Banfic, H.; Irvine, R. F. (1993a): Inositides and the nucleus and inositides in the nucleus. In: *Cell* 74 (3), S. 405–407.

- Divecha, N.; Rhee, S. G.; Letcher, A. J.; Irvine, R. F. (1993b): Phosphoinositide signalling enzymes in rat liver nuclei: phosphoinositidase C isoform beta 1 is specifically, but not predominantly, located in the nucleus. In: *Biochem J* 289 (Pt 3), S. 617–620.
- Djuranovic, Sergej; Nahvi, Ali; Green, Rachel (2011): A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. In: *Science* 331 (6017), S. 550–553. DOI: 10.1126/science.1191138.
- Donoviel, D. B.; Freed, D. D.; Vogel, H.; Potter, D. G.; Hawkins, E.; Barrish, J. P. *et al.* (2001): Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. In: *Mol Cell Biol* 21 (14), S. 4829–4836. DOI: 10.1128/MCB.21.14.4829-4836.2001.
- Doxsey, S. (1998): The centrosome--a tiny organelle with big potential. In: *Nat Genet* 20 (2), S. 104–106. DOI: 10.1038/2392.
- Du, W.; Vidal, M.; Xie, J. E.; Dyson, N. (1996): RBF, a novel RB-related gene that regulates E2F activity and interacts with cyclin E in *Drosophila*. In: *Genes Dev* 10 (10), S. 1206–1218.
- Duronio, R. J.; Bonnette, P. C.; O'Farrell, P. H. (1998): Mutations of the *Drosophila* dDP, dE2F, and cyclin E genes reveal distinct roles for the E2F-DP transcription factor and cyclin E during the G1-S transition. In: *Mol Cell Biol* 18 (1), S. 141–151.
- Duronio, R. J.; O'Farrell, P. H. (1994): Developmental control of a G1-S transcriptional program in *Drosophila*. In: *Development* 120 (6), S. 1503–1515.
- Duronio, R. J.; O'Farrell, P. H.; Xie, J. E.; Brook, A.; Dyson, N. (1995): The transcription factor E2F is required for S phase during *Drosophila* embryogenesis. In: *Genes Dev* 9 (12), S. 1445–1455.
- Dyck, J. R.; Gao, G.; Widmer, J.; Stapleton, D.; Fernandez, C. S.; Kemp, B. E.; Witters, L. A. (1996): Regulation of 5'-AMP-activated protein kinase activity by the noncatalytic beta and gamma subunits. In: *J Biol Chem* 271 (30), S. 17798–17803.
- Dynlacht, B. D.; Brook, A.; Dembski, M.; Yenush, L.; Dyson, N. (1994): DNA-binding and trans-activation properties of *Drosophila* E2F and DP proteins. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (14), S. 6359–6363.
- E2f2 - Transcription factor E2F2 - *Drosophila melanogaster* (Fruit fly). Online verfügbar unter <http://www.uniprot.org/uniprot/O77051>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- Eberhard, D. A.; Cooper, C. L.; Low, M. G.; Holz, R. W. (1990): Evidence that the inositol phospholipids are necessary for exocytosis. Loss of inositol phospholipids and inhibition of secretion in permeabilized cells caused by a bacterial phospholipase C and removal of ATP. In: *Biochem J* 268 (1), S. 15–25.
- Eddy, Allison A.; Neilson, Eric G. (2006): Chronic kidney disease progression. In: *J Am Soc Nephrol* 17 (11), S. 2964–2966. DOI: 10.1681/ASN.2006070704.
- Eggermann, Thomas; Albers, Alexandra; Wagner, Carsten; Lang, Florian; Lahme, Sven; Hesse, Albrecht *et al.* (2000): Cystinurie und weitere Formen erblicher Nierensteinleiden. Online verfügbar unter http://www.medgenetik.de/2000/2000_2_219_Eggermann.pdf?PHPSESSID=40fd9301dcc86add7fc1cb732bc2b5c0, zuletzt geprüft am 10.02.2015.

- Eisenmann, David M. (2005): Wnt signaling. In: *WormBook : the online review of C. elegans biology*, S. 1–17. DOI: 10.1895/wormbook.1.7.1.
- Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. In: *Genes Dev* 15 (2), S. 188–200.
- Erkan, Elif; Devarajan, Prasad; Schwartz, George J. (2005): Apoptotic response to albumin overload: proximal vs. distal/collecting tubule cells. In: *Am J Nephrol* 25 (2), S. 121–131. DOI: 10.1159/000084888.
- Eulalio, Ana; Behm-Ansmant, Isabelle; Schweizer, Daniel; Izaurralde, Elisa (2007): P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. In: *Mol Cell Biol* 27 (11), S. 3970–3981. DOI: 10.1128/MCB.00128-07.
- Eulalio, Ana; Huntzinger, Eric; Izaurralde, Elisa (2008): GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. In: *Nature structural & molecular biology* 15 (4), S. 346–353. DOI: 10.1038/nsmb.1405.
- Evdokimova, Valentina; Tognon, Cristina; Ng, Tony; Ruzanov, Peter; Melnyk, Natalya; Fink, Dieter *et al.* (2009): Translational activation of snail1 and other developmentally regulated transcription factors by YB-1 promotes an epithelial-mesenchymal transition. In: *Cancer Cell* 15 (5), S. 402–415. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.03.017.
- Farazi, Thalia A.; Hoell, Jessica I.; Morozov, Pavel; Tuschl, Thomas (2013): MicroRNAs in human cancer. In: *Advances in experimental medicine and biology* 774, S. 1–20. DOI: 10.1007/978-94-007-5590-1_1.
- Fasanaro, Pasquale; Greco, Simona; Lorenzi, Maria; Pescatori, Mario; Brioschi, Maura; Kulshreshtha, Ritu *et al.* (2009): An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. In: *J Biol Chem* 284 (50), S. 35134–35143. DOI: 10.1074/jbc.M109.052779.
- Feliubadalo, L.; Font, M.; Purroy, J.; Rousaud, F.; Estivill, X.; Nunes, V. *et al.* (1999): Non-type I cystinuria caused by mutations in SLC7A9, encoding a subunit (bo,+AT) of rBAT. In: *Nat Genet* 23 (1), S. 52–57. DOI: 10.1038/12652.
- Fernandez, Esperanza; Carrascal, Montserrat; Rousaud, Ferran; Abian, Joaquin; Zorzano, Antonio; Palacin, Manuel; Chillaron, Josep (2002): rBAT-b(0,+AT) heterodimer is the main apical reabsorption system for cystine in the kidney. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 283 (3), F540-8. DOI: 10.1152/ajprenal.00071.2002.
- Fife, Brian T.; Pauken, Kristen E.; Eagar, Todd N.; Obu, Takashi; Wu, Jenny; Tang, Qizhi *et al.* (2009): Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. In: *Nature immunology* 10 (11), S. 1185–1192. DOI: 10.1038/ni.1790.
- Filipowicz, Witold; Jaskiewicz, Lukasz; Kolb, Fabrice A.; Pillai, Ramesh S. (2005): Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. In: *Current opinion in structural biology* 15 (3), S. 331–341. DOI: 10.1016/j.sbi.2005.05.006.
- Fingar, Diane C.; Blenis, John (2004): Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. In: *Oncogene* 23 (18), S. 3151–3171. DOI: 10.1038/sj.onc.1207542.

- FlyBase Gene Report: Dmel\CG16717. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0036028.html>, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\CG9413. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0030574.html>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\Cubn. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0052702.html>, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\dac. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0005677.html>, zuletzt geprüft am 09.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\Dp. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0011763.html>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\E2f1. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0011766.html>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\E2f2. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0024371.html>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\PIP5K59B. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0034789.html>, zuletzt geprüft am 11.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\Rbf. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0015799.html>, zuletzt geprüft am 10.02.2015.
- FlyBase Gene Report: Dmel\SNF4Aγ. Online verfügbar unter <http://flybase.org/reports/FBgn0264357.html>, zuletzt geprüft am 11.02.2015.
- FlyBase Web Development Group: FlyBase Homepage. Online verfügbar unter <http://flybase.org/>, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- Font, M. A.; Feliubadalo, L.; Estivill, X.; Nunes, V.; Golomb, E.; Kreiss, Y. *et al.* (2001): Functional analysis of mutations in SLC7A9, and genotype-phenotype correlation in non-Type I cystinuria. In: *Hum Mol Genet* 10 (4), S. 305–316.
- Forstemann, Klaus; Horwich, Michael D.; Wee, Liangmeng; Tomari, Yukihide; Zamore, Phillip D. (2007): Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. In: *Cell* 130 (2), S. 287–297. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.056.
- Franch, J.; Aslesen, R.; Jensen, J. (1999): Regulation of glycogen synthesis in rat skeletal muscle after glycogen-depleting contractile activity: effects of adrenaline on glycogen synthesis and activation of glycogen synthase and glycogen phosphorylase. In: *Biochem J* 344 Pt 1, S. 231–235.
- Frazer, Kelly A.; Ballinger, Dennis G.; Cox, David R.; Hinds, David A.; Stuve, Laura L.; Gibbs, Richard A. *et al.* (2007): A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. In: *Nature* 449 (7164), S. 851–861. DOI: 10.1038/nature06258.
- Frimpter, G. W.; Horwith, M.; Furth, E.; Fellows, R. E.; Thompson, D. D. (1962): Inulin and endogenous amino acid renal clearances in cystinuria: evidence for tubular secretion. In: *J Clin Invest* 41, S. 281–288. DOI: 10.1172/JCI104481.

- Frisch, Steven M.; Mymryk, Joe S. (2002): Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (6), S. 441–452. DOI: 10.1038/nrm827.
- Furriols, M.; Chillaron, J.; Mora, C.; Castello, A.; Bertran, J.; Camps, M. *et al.* (1993): rBAT, related to L-cysteine transport, is localized to the microvilli of proximal straight tubules, and its expression is regulated in kidney by development. In: *J Biol Chem* 268 (36), S. 27060–27068.
- Fyfe, John C.; Madsen, Mette; Hojrup, Peter; Christensen, Erik I.; Tanner, Stephan M.; de la Chapelle, Albert *et al.* (2004): The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. In: *Blood* 103 (5), S. 1573–1579. DOI: 10.1182/blood-2003-08-2852.
- Garg, Puneet; Holzman, Lawrence B. (2012): Podocytes: gaining a foothold. In: *Experimental cell research* 318 (9), S. 955–963. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.02.030.
- Gebauer, Fatima; Hentze, Matthias W. (2004): Molecular mechanisms of translational control. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (10), S. 827–835. DOI: 10.1038/nrm1488.
- Ghildiyal, Megha; Seitz, Hervé; Horwich, Michael D.; Li, Chengjian; Du, Tingting; Lee, Soohyun *et al.* (2008): Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. In: *Science* 320 (5879), S. 1077–1081. DOI: 10.1126/science.1157396.
- Giraldez, Antonio J.; Mishima, Yuichiro; Rihel, Jason; Grocock, Russell J.; van Dongen, Stijn; Inoue, Kunio *et al.* (2006): Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. In: *Science* 312 (5770), S. 75–79. DOI: 10.1126/science.1122689.
- Golden, Daniel E.; Gerbasi, Vincent R.; Sontheimer, Erik J. (2008): An inside job for siRNAs. In: *Mol Cell* 31 (3), S. 309–312. DOI: 10.1016/j.molcel.2008.07.008.
- Golsteyn, R. M.; Schultz, S. J.; Bartek, J.; Ziemiecki, A.; Ried, T.; Nigg, E. A. (1994): Cell cycle analysis and chromosomal localization of human Plk1, a putative homologue of the mitotic kinases *Drosophila* polo and *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5. In: *J Cell Sci* 107 (Pt 6), S. 1509–1517.
- Goodyer, P.; Saadi, I.; Ong, P.; Elkas, G.; Rozen, R. (1998): Cystinuria subtype and the risk of nephrolithiasis. In: *Kidney Int* 54 (1), S. 56–61. DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00957.x.
- Goolsby, Mary Jo (2002): National Kidney Foundation Guidelines for Chronic Kidney Disease. Evaluation, Classification, and Stratification. In: *J Amer Acad Nurse Practitioners* 14 (6), S. 238–242. DOI: 10.1111/j.1745-7599.2002.tb00119.x.
- GoPixPic: Bild Zellzyklus Mitosephasen Pictures. Online verfügbar unter http://www.gopixpic.com/320/bild-zellzyklus-mitosephasen/http:%7C%7Cstatic*cosmiq*de%7Cdata%7Cde%7C9f9%7Cb2%7C9f9b25ead379df463966cee23f04c2a2_1.jpg/, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- Gordon, T.; Castelli, W. P.; Hjortland, M. C.; Kannel, W. B.; Dawber, T. R. (1977): High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. In: *Am J Med* 62 (5), S. 707–714.

- Goyal, Gaurav; Fell, Brennan; Sarin, Apurva; Youle, Richard J.; Sriram, V. (2007): Role of mitochondrial remodeling in programmed cell death in *Drosophila melanogaster*. In: *Dev Cell* 12 (5), S. 807–816. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.02.002.
- Grasbeck, R.; Gordin, R.; Kantero, I.; Kuhlback, B. (1960): Selective vitamin B12 malabsorption and proteinuria in young people. A syndrome. In: *Acta Med Scand* 167, S. 289–296.
- Grasbeck, Ralph (2006): Imerslund-Grasbeck syndrome (selective vitamin B(12) malabsorption with proteinuria). In: *Orphanet J Rare Dis* 1, S. 17. DOI: 10.1186/1750-1172-1-17.
- Gregory, Richard I.; Yan, Kai-Ping; Amuthan, Govindasamy; Chendrimada, Thimmaiah; Doratotaj, Behzad; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. In: *Nature* 432 (7014), S. 235–240. DOI: 10.1038/nature03120.
- Grondin, P.; Plantavid, M.; Sultan, C.; Breton, M.; Mauco, G.; Chap, H. (1991): Interaction of pp60c-src, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin-stimulated platelets. In: *J Biol Chem* 266 (24), S. 15705–15709.
- Gross, M.-L.; Piecha, G.; Bierhaus, A.; Hanke, W.; Henle, T.; Schirmacher, P.; Ritz, E. (2011): Glycated and carbamylated albumin are more "nephrotoxic" than unmodified albumin in the amphibian kidney. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 301 (3), F476-85. DOI: 10.1152/ajprenal.00342.2010.
- Haasnoot, Joost; Westerhout, Ellen M.; Berkhout, Ben (2007): RNA interference against viruses: strike and counterstrike. In: *Nature biotechnology* 25 (12), S. 1435–1443. DOI: 10.1038/nbt1369.
- Halse, Reza; Fryer, Lee G D; McCormack, James G.; Carling, David; Yeaman, Stephen J. (2003): Regulation of glycogen synthase by glucose and glycogen: a possible role for AMP-activated protein kinase. In: *Diabetes* 52 (1), S. 9–15.
- Hamel, P. A.; Gill, R. M.; Phillips, R. A.; Gallie, B. L. (1992): Transcriptional repression of the E2-containing promoters EIIaE, c-myc, and RB1 by the product of the RB1 gene. In: *Mol Cell Biol* 12 (8), S. 3431–3438.
- Han, Jinju; Lee, Yoontae; Yeom, Kyu-Hyun; Kim, Young-Kook; Jin, Hua; Kim, V. Narry (2004): The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. In: *Genes Dev* 18 (24), S. 3016–3027. DOI: 10.1101/gad.1262504.
- Hao, X. F.; Alphey, L.; Bandara, L. R.; Lam, E. W.; Glover, D.; La Thangue, N B (1995): Functional conservation of the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F and its pathway of control in *Drosophila melanogaster*. In: *J Cell Sci* 108 (Pt 9), S. 2945–2954.
- Hardie, D. G.; Carling, D. (1997): The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? In: *Eur J Biochem* 246 (2), S. 259–273.
- Hardy, John; Singleton, Andrew (2009): Genomewide association studies and human disease. In: *The New England journal of medicine* 360 (17), S. 1759–1768. DOI: 10.1056/NEJMra0808700.

- Harlan, J. E.; Hajduk, P. J.; Yoon, H. S.; Fesik, S. W. (1994): Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. In: *Nature* 371 (6493), S. 168–170. DOI: 10.1038/371168a0.
- Harris, Raymond C.; Neilson, Eric G. (2006): Toward a unified theory of renal progression. In: *Annu Rev Med* 57, S. 365–380. DOI: 10.1146/annurev.med.57.121304.131342.
- Harrison, Frederick W.; Locke, Michael (1998): *Microscopic Anatomy of Invertebrates*.
- Hartig, Julia Verena; Esslinger, Stephanie; Böttcher, Romy; Saito, Kuniaki; Förstemann, Klaus (2009): Endo-siRNAs depend on a new isoform of loquacious and target artificially introduced, high-copy sequences. In: *EMBO J* 28 (19), S. 2932–2944. DOI: 10.1038/emboj.2009.220.
- Hawley, S. A.; Davison, M.; Woods, A.; Davies, S. P.; Beri, R. K.; Carling, D.; Hardie, D. G. (1996): Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. In: *J Biol Chem* 271 (44), S. 27879–27887.
- Hawley, S. A.; Selbert, M. A.; Goldstein, E. G.; Edelman, A. M.; Carling, D.; Hardie, D. G. (1995): 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. In: *J Biol Chem* 270 (45), S. 27186–27191.
- Hay, Bruce A.; Guo, Ming (2006): Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, S. 623–650. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093845.
- Hay, J. C.; Fiset, P. L.; Jenkins, G. H.; Fukami, K.; Takenawa, T.; Anderson, R. A.; Martin, T. F. (1995): ATP-dependent inositide phosphorylation required for Ca(2+)-activated secretion. In: *Nature* 374 (6518), S. 173–177. DOI: 10.1038/374173a0.
- Hay, Nissim; Sonenberg, Nahum (2004): Upstream and downstream of mTOR. In: *Genes Dev* 18 (16), S. 1926–1945. DOI: 10.1101/gad.1212704.
- Hayashi, T.; Hirshman, M. F.; Fujii, N.; Habinowski, S. A.; Witters, L. A.; Goodyear, L. J. (2000): Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. In: *Diabetes* 49 (4), S. 527–531.
- He, Lin; Hannon, Gregory J. (2004): MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. In: *Nature reviews. Genetics* 5 (7), S. 522–531. DOI: 10.1038/nrg1379.
- Hedberg, Y.; Davoodi, E.; Roos, G.; Ljungberg, B.; Landberg, G. (1999): Cyclin-D1 expression in human renal-cell carcinoma. In: *Int J Cancer* 84 (3), S. 268–272.
- Helin, K.; Harlow, E.; Fattaey, A. (1993a): Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. In: *Mol Cell Biol* 13 (10), S. 6501–6508.
- Helin, K.; Lees, J. A.; Vidal, M.; Dyson, N.; Harlow, E.; Fattaey, A. (1992): A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. In: *Cell* 70 (2), S. 337–350.

- Helin, K.; Wu, C. L.; Fattaey, A. R.; Lees, J. A.; Dynlacht, B. D.; Ngwu, C.; Harlow, E. (1993b): Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. In: *Genes Dev* 7 (10), S. 1850–1861.
- Helms, J. B.; de Vries, K J; Wirtz, K. W. (1991): Synthesis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the endoplasmic reticulum of Chinese hamster ovary cells. In: *J Biol Chem* 266 (32), S. 21368–21374.
- Herold, Gerd (2016): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung; 2016; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold, Gerd.
- Hiebert, S. W.; Chellappan, S. P.; Horowitz, J. M.; Nevins, J. R. (1992): The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. In: *Genes Dev* 6 (2), S. 177–185.
- Hiebert, S. W.; Lipp, M.; Nevins, J. R. (1989): E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (10), S. 3594–3598.
- Hierro, Aitor; Rojas, Adriana L.; Rojas, Raul; Murthy, Namita; Effantin, Gregory; Kajava, Andrey V. *et al.* (2007): Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. In: *Nature* 449 (7165), S. 1063–1067. DOI: 10.1038/nature06216.
- Hijmans, E. M.; Voorhoeve, P. M.; Beijersbergen, R. L.; van 't Veer, L J; Bernards, R. (1995): E2F-5, a new E2F family member that interacts with p130 in vivo. In: *Mol Cell Biol* 15 (6), S. 3082–3089.
- Hillege, Hans L.; Fidler, Vaclav; Diercks, Gilles F.H.; van Gilst, Wiek H.; Zeeuw, Dick de; van Veldhuisen, Dirk J. *et al.* (2002): Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. In: *Circulation* 106 (14), S. 1777–1782.
- Hirose, Tomonori; Satoh, Daisuke; Kurihara, Hidetake; Kusaka, Chiho; Hirose, Hiroko; Akimoto, Kazunori *et al.* (2009): An essential role of the universal polarity protein, aPKClambda, on the maintenance of podocyte slit diaphragms. In: *PLoS One* 4 (1), e4194. DOI: 10.1371/journal.pone.0004194.
- Ho, Allen S.; Huang, Xin; Cao, Hongbin; Christman-Skieller, Claudia; Bennewith, Kevin; Le, Quynh-Thu; Koong, Albert C. (2010): Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. In: *Transl Oncol* 3 (2), S. 109–113.
- Holtrich, U.; Wolf, G.; Brauninger, A.; Karn, T.; Bohme, B.; Rubsamen-Waigmann, H.; Strebhardt, K. (1994): Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (5), S. 1736–1740.
- Hostetter, T. H. (1995): Progression of renal disease and renal hypertrophy. In: *Annu Rev Physiol* 57, S. 263–278. DOI: 10.1146/annurev.ph.57.030195.001403.
- Hostetter, Thomas H. (2003): Hyperfiltration and glomerulosclerosis. In: *Semin Nephrol* 23 (2), S. 194–199. DOI: 10.1053/anep.2003.50017.

- Huber, Tobias B.; Hartleben, Bjorn; Winkelmann, Kirstin; Schneider, Lisa; Becker, Jan U.; Leitges, Michael *et al.* (2009): Loss of podocyte aPKC λ /iota causes polarity defects and nephrotic syndrome. In: *J Am Soc Nephrol* 20 (4), S. 798–806. DOI: 10.1681/ASN.2008080871.
- Huntzinger, Eric; Izaurralde, Elisa (2011): Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (2), S. 99–110. DOI: 10.1038/nrg2936.
- Hutvagner, Gyorgy; Zamore, Phillip D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science* 297 (5589), S. 2056–2060. DOI: 10.1126/science.1073827.
- Hwang, Daw-Yang; Dworschak, Gabriel C.; Kohl, Stefan; Saisawat, Pawaree; Vivante, Asaf; Hilger, Alina C. *et al.* (2014): Mutations in 12 known dominant disease-causing genes clarify many congenital anomalies of the kidney and urinary tract. In: *Kidney Int* 85 (6), S. 1429–1433. DOI: 10.1038/ki.2013.508.
- Iden, Sandra; Collard, John G. (2008): Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (11), S. 846–859. DOI: 10.1038/nrm2521.
- Ikeda, Keiko; Watanabe, Yoko; Ohto, Hiromi; Kawakami, Kiyoshi (2002): Molecular interaction and synergistic activation of a promoter by Six, Eya, and Dach proteins mediated through CREB binding protein. In: *Mol Cell Biol* 22 (19), S. 6759–6766.
- Imerslund, O. (1960): Idiopathic chronic megaloblastic anemia in children. In: *Acta Paediatr Suppl* 49(Suppl 119), S. 1–115.
- Imerslund, O.; Bjornstad, P. (1963): FAMILIAL VITAMIN B12 MALABSORPTION. In: *Acta Haematol* 30, S. 1–7.
- Inoki, Ken; Zhu, Tianqing; Guan, Kun-Liang (2003): TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. In: *Cell* 115 (5), S. 577–590.
- Interactive Fly, Drosophila (2013). Online verfügbar unter <http://www.sdbonline.org/sites/fly/dbzhnsky/dachsud1.htm>, zuletzt aktualisiert am 22.11.2013, zuletzt geprüft am 09.02.2015.
- International HapMap Consortium (2003): The International HapMap Project. In: *Nature* 426 (6968), S. 789–796. DOI: 10.1038/nature02168.
- International HapMap Consortium (2005): A haplotype map of the human genome. In: *Nature* 437 (7063), S. 1299–1320. DOI: 10.1038/nature04226.
- Irwin, M.; Marin, M. C.; Phillips, A. C.; Seelan, R. S.; Smith, D. I.; Liu, W. *et al.* (2000): Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. In: *Nature* 407 (6804), S. 645–648. DOI: 10.1038/35036614.
- Ishida, Mayumi; Shimojo, Hideaki; Hayashi, Aki; Kawaguchi, Rika; Ohtani, Yasuko; Uegaki, Koichi *et al.* (2012): Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. In: *Mol Cell* 47 (2), S. 228–241. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.017.

- Islam, Tareq M.; Fox, Caroline S.; Mann, Devin; Muntner, Paul (2009): Age-related associations of hypertension and diabetes mellitus with chronic kidney disease. In: *BMC nephrology* 10, S. 17. DOI: 10.1186/1471-2369-10-17.
- Ivan, Mircea; Harris, Adrian L.; Martelli, Fabio; Kulshreshtha, Ritu (2008): Hypoxia response and microRNAs: no longer two separate worlds. In: *J Cell Mol Med* 12 (5A), S. 1426–1431. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2008.00398.x.
- Iwai, Soichi; Yonekawa, Atsuko; Harada, Chie; Hamada, Masakazu; Katagiri, Wataru; Nakazawa, Mituhiro; Yura, Yoshiaki (2010): Involvement of the Wnt-beta-catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. In: *Int J Oncol* 37 (5), S. 1095–1103.
- Izaurrealde, Elisa (2014): microRNAs als molekulare Etiketten zur gezielten Ausschaltung von mRNA. Forschungsbericht 2014 - Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie.
- Jaakkola, P.; Mole, D. R.; Tian, Y. M.; Wilson, M. I.; Gielbert, J.; Gaskell, S. J. *et al.* (2001): Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. In: *Science* 292 (5516), S. 468–472. DOI: 10.1126/science.1059796.
- Jacinto, Estela; Loewith, Robbie; Schmidt, Anja; Lin, Shuo; Ruegg, Markus A.; Hall, Alan; Hall, Michael N. (2004): Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In: *Nat Cell Biol* 6 (11), S. 1122–1128. DOI: 10.1038/ncb1183.
- Jacob, U.; Gocan, A.; Rohr, U.D. (2009): Applikation von fermentierter Soja bei Krebspatienten zur Verminderung von Kachexie und Erhöhung der Apoptose - eine prospektive Pilotstudie. In: *Journal für Gynäkologische Endokrinologie*. Online verfügbar unter <http://www.kup.at/kup/pdf/8155.pdf>, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- Jain, Sanjay; Suarez, Adrian A.; McGuire, John; Liapis, Helen (2007): Expression profiles of congenital renal dysplasia reveal new insights into renal development and disease. In: *Pediatr Nephrol* 22 (7), S. 962–974. DOI: 10.1007/s00467-007-0466-6.
- Janmey, P. A. (1994): Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin assembly and disassembly. In: *Annu Rev Physiol* 56, S. 169–191. DOI: 10.1146/annurev.ph.56.030194.001125.
- Jaspard, Emmanuel (2015): Regulation glycolyse glycolysis kinase protein structure function relationship Enseignement recherche Biochimie Universite Angers Emmanuel Jaspard biochimej. Online verfügbar unter <http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/3BiochMetab/6RegulGlycolyse/1RegulGLYCOLYSE.html>, zuletzt aktualisiert am 09.02.2015, zuletzt geprüft am 11.02.2015.
- Jenkins, G. H.; Fisette, P. L.; Anderson, R. A. (1994): Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. In: *J Biol Chem* 269 (15), S. 11547–11554.
- Johnson, D. G. (1995): Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. In: *Oncogene* 11 (9), S. 1685–1692.
- Johnson, Erik C.; Kazgan, Nevzat; Bretz, Colin A.; Forsberg, Lawrence J.; Hector, Clare E.; Worthen, Ryan J. *et al.* (2010): Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused

by reduced AMPK function in *Drosophila*. In: *PLoS One* 5 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0012799.

Jurchott, Karsten; Bergmann, Stephan; Stein, Ulrike; Walther, Wolfgang; Janz, Martin; Manni, Isabella *et al.* (2003): YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. In: *J Biol Chem* 278 (30), S. 27988–27996. DOI: 10.1074/jbc.M212966200.

Kahn, Barbara B.; Alquier, Thierry; Carling, David; Hardie, D. Grahame (2005): AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. In: *Cell Metab* 1 (1), S. 15–25. DOI: 10.1016/j.cmet.2004.12.003.

Kanda, N.; Schreck, R.; Alt, F.; Bruns, G.; Baltimore, D.; Latt, S. (1983): Isolation of amplified DNA sequences from IMR-32 human neuroblastoma cells: facilitation by fluorescence-activated flow sorting of metaphase chromosomes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (13), S. 4069–4073.

Kasinath, Balakuntalam S.; Mariappan, Meenalakshmi M.; Sataranatarajan, Kavithalakshmi; Lee, Myung Ja; Feliars, Denis (2006): mRNA translation: unexplored territory in renal science. In: *J Am Soc Nephrol* 17 (12), S. 3281–3292. DOI: 10.1681/ASN.2006050488.

Kawamura, Yoshinori; Saito, Kuniaki; Kin, Taishin; Ono, Yukiteru; Asai, Kiyoshi; Sunohara, Takafumi *et al.* (2008): *Drosophila* endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. In: *Nature* 453 (7196), S. 793–797. DOI: 10.1038/nature06938.

Keane, William F.; Eknoyan, Garabed (1999): Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE). A position paper of the National Kidney Foundation. In: *American Journal of Kidney Diseases* 33 (5), S. 1004–1010. DOI: 10.1016/S0272-6386(99)70442-7.

Kenerson, Heidi L.; Aicher, Lauri D.; True, Lawrence D.; Yeung, Raymond S. (2002): Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors. In: *Cancer Res* 62 (20), S. 5645–5650.

Keppetipola, Niroshika; Shuman, Stewart (2007): Characterization of the 2',3' cyclic phosphodiesterase activities of *Clostridium thermocellum* polynucleotide kinase-phosphatase and bacteriophage lambda phosphatase. In: *Nucleic Acids Res* 35 (22), S. 7721–7732. DOI: 10.1093/nar/gkm868.

Keppetipola, Niroshika; Shuman, Stewart (2008): A phosphate-binding histidine of binuclear metallophosphodiesterase enzymes is a determinant of 2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase activity. In: *J Biol Chem* 283 (45), S. 30942–30949. DOI: 10.1074/jbc.M805064200.

Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (1985): *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*.

Kestila, Marjo; Jarvela, Irma (2003): Prenatal diagnosis of congenital nephrotic syndrome (CNF, NPHS1). In: *Prenat Diagn* 23 (4), S. 323–324. DOI: 10.1002/pd.589.

- Kim, Do-Hyung; Sarbassov, D. D.; Ali, Siraj M.; King, Jessie E.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye *et al.* (2002): mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. In: *Cell* 110 (2), S. 163–175.
- Kim, V. Narry (2005): MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (5), S. 376–385. DOI: 10.1038/nrm1644.
- Kim, V. Narry (2006): Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. In: *Genes Dev* 20 (15), S. 1993–1997. DOI: 10.1101/gad.1456106.
- Kiriakidou, Marianthi; Tan, Grace S.; Lamprinaki, Styliani; Planell-Sagner, Mariangels de; Nelson, Peter T.; Mourelatos, Zissimos (2007): An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. In: *Cell* 129 (6), S. 1141–1151. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.016.
- Kondo, K.; Yao, M.; Kobayashi, K.; Ota, S.; Yoshida, M.; Kaneko, S. *et al.* (2001): PTEN/MMAC1/TEP1 mutations in human primary renal-cell carcinomas and renal carcinoma cell lines. In: *Int J Cancer* 91 (2), S. 219–224.
- Korenjak, Michael; Brehm, Alexander (2005): E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. In: *Curr Opin Genet Dev* 15 (5), S. 520–527. DOI: 10.1016/j.gde.2005.07.001.
- Korn, Thomas; Bettelli, Estelle; Oukka, Mohamed; Kuchroo, Vijay K. (2009): IL-17 and Th17 Cells. In: *Annu Rev Immunol* 27, S. 485–517. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
- Köttgen, Anna; Glazer, Nicole L.; Dehghan, Abbas; Hwang, Shih-Jen; Katz, Ronit; Li, Man *et al.* (2009): Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. In: *Nat Genet* 41 (6), S. 712–717. DOI: 10.1038/ng.377.
- Köttgen, Anna; Pattaro, Cristian; Boger, Carsten A.; Fuchsberger, Christian; Olden, Matthias; Glazer, Nicole L. *et al.* (2010): New loci associated with kidney function and chronic kidney disease. In: *Nat Genet* 42 (5), S. 376–384. DOI: 10.1038/ng.568.
- Kozyraki, R.; Fyfe, J.; Kristiansen, M.; Gerdes, C.; Jacobsen, C.; Cui, S. *et al.* (1999): The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. In: *Nat Med* 5 (6), S. 656–661. DOI: 10.1038/9504.
- Krahn, Michael P.; Wodarz, Andreas (2012): Phosphoinositide lipids and cell polarity: linking the plasma membrane to the cytocortex. In: *Essays Biochem* 53, S. 15–27. DOI: 10.1042/bse0530015.
- Kramer-Zucker, Albrecht G.; Wiessner, Stephanie; Jensen, Abbie M.; Drummond, Iain A. (2005): Organization of the pronephric filtration apparatus in zebrafish requires Nephhrin, Podocin and the FERM domain protein Mosaic eyes. In: *Dev Biol* 285 (2), S. 316–329. DOI: 10.1016/j.ydbio.2005.06.038.
- Krek, W.; Livingston, D. M.; Shirodkar, S. (1993): Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. In: *Science* 262 (5139), S. 1557–1560.

- Krol, Jacek; Loedige, Inga; Filipowicz, Witold (2010): The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (9), S. 597–610. DOI: 10.1038/nrg2843.
- Kuller, L. H.; Eichner, J. E.; Orchard, T. J.; Grandits, G. A.; McCallum, L.; Tracy, R. P. (1991): The relation between serum albumin levels and risk of coronary heart disease in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. In: *Am J Epidemiol* 134 (11), S. 1266–1277.
- Kurusu, M.; Nagao, T.; Walldorf, U.; Flister, S.; Gehring, W. J.; Furukubo-Tokunaga, K. (2000): Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the Drosophila brain, by the eyeless, twin of eyeless, and Dachshund genes. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (5), S. 2140–2144. DOI: 10.1073/pnas.040564497.
- Kwon, E. J.; Oh, E. J.; Kim, Y. S.; Hirose, F.; Ohno, K.; Nishida, Y. *et al.* (2001): E2F-dependent transcription of the raf proto-oncogene during Drosophila development. In: *Nucleic Acids Res* 29 (8), S. 1808–1814.
- Ladha, M. H.; Lee, K. Y.; Upton, T. M.; Reed, M. F.; Ewen, M. E. (1998): Regulation of exit from quiescence by p27 and cyclin D1-CDK4. In: *Mol Cell Biol* 18 (11), S. 6605–6615.
- Lai, Eric C. (2003): microRNAs: runts of the genome assert themselves. In: *Curr Biol* 13 (23), R925-36.
- Lam, E. W.; Watson, R. J. (1993): An E2F-binding site mediates cell-cycle regulated repression of mouse B-myb transcription. In: *EMBO J* 12 (7), S. 2705–2713.
- Lamouille, Samy; Derynck, Rik (2007): Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. In: *J Cell Biol* 178 (3), S. 437–451. DOI: 10.1083/jcb.200611146.
- Landthaler, Markus; Yalcin, Abdullah; Tuschl, Thomas (2004): The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. In: *Curr Biol* 14 (23), S. 2162–2167. DOI: 10.1016/j.cub.2004.11.001.
- Lane, H. A.; Nigg, E. A. (1996): Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. In: *J Cell Biol* 135 (6 Pt 2), S. 1701–1713.
- Lavoie, J. N.; L'Allemain, G.; Brunet, A.; Muller, R.; Pouyssegur, J. (1996): Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. In: *J Biol Chem* 271 (34), S. 20608–20616.
- Lee, Chung-Han; Inoki, Ken; Guan, Kun-Liang (2007): mTOR pathway as a target in tissue hypertrophy. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, S. 443–467. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105359.
- Lee, Woo Je; Kim, Mina; Park, Hye-Sun; Kim, Hyoun Sik; Jeon, Min Jae; Oh, Ki Sook *et al.* (2006): AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. In: *Biochem Biophys Res Commun* 340 (1), S. 291–295. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.011.

- Lee, Yoontae; Ahn, Chiyong; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin *et al.* (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. In: *Nature* 425 (6956), S. 415–419. DOI: 10.1038/nature01957.
- Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. In: *EMBO J* 23 (20), S. 4051–4060. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- Lee, Yu Jin; Han, Ho Jae (2008): Albumin-stimulated DNA synthesis is mediated by Ca²⁺/PKC as well as EGF receptor-dependent p44/42 MAPK and NF-kappaB signal pathways in renal proximal tubule cells. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 294 (3), F534–41. DOI: 10.1152/ajprenal.00408.2007.
- Leivonen, S.-K.; Ala-Aho, R.; Koli, K.; Grenman, R.; Peltonen, J.; Kahari, V.-M. (2006): Activation of Smad signaling enhances collagenase-3 (MMP-13) expression and invasion of head and neck squamous carcinoma cells. In: *Oncogene* 25 (18), S. 2588–2600. DOI: 10.1038/sj.onc.1209291.
- Leivonen, Suvi-Katri; Kahari, Veli-Matti (2007): Transforming growth factor-beta signaling in cancer invasion and metastasis. In: *Int J Cancer* 121 (10), S. 2119–2124. DOI: 10.1002/ijc.23113.
- Lenk, Christian; Duttge, Gunnar; Fangerau, Heiner (2014): Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen. [Place of publication not identified]: Springer Science and Business Media.
- Levy, H. L. (1973): Genetic screening. In: *Adv Hum Genet* 4, S. 1–104.
- Li, B.; Ouyang, B.; Pan, H.; Reissmann, P. T.; Slamon, D. J.; Arceci, R. *et al.* (1996): Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. In: *J Biol Chem* 271 (32), S. 19402–19408.
- Li, Chenglin; Zhou, Xinliang; Wang, Yadi; Jing, Shaowu; Yang, Congrong; Sun, Guogui *et al.* (2014): miR-210 regulates esophageal cancer cell proliferation by inducing G2/M phase cell cycle arrest through targeting PLK1. In: *Molecular medicine reports* 10 (4), S. 2099–2104. DOI: 10.3892/mmr.2014.2416.
- Li, Rong; Gundersen, Gregg G. (2008): Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (11), S. 860–873. DOI: 10.1038/nrm2522.
- Li, Tianrun; Cao, Hengchang; Zhuang, Jinman; Wan, Jun; Guan, Ming; Yu, Bo *et al.* (2011): Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. In: *Clin Chim Acta* 412 (1-2), S. 66–70. DOI: 10.1016/j.cca.2010.09.029.
- Li, Xue; Oghi, Kenneth A.; Zhang, Jie; Krones, Anna; Bush, Kevin T.; Glass, Christopher K. *et al.* (2003): Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. In: *Nature* 426 (6964), S. 247–254. DOI: 10.1038/nature02083.
- Lieberthal, Wilfred; Levine, Jerrold S. (2009): The role of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in renal disease. In: *J Am Soc Nephrol* 20 (12), S. 2493–2502. DOI: 10.1681/ASN.2008111186.

- Liguori, Lucia; Andolfo, Immacolata; Antonellis, Paqualino de; Aglio, Veruska; Di Dato, Valeria; Marino, Natascia *et al.* (2012): The metallophosphodiesterase Mpped2 impairs tumorigenesis in neuroblastoma. In: *Cell Cycle* 11 (3), S. 569–581. DOI: 10.4161/cc.11.3.19063.
- Ling, L. E.; Schulz, J. T.; Cantley, L. C. (1989): Characterization and purification of membrane-associated phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from human red blood cells. In: *J Biol Chem* 264 (9), S. 5080–5088.
- Linsel-Nitschke, Patrick; Tall, Alan R. (2005): HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. In: *Nat Rev Drug Discov* 4 (3), S. 193–205. DOI: 10.1038/nrd1658.
- Lippman, Zachary; Martienssen, Rob (2004): The role of RNA interference in heterochromatic silencing. In: *Nature* 431 (7006), S. 364–370. DOI: 10.1038/nature02875.
- Liscovitch, M.; Cantley, L. C. (1995): Signal transduction and membrane traffic: the P1TP/phosphoinositide connection. In: *Cell* 81 (5), S. 659–662.
- Liu, Jidong; Carmell, Michelle A.; Rivas, Fabiola V.; Marsden, Carolyn G.; Thomson, J. Michael; Song, Ji-Joon *et al.* (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. In: *Science* 305 (5689), S. 1437–1441. DOI: 10.1126/science.1102513.
- Liu, Qinghua; Rand, Tim A.; Kalidas, Savitha; Du, Fenghe; Kim, Hyun-Eui; Smith, Dean P.; Wang, Xiaodong (2003): R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. In: *Science* 301 (5641), S. 1921–1925. DOI: 10.1126/science.1088710.
- Liu, Xiaoqi; Erikson, Raymond L. (2002): Activation of Cdc2/cyclin B and inhibition of centrosome amplification in cells depleted of Plk1 by siRNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (13), S. 8672–8676. DOI: 10.1073/pnas.132269599.
- Liu, Xiaoqi; Erikson, Raymond L. (2003): Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (10), S. 5789–5794. DOI: 10.1073/pnas.1031523100.
- Liu, Xuhang; Fortin, Kristine; Mourelatos, Zissimos (2008): MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (1), S. 113–121. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2007.00121.x.
- Liu, Youhua (2004): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. In: *J Am Soc Nephrol* 15 (1), S. 1–12.
- Lloberas, Nuria; Cruzado, Josep M.; Franquesa, Marcella; Herrero-Fresneda, Immaculada; Torras, Joan; Alperovich, Gabriela *et al.* (2006): Mammalian target of rapamycin pathway blockade slows progression of diabetic kidney disease in rats. In: *J Am Soc Nephrol* 17 (5), S. 1395–1404. DOI: 10.1681/ASN.2005050549.
- Lock, Helen R.; Sacks, Steven H.; Robson, Michael G. (2007): Rapamycin at subimmunosuppressive levels inhibits mesangial cell proliferation and extracellular matrix

production. In: *Am J Physiol Renal Physiol* 292 (1), F76-81. DOI: 10.1152/ajprenal.00128.2006.

Loijens, J. C.; Boronenkov, I. V.; Parker, G. J.; Anderson, R. A. (1996): The phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase family. In: *Adv Enzyme Regul* 36, S. 115–140.

Lukas, J.; Petersen, B. O.; Holm, K.; Bartek, J.; Helin, K. (1996): Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. In: *Mol Cell Biol* 16 (3), S. 1047–1057.

Lüllmann-Rauch, Renate (2003): *Histologie. Verstehen - Lernen - Nachschlagen*. Stuttgart: Thieme.

Ma, Jin-Biao; Yuan, Yu-Ren; Meister, Gunter; Pei, Yi; Tuschl, Thomas; Patel, Dinshaw J. (2005): Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. In: *Nature* 434 (7033), S. 666–670. DOI: 10.1038/nature03514.

MacRae, Ian J.; Ma, Enbo; Zhou, Min; Robinson, Carol V.; Doudna, Jennifer A. (2008): In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2), S. 512–517. DOI: 10.1073/pnas.0710869105.

Magenta, Alessandra; Greco, Simona; Gaetano, Carlo; Martelli, Fabio (2013): Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. In: *International journal of molecular sciences* 14 (9), S. 17319–17346. DOI: 10.3390/ijms140917319.

Mainx, Felix (1949): *Das Kleine Drosophila-Praktikum*. Vienna: Springer Vienna. Online verfügbar unter http://download.springer.com/static/pdf/904/bfm%253A978-3-7091-2401-7%252F1.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Fbook%2Fbfm%3A978-3-7091-2401-7%2F1&token2=exp=1439481520~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F904%2Fbfm%25253A978-3-7091-2401-7%252F1.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Fbook%252Fbfm%253A978-3-7091-2401-7%252F1*~hmac=098d9014f6f34b157862aa200401f8a67a708e8762619800f5589f02258344c, zuletzt geprüft am 13.08.2015.

Mandal, Lolitika; Banerjee, Utpal; Hartenstein, Volker (2004): Evidence for a fruit fly hemangioblast and similarities between lymph-gland hematopoiesis in fruit fly and mammal aorta-gonadal-mesonephros mesoderm. In: *Nat Genet* 36 (9), S. 1019–1023. DOI: 10.1038/ng1404.

Manolio, Teri A. (2010): Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. In: *The New England journal of medicine* 363 (2), S. 166–176. DOI: 10.1056/NEJMra0905980.

Manolio, Teri A.; Brooks, Lisa D.; Collins, Francis S. (2008): A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. In: *J Clin Invest* 118 (5), S. 1590–1605. DOI: 10.1172/JCI34772.

Manski, Dr. med. Dirk (2015): *Kongenitales nephrotisches Syndrom* – www.urologielehrbuch.de. Online verfügbar unter

http://www.urologielehrbuch.de/kongenitales_nephrose_syndrom.html, zuletzt aktualisiert am 06.01.2015, zuletzt geprüft am 15.02.2015.

Mao, C. D.; Hoang, P.; DiCorleto, P. E. (2001): Lithium inhibits cell cycle progression and induces stabilization of p53 in bovine aortic endothelial cells. In: *J Biol Chem* 276 (28), S. 26180–26188. DOI: 10.1074/jbc.M101188200.

Mardon, G.; Solomon, N. M.; Rubin, G. M. (1994): dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. In: *Development* 120 (12), S. 3473–3486.

Mariappan, Meenalakshmi M.; Feliers, Denis; Mummidi, Srinivas; Choudhury, Goutam Ghosh; Kasinath, Balakuntalam S. (2007): High glucose, high insulin, and their combination rapidly induce laminin-beta1 synthesis by regulation of mRNA translation in renal epithelial cells. In: *Diabetes* 56 (2), S. 476–485. DOI: 10.2337/db05-1334.

Marsin, A. S.; Bertrand, L.; Rider, M. H.; Deprez, J.; Beauloye, C.; Vincent, M. F. *et al.* (2000): Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. In: *Curr Biol* 10 (20), S. 1247–1255.

Martin-Belmonte, Fernando; Gassama, Ama; Datta, Anirban; Yu, Wei; Rescher, Ursula; Gerke, Volker; Mostov, Keith (2007): PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. In: *Cell* 128 (2), S. 383–397. DOI: 10.1016/j.cell.2006.11.051.

Martinez, Javier; Tuschl, Thomas (2004): RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. In: *Genes Dev* 18 (9), S. 975–980. DOI: 10.1101/gad.1187904.

Massague, J.; Blain, S. W.; Lo, R. S. (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. In: *Cell* 103 (2), S. 295–309.

Matranga, Christian; Tomari, Yukihide; Shin, Chanseok; Bartel, David P.; Zamore, Phillip D. (2005): Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. In: *Cell* 123 (4), S. 607–620. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.044.

Matsuzaki, Koichi (2012): Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. In: *Cell Tissue Res* 347 (1), S. 225–243. DOI: 10.1007/s00441-011-1178-6.

Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E. *et al.* (1999): The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. In: *Nature* 399 (6733), S. 271–275. DOI: 10.1038/20459.

McMahon, Gearoid M.; O'Seaghda, Conall M.; Hwang, Shih-Jen; Meigs, James B.; Fox, Caroline S. (2014): The association of a single-nucleotide polymorphism in CUBN and the risk of albuminuria and cardiovascular disease. In: *Nephrol Dial Transplant* 29 (2), S. 342–347. DOI: 10.1093/ndt/gft386.

Means, A. L.; Slansky, J. E.; McMahon, S. L.; Knuth, M. W.; Farnham, P. J. (1992): The HIP1 binding site is required for growth regulation of the dihydrofolate reductase gene promoter. In: *Mol Cell Biol* 12 (3), S. 1054–1063.

- Meguid El Nahas, A.; Bello, Aminu K. (2005): Chronic kidney disease: the global challenge. In: *Lancet* 365 (9456), S. 331–340. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17789-7.
- Meister, Gunter; Tuschl, Thomas (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. In: *Nature* 431 (7006), S. 343–349. DOI: 10.1038/nature02873.
- Mellman, Ira; Nelson, W. James (2008): Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (11), S. 833–845. DOI: 10.1038/nrm2525.
- Mello, Craig C.; Conte, Darryl Jr. (2004): Revealing the world of RNA interference. In: *Nature* 431 (7006), S. 338–342. DOI: 10.1038/nature02872.
- Miyoshi, Keita; Miyoshi, Tomohiro; Hartig, Julia Verena; Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2010): Molecular mechanisms that funnel RNA precursors into endogenous small-interfering RNA and microRNA biogenesis pathways in *Drosophila*. In: *RNA (New York, N.Y.)* 16 (3), S. 506–515. DOI: 10.1261/rna.1952110.
- Miyoshi, Keita; Tsukumo, Hiroko; Nagami, Tomoko; Siomi, Haruhiko; Siomi, Mikiko C. (2005): Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. In: *Genes Dev* 19 (23), S. 2837–2848. DOI: 10.1101/gad.1370605.
- Moffat, Cynthia; Harper, Mary Ellen (2010): Metabolic functions of AMPK: aspects of structure and of natural mutations in the regulatory gamma subunits. In: *IUBMB Life* 62 (10), S. 739–745. DOI: 10.1002/iub.387.
- Moon, Nam-Sung; Frolov, Maxim V.; Kwon, Eun-Jeong; Di Stefano, Luisa; Dimova, Dessislava K.; Morris, Erick J. *et al.* (2005): *Drosophila* E2F1 has context-specific pro- and antiapoptotic properties during development. In: *Dev Cell* 9 (4), S. 463–475. DOI: 10.1016/j.devcel.2005.08.015.
- Moritz, A.; Westerman, J.; De Graan, P N; Payraastre, B.; Gispen, W. H.; Wirtz, K. W. (1993): Characterization of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activities from bovine brain membranes. In: *Biochim Biophys Acta* 1168 (1), S. 79–86.
- Morrison, D. K.; Kaplan, D. R.; Escobedo, J. A.; Rapp, U. R.; Roberts, T. M.; Williams, L. T. (1989): Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. In: *Cell* 58 (4), S. 649–657.
- Mu, J.; Brozinick, J. T. Jr.; Valladares, O.; Bucan, M.; Birnbaum, M. J. (2001): A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. In: *Mol Cell* 7 (5), S. 1085–1094.
- Müller, H.; Bracken, A. P.; Vernell, R.; Moroni, M. C.; Christians, F.; Grassilli, E. *et al.* (2001): E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. In: *Genes Dev* 15 (3), S. 267–285. DOI: 10.1101/gad.864201.
- Munger, Karl; Howley, Peter M. (2002): Human papillomavirus immortalization and transformation functions. In: *Virus Res* 89 (2), S. 213–228.
- Murphree, A. L.; Benedict, W. F. (1984): Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. In: *Science* 223 (4640), S. 1028–1033.

- Nakamura, E.; Sato, M.; Yang, H.; Miyagawa, F.; Harasaki, M.; Tomita, K. *et al.* (1999): 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. In: *J Biol Chem* 274 (5), S. 3009–3016.
- Nana-Sinkam, S. Patrick; Croce, Carlo M. (2010): MicroRNA in chronic lymphocytic leukemia: transitioning from laboratory-based investigation to clinical application. In: *Cancer genetics and cytogenetics* 203 (2), S. 127–133. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2010.09.007.
- Nevins, J. R. (1992): Transcriptional regulation. A closer look at E2F. In: *Nature* 358 (6385), S. 375–376. DOI: 10.1038/358375a0.
- Nevins, J. R.; Raychaudhuri, P.; Yee, A. S.; Rooney, R. J.; Kovesdi, I.; Reichel, R. (1988): Transactivation by the adenovirus E1A gene. In: *Biochem Cell Biol* 66 (6), S. 578–583.
- Nielsen, Marianne J.; Rasmussen, Mie R.; Andersen, Christian B F; Nexø, Ebba; Moestrup, Søren K. (2012): Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9 (6), S. 345–354. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.76.
- Nielsen, Rikke; Christensen, Erik Ilso (2010): Proteinuria and events beyond the slit. In: *Pediatr Nephrol* 25 (5), S. 813–822. DOI: 10.1007/s00467-009-1381-9.
- North, S.; Espanel, X.; Bantignies, F.; Viollet, B.; Vallet, V.; Jalinot, P. *et al.* (1999): Regulation of cdc2 gene expression by the upstream stimulatory factors (USFs). In: *Oncogene* 18 (11), S. 1945–1955. DOI: 10.1038/sj.onc.1202506.
- O'Donnell, Michael J.; Ianowski, Juan P.; Linton, Stuart M.; Rheault, Mark R. (2003): Inorganic and organic anion transport by insect renal epithelia. In: *Biochim Biophys Acta* 1618 (2), S. 194–206.
- Okamura, Katsutomo; Chung, Wei-Jen; Ruby, J. Graham; Guo, Huili; Bartel, David P.; Lai, Eric C. (2008): The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. In: *Nature* 453 (7196), S. 803–806. DOI: 10.1038/nature07015.
- Okamura, Katsutomo; Hagen, Joshua W.; Duan, Hong; Tyler, David M.; Lai, Eric C. (2007): The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. In: *Cell* 130 (1), S. 89–100. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.028.
- Orban, Tamas I.; Izaurralde, Elisa (2005): Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. In: *RNA (New York, N.Y.)* 11 (4), S. 459–469. DOI: 10.1261/rna.7231505.
- Ouseph, Madhu M.; Li, Jing; Chen, Hui-Zi; Pecot, Thierry; Wenzel, Pamela; Thompson, John C. *et al.* (2012): Atypical E2F repressors and activators coordinate placental development. In: *Dev Cell* 22 (4), S. 849–862. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.01.013.
- Palacín, M. (1994): A new family of proteins (rBAT and 4F2hc) involved in cationic and zwitterionic amino acid transport: a tale of two proteins in search of a transport function. In: *The Journal of experimental biology* 196, S. 123–137.
- Palacín, M.; Goodyer, P.; Nunes, V.; Gasparini, P. (2001): Cystinuria. In: *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*, 2001 (8th edition), S. 4909–4932.

- Paluszczak, Jaroslaw; Sarbak, Joanna; Kostrzewska-Poczekaj, Magdalena; Kiwerska, Katarzyna; Jarmuz-Szymczak, Malgorzata; Grenman, Reidar *et al.* (2014): The negative regulators of Wnt pathway-DACH1, DKK1, and WIF1 are methylated in oral and oropharyngeal cancer and WIF1 methylation predicts shorter survival. In: *Tumour Biol.* DOI: 10.1007/s13277-014-2913-x.
- Pan, David A.; Hardie, D. Grahame (2002): A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion. In: *Biochem J* 367 (Pt 1), S. 179–186. DOI: 10.1042/BJ20020703.
- Pardali, Katerina; Kowanetz, Marcin; Heldin, Carl-Henrik; Moustakas, Aristidis (2005): Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). In: *J Cell Physiol* 204 (1), S. 260–272. DOI: 10.1002/jcp.20304.
- Parker, James S.; Roe, S. Mark; Barford, David (2004): Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. In: *EMBO J* 23 (24), S. 4727–4737. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600488.
- Parker, James S.; Roe, S. Mark; Barford, David (2005): Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. In: *Nature* 434 (7033), S. 663–666. DOI: 10.1038/nature03462.
- Patrakka, J.; Kestila, M.; Wartiovaara, J.; Ruotsalainen, V.; Tissari, P.; Lenkkeri, U. *et al.* (2000): Congenital nephrotic syndrome (NPHS1): features resulting from different mutations in Finnish patients. In: *Kidney Int* 58 (3), S. 972–980. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2000.00254.x.
- Pattaro, Cristian; Kottgen, Anna; Teumer, Alexander; Garnaas, Maija; Boger, Carsten A.; Fuchsberger, Christian *et al.* (2012): Genome-wide association and functional follow-up reveals new loci for kidney function. In: *PLoS Genet* 8 (3), e1002584. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002584.
- Payrastre, B.; Nievers, M.; Boonstra, J.; Breton, M.; Verkleij, A. J.; van Bergen en Henegouwen, P M (1992): A differential location of phosphoinositide kinases, diacylglycerol kinase, and phospholipase C in the nuclear matrix. In: *J Biol Chem* 267 (8), S. 5078–5084.
- Payrastre, B.; van Bergen en Henegouwen, P. M.; Breton, M.; den Hartigh, J C; Plantavid, M.; Verkleij, A. J.; Boonstra, J. (1991): Phosphoinositide kinase, diacylglycerol kinase, and phospholipase C activities associated to the cytoskeleton: effect of epidermal growth factor. In: *J Cell Biol* 115 (1), S. 121–128.
- Pedersen, Gitte Albinus; Chakraborty, Souvik; Steinhauser, Amie L.; Traub, Linton M.; Madsen, Mette (2010): AMN directs endocytosis of the intrinsic factor-vitamin B(12) receptor cubam by engaging ARH or Dab2. In: *Traffic* 11 (5), S. 706–720. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2010.01042.x.
- Pediconi, Natalia; Ianari, Alessandra; Costanzo, Antonio; Belloni, Laura; Gallo, Rita; Cimino, Letizia *et al.* (2003): Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. In: *Nat Cell Biol* 5 (6), S. 552–558. DOI: 10.1038/ncb998.

- Peifer, M.; Polakis, P. (2000): Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. In: *Science* 287 (5458), S. 1606–1609.
- Pescarmona, Prof. Gian Piero (Hg.): Cubilin and Megalin. Online verfügbar unter <http://flipper.diff.org/app/pathways/info/1509>, zuletzt geprüft am 06.02.2015.
- Petersen, Christian P.; Bordeleau, Marie-Eve; Pelletier, Jerry; Sharp, Phillip A. (2006): Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. In: *Mol Cell* 21 (4), S. 533–542. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.01.031.
- Pfeiffer, R.; Rossier, G.; Spindler, B.; Meier, C.; Kuhn, L.; Verrey, F. (1999): Amino acid transport of y+L-type by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of the glycoprotein-associated amino acid transporter family. In: *EMBO J* 18 (1), S. 49–57. DOI: 10.1093/emboj/18.1.49.
- Pfeiffer, R.; Spindler, B.; Loffing, J.; Skelly, P. J.; Shoemaker, C. B.; Verrey, F. (1998): Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. In: *FEBS Lett* 439 (1-2), S. 157–162.
- Podobnik, Marjetka; Tyagi, Richa; Matange, Nishad; Dermol, Urska; Gupta, Arun K.; Mattoo, Rohini *et al.* (2009): A mycobacterial cyclic AMP phosphodiesterase that moonlights as a modifier of cell wall permeability. In: *J Biol Chem* 284 (47), S. 32846–32857. DOI: 10.1074/jbc.M109.049635.
- Pon, Yuen L.; Zhou, Hong Y.; Cheung, Annie N Y; Ngan, Hextan Y S; Wong, Alice S T (2008): p70 S6 kinase promotes epithelial to mesenchymal transition through snail induction in ovarian cancer cells. In: *Cancer Res* 68 (16), S. 6524–6532. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6302.
- Popov, Vladimir M.; Wu, Kongming; Zhou, Jie; Powell, Michael J.; Mardon, Graeme; Wang, Chenguang; Pestell, Richard G. (2010): The Dachshund gene in development and hormone-responsive tumorigenesis. In: *Trends Endocrinol Metab* 21 (1), S. 41–49. DOI: 10.1016/j.tem.2009.08.002.
- Powe, Desmond G.; Dhondalay, Gopal Krishna R; Lemetre, Christophe; Allen, Tony; Habashy, Hany O.; Ellis, Ian O. *et al.* (2014): DACH1: its role as a classifier of long term good prognosis in luminal breast cancer. In: *PLoS One* 9 (1), e84428. DOI: 10.1371/journal.pone.0084428.
- Pras, E.; Arber, N.; Aksentijevich, I.; Katz, G.; Schapiro, J. M.; Prosen, L. *et al.* (1994): Localization of a gene causing cystinuria to chromosome 2p. In: *Nat Genet* 6 (4), S. 415–419. DOI: 10.1038/ng0494-415.
- Puissegur, M-P; Mazure, N. M.; Bertero, T.; Pradelli, L.; Grosso, S.; Robbe-Sermesant, K. *et al.* (2011): miR-210 is overexpressed in late stages of lung cancer and mediates mitochondrial alterations associated with modulation of HIF-1 activity. In: *Cell Death Differ* 18 (3), S. 465–478. DOI: 10.1038/cdd.2010.119.
- Qiao, Aijun; Khechaduri, Arineh; Kannan Mutharasan, R.; Wu, Rongxue; Nagpal, Varun; Ardehali, Hossein (2013): MicroRNA-210 decreases heme levels by targeting ferrochelatase in cardiomyocytes. In: *J Am Heart Assoc* 2 (2), e000121. DOI: 10.1161/JAHA.113.000121.

- Qiu, Jie; Zhou, Xiao-Yu; Zhou, Xiao-Guang; Cheng, Rui; Liu, Hai-Ying; Li, Yong (2013): Neuroprotective effects of microRNA-210 against oxygen-glucose deprivation through inhibition of apoptosis in PC12 cells. In: *Molecular medicine reports* 7 (6), S. 1955–1959. DOI: 10.3892/mmr.2013.1431.
- Qiu, Jie; Zhou, Xiao-Yu; Zhou, Xiao-Guang; Li, Yong; Cheng, Rui; Liu, Hai-Ying (2014): MicroRNA-210 knockdown contributes to apoptosis caused by oxygen glucose deprivation in PC12 cells. In: *Molecular medicine reports* 11 (1), S. 719–723. DOI: 10.3892/mmr.2014.2651.
- Ran, Xiaozhuo; Bian, Xiaofang; Ji, Yongchang; Yan, Xiumin; Yang, Feng; Li, Fang (2013): White spot syndrome virus IE1 and WSV056 modulate the G1/S transition by binding to the host retinoblastoma protein. In: *Journal of virology* 87 (23), S. 12576–12582. DOI: 10.1128/JVI.01551-13.
- Rand, Tim A.; Petersen, Sean; Du, Fenghe; Wang, Xiaodong (2005): Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. In: *Cell* 123 (4), S. 621–629. DOI: 10.1016/j.cell.2005.10.020.
- Rapp, U. R. (1991): Role of Raf-1 serine/threonine protein kinase in growth factor signal transduction. In: *Oncogene* 6 (4), S. 495–500.
- Ravindran, Gokulan; Devaraj, Halagowder (2012): Aberrant expression of beta-catenin and its association with DeltaNp63, Notch-1, and clinicopathological factors in oral squamous cell carcinoma. In: *Clin Oral Investig* 16 (4), S. 1275–1288. DOI: 10.1007/s00784-011-0605-0.
- Reiter, Ali K.; Bolster, Douglas R.; Crozier, Stephen J.; Kimball, Scot R.; Jefferson, Leonard S. (2005): Repression of protein synthesis and mTOR signaling in rat liver mediated by the AMPK activator aminoimidazole carboxamide ribonucleoside. In: *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288 (5), E980-8. DOI: 10.1152/ajpendo.00333.2004.
- Reynolds, Bruno; Roversi, Pietro; Laynes, Robert; Kazi, Shubana; Boyd, C. A. Richard; Goberdhan, Deborah C. I. (2009): *Drosophila* expresses a CD98 transporter with an evolutionarily conserved structure and amino acid-transport properties. In: *Biochem J* 420 (3), S. 363–372. DOI: 10.1042/BJ20082198.
- Reznichenko, Anna; Snieder, Harold; van den Born, Jacob; de Borst, Martin H.; Damman, Jeffrey; van Dijk, Marcory C. R. F. *et al.* (2012): CUBN as a novel locus for end-stage renal disease: insights from renal transplantation. In: *PLoS One* 7 (5), e36512. DOI: 10.1371/journal.pone.0036512.
- Richter, Joel D.; Sonenberg, Nahum (2005): Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. In: *Nature* 433 (7025), S. 477–480. DOI: 10.1038/nature03205.
- Richter, Wito (2002): 3',5' Cyclic nucleotide phosphodiesterases class III: members, structure, and catalytic mechanism. In: *Proteins* 46 (3), S. 278–286.
- Riek, Uwe; Scholz, Roland; Konarev, Peter; Rufner, Arne; Suter, Marianne; Nazabal, Alexis *et al.* (2008): Structural properties of AMP-activated protein kinase: dimerization, molecular shape, and changes upon ligand binding. In: *J Biol Chem* 283 (26), S. 18331–18343. DOI: 10.1074/jbc.M708379200.

- Roberts, T. M. (1992): Cell biology. A signal chain of events. In: *Nature* 360 (6404), S. 534–535. DOI: 10.1038/360534a0.
- Roshak, A. K.; Capper, E. A.; Imburgia, C.; Fornwald, J.; Scott, G.; Marshall, L. A. (2000): The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. In: *Cell Signal* 12 (6), S. 405–411.
- Ross, R. A.; Spengler, B. A.; Biedler, J. L. (1983): Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. In: *J Natl Cancer Inst* 71 (4), S. 741–747.
- Röther, Susanne; Meister, Gunter (2011): Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. In: *Biochimie* 93 (11), S. 1905–1915. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.07.032.
- Royzman, I.; Whittaker, A. J.; Orr-Weaver, T. L. (1997): Mutations in Drosophila DP and E2F distinguish G1-S progression from an associated transcriptional program. In: *Genes Dev* 11 (15), S. 1999–2011.
- Ruby, J. Graham; Jan, Calvin H.; Bartel, David P. (2007): Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. In: *Nature* 448 (7149), S. 83–86. DOI: 10.1038/nature05983.
- Russell, R. R. 3rd; Bergeron, R.; Shulman, G. I.; Young, L. H. (1999): Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. In: *Am J Physiol* 277 (2 Pt 2), H643-9.
- Saito-Diaz, Kenyi; Chen, Tony W.; Wang, Xiaoxi; Thorne, Curtis A.; Wallace, Heather A.; Page-McCaw, Andrea; Lee, Ethan (2013): The way Wnt works: components and mechanism. In: *Growth Factors* 31 (1), S. 1–31. DOI: 10.3109/08977194.2012.752737.
- Sakaguchi, Masayoshi; Isono, Motohide; Isshiki, Keiji; Sugimoto, Toshiro; Koya, Daisuke; Kashiwagi, Atsunori (2006): Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice. In: *Biochem Biophys Res Commun* 340 (1), S. 296–301. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.12.012.
- Salt, I. P.; Johnson, G.; Ashcroft, S. J.; Hardie, D. G. (1998): AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release. In: *Biochem J* 335 (Pt 3), S. 533–539.
- Sandu, Cristinel; Ryoo, Hyung Don; Steller, Hermann (2010): Drosophila IAP antagonists form multimeric complexes to promote cell death. In: *J Cell Biol* 190 (6), S. 1039–1052. DOI: 10.1083/jcb.201004086.
- Sarbassov, D. D.; Ali, Siraj M.; Kim, Do-Hyung; Guertin, David A.; Latek, Robert R.; Erdjument-Bromage, Hediye *et al.* (2004): Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. In: *Curr Biol* 14 (14), S. 1296–1302. DOI: 10.1016/j.cub.2004.06.054.
- Sataranatarajan, Kavithalakshmi; Mariappan, Meenalakshmi M.; Lee, Myung Ja; Feliers, Denis; Choudhury, Goutam Ghosh; Barnes, Jeffrey L.; Kasinath, Balakuntalam S. (2007): Regulation of elongation phase of mRNA translation in diabetic nephropathy: amelioration by rapamycin. In: *Am J Pathol* 171 (6), S. 1733–1742. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070412.

- Sawado, T.; Yamaguchi, M.; Nishimoto, Y.; Ohno, K.; Sakaguchi, K.; Matsukage, A. (1998): dE2F2, a novel E2F-family transcription factor in *Drosophila melanogaster*. In: *Biochem Biophys Res Commun* 251 (2), S. 409–415. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9407.
- Schild, Raphael; Knuppel, Tanja; Konrad, Martin; Bergmann, Carsten; Trautmann, Agnes; Kemper, Markus J. *et al.* (2013): Double homozygous missense mutations in DACH1 and BMP4 in a patient with bilateral cystic renal dysplasia. In: *Nephrol Dial Transplant* 28 (1), S. 227–232. DOI: 10.1093/ndt/gfs539.
- Schwartz, F.; Eisenman, R.; Knoll, J.; Gessler, M.; Bruns, G. (1995): cDNA sequence, genomic organization, and evolutionary conservation of a novel gene from the WAGR region. In: *Genomics* 29 (2), S. 526–532. DOI: 10.1006/geno.1995.9973.
- Schwartz, F.; Neve, R.; Eisenman, R.; Gessler, M.; Bruns, G. (1994): A WAGR region gene between PAX-6 and FSHB expressed in fetal brain. In: *Hum Genet* 94 (6), S. 658–664.
- Schwartz, F.; Ota, T. (1997): The 239AB gene on chromosome 22: a novel member of an ancient gene family. In: *Gene* 194 (1), S. 57–62.
- Schwarz, Dianne S.; Tomari, Yukihide; Zamore, Phillip D. (2004): The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease. In: *Curr Biol* 14 (9), S. 787–791. DOI: 10.1016/j.cub.2004.03.008.
- Scott, John W.; Hawley, Simon A.; Green, Kevin A.; Anis, Miliea; Stewart, Greg; Scullion, Gillian A. *et al.* (2004): CBS domains form energy-sensing modules whose binding of adenosine ligands is disrupted by disease mutations. In: *J Clin Invest* 113 (2), S. 274–284. DOI: 10.1172/JCI19874.
- Scott, John W.; Ross, Fiona A.; Liu, J K David; Hardie, D. Grahame (2007): Regulation of AMP-activated protein kinase by a pseudosubstrate sequence on the gamma subunit. In: *EMBO J* 26 (3), S. 806–815. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601542.
- Selak, Mary A.; Armour, Sean M.; MacKenzie, Elaine D.; Boulahbel, Houda; Watson, David G.; Mansfield, Kyle D. *et al.* (2005): Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. In: *Cancer Cell* 7 (1), S. 77–85. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.11.022.
- Sellin, Lorenz; Huber, Tobias B.; Gerke, Peter; Quack, Ivo; Pavenstadt, Hermann; Walz, Gerd (2003): NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. In: *FASEB J* 17 (1), S. 115–117. DOI: 10.1096/fj.02-0242fje.
- Semenza, Gregg L. (2007): Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. In: *Sci STKE* 2007 (407), cm8. DOI: 10.1126/stke.4072007cm8.
- Seoane, Joan (2006): Escaping from the TGFbeta anti-proliferative control. In: *Carcinogenesis* 27 (11), S. 2148–2156. DOI: 10.1093/carcin/bgl068.
- Shachaf, Catherine M.; Kopelman, Andrew M.; Arvanitis, Constadina; Karlsson, Asa; Beer, Shelly; Mandl, Stefanie *et al.* (2004): MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. In: *Nature* 431 (7012), S. 1112–1117. DOI: 10.1038/nature03043.

- Sharrett, A. R.; Ballantyne, C. M.; Coady, S. A.; Heiss, G.; Sorlie, P. D.; Catellier, D.; Patsch, W. (2001): Coronary heart disease prediction from lipoprotein cholesterol levels, triglycerides, lipoprotein(a), apolipoproteins A-I and B, and HDL density subfractions: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. In: *Circulation* 104 (10), S. 1108–1113.
- Shegogue, Daniel; Trojanowska, Maria (2004): Mammalian target of rapamycin positively regulates collagen type I production via a phosphatidylinositol 3-kinase-independent pathway. In: *J Biol Chem* 279 (22), S. 23166–23175. DOI: 10.1074/jbc.M401238200.
- Shenoy, Avinash R.; Capuder, Maja; Draskovic, Petra; Lamba, Dorian; Visweswariah, Sandhya S.; Podobnik, Marjetka (2007): Structural and biochemical analysis of the Rv0805 cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Mycobacterium tuberculosis*. In: *J Mol Biol* 365 (1), S. 211–225. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.10.005.
- Shenoy, Avinash R.; Sreenath, Nandini; Podobnik, Marjetka; Kovacevic, Miroslav; Visweswariah, Sandhya S. (2005): The Rv0805 gene from *Mycobacterium tuberculosis* encodes a 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase: biochemical and mutational analysis. In: *Biochemistry* 44 (48), S. 15695–15704. DOI: 10.1021/bi0512391.
- Shi, Lewis Z.; Wang, Ruoning; Huang, Gonghua; Vogel, Peter; Neale, Geoffrey; Green, Douglas R.; Chi, Hongbo (2011): HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. In: *J Exp Med* 208 (7), S. 1367–1376. DOI: 10.1084/jem.20110278.
- Shi, Yigong; Massague, Joan (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. In: *Cell* 113 (6), S. 685–700.
- Shibao, K.; Takano, H.; Nakayama, Y.; Okazaki, K.; Nagata, N.; Izumi, H. *et al.* (1999): Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas. In: *Int J Cancer* 83 (6), S. 732–737.
- Shih, Andy Y.; Erb, Heidi; Sun, Xiaojian; Toda, Shigenobu; Kalivas, Peter W.; Murphy, Timothy H. (2006): Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. In: *J Neurosci* 26 (41), S. 10514–10523. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3178-06.2006.
- Shillingford, Jonathan M.; Murcia, Noel S.; Larson, Claire H.; Low, Seng Hui; Hedgpeth, Ryan; Brown, Nicole *et al.* (2006): The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (14), S. 5466–5471. DOI: 10.1073/pnas.0509694103.
- Silbernagl, S. (1988): The renal handling of amino acids and oligopeptides. In: *Physiol Rev* 68 (3), S. 911–1007.
- Simons, Matias; Hartleben, Björn; Huber, Tobias B. (2009): Podocyte polarity signalling. In: *Current opinion in nephrology and hypertension* 18 (4), S. 324–330. DOI: 10.1097/MNH.0b013e32832e316d.
- Slansky, J. E.; Farnham, P. J. (1996): Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. In: *Curr Top Microbiol Immunol* 208, S. 1–30.

- Slansky, J. E.; Li, Y.; Kaelin, W. G.; Farnham, P. J. (1993): A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. In: *Mol Cell Biol* 13 (3), S. 1610–1618.
- Smink, Paul A.; Lambers Heerspink, Hiddo J; Gansevoort, Ron T.; de Jong, Paul E; Hillege, Hans L.; Bakker, Stephan J L; Zeeuw, Dick de (2012): Albuminuria, estimated GFR, traditional risk factors, and incident cardiovascular disease: the PREVEND (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease) study. In: *Am J Kidney Dis* 60 (5), S. 804–811. DOI: 10.1053/j.ajkd.2012.06.017.
- Smith, C. D.; Chang, K. J. (1989): Regulation of brain phosphatidylinositol-4-phosphate kinase by GTP analogues. A potential role for guanine nucleotide regulatory proteins. In: *J Biol Chem* 264 (6), S. 3206–3210.
- Smith, M. R.; Wilson, M. L.; Hamanaka, R.; Chase, D.; Kung, H.; Longo, D. L.; Ferris, D. K. (1997): Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. In: *Biochem Biophys Res Commun* 234 (2), S. 397–405.
- Song, Ji-Joon; Smith, Stephanie K.; Hannon, Gregory J.; Joshua-Tor, Leemor (2004): Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. In: *Science* 305 (5689), S. 1434–1437. DOI: 10.1126/science.1102514.
- Sontheimer, Erik J.; Carthew, Richard W. (2005): Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. In: *Cell* 122 (1), S. 9–12. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.030.
- Spankuch-Schmitt, Birgit; Bereiter-Hahn, Jurgen; Kaufmann, Manfred; Strebhardt, Klaus (2002): Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. In: *J Natl Cancer Inst* 94 (24), S. 1863–1877.
- Stein, S. C.; Woods, A.; Jones, N. A.; Davison, M. D.; Carling, D. (2000): The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. In: *Biochem J* 345 Pt 3, S. 437–443.
- Steller, H. (2008): Regulation of apoptosis in *Drosophila*. In: *Cell Death Differ* 15 (7), S. 1132–1138. DOI: 10.1038/cdd.2008.50.
- Sugiyama, Tomoyasu; Cam, Hugh; Verdel, Andre; Moazed, Danesh; Grewal, Shiv I S (2005): RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (1), S. 152–157. DOI: 10.1073/pnas.0407641102.
- Tanaka-Matakatsu, Miho; Xu, Jinhua; Cheng, Leping; Du, Wei (2009): Regulation of apoptosis of rbf mutant cells during *Drosophila* development. In: *Dev Biol* 326 (2), S. 347–356. DOI: 10.1016/j.ydbio.2008.11.035.
- Tanner, Stephan M.; Aminoff, Maria; Wright, Fred A.; Liyanarachchi, Sandya; Kuronen, Mervi; Saarinen, Anne *et al.* (2003): Amnionless, essential for mouse gastrulation, is mutated in recessive hereditary megaloblastic anemia. In: *Nat Genet* 33 (3), S. 426–429. DOI: 10.1038/ng1098.
- Tao, Yunxia; Kim, Jun; Schrier, Robert W.; Edelstein, Charles L. (2005): Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease. In: *J Am Soc Nephrol* 16 (1), S. 46–51. DOI: 10.1681/ASN.2004080660.

- Thalmeier, K.; Synovzik, H.; Mertz, R.; Winnacker, E. L.; Lipp, M. (1989): Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. In: *Genes Dev* 3 (4), S. 527–536.
- The Company of Biologists Ltd (1998): Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. Unter Mitarbeit von I. A. Drummond, A. Majumdar, H. Hentschel, M. Elger, L. Solnica-Krezel, A. F. Schier *et al.* Online verfügbar unter <http://dev.biologists.org/content/125/23/4655.long>, zuletzt aktualisiert am 01.12.1998, zuletzt geprüft am 27.04.2017.
- Tomari, Yukihide; Du, Tingting; Zamore, Phillip D. (2007): Sorting of Drosophila small silencing RNAs. In: *Cell* 130 (2), S. 299–308. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.057.
- Tomari, Yukihide; Matranga, Christian; Haley, Benjamin; Martinez, Natalia; Zamore, Phillip D. (2004): A protein sensor for siRNA asymmetry. In: *Science* 306 (5700), S. 1377–1380. DOI: 10.1126/science.1102755.
- Tomari, Yukihide; Zamore, Phillip D. (2005): Perspective: machines for RNAi. In: *Genes Dev* 19 (5), S. 517–529. DOI: 10.1101/gad.1284105.
- Townley, Robert; Shapiro, Lawrence (2007): Crystal structures of the adenylate sensor from fission yeast AMP-activated protein kinase. In: *Science* 315 (5819), S. 1726–1729. DOI: 10.1126/science.1137503.
- Toyoshima-Morimoto, Fumiko; Taniguchi, Eri; Nishida, Eisuke (2002): Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. In: *EMBO Rep* 3 (4), S. 341–348. DOI: 10.1093/embo-reports/kvf069.
- Tran, D.; Gascard, P.; Berthon, B.; Fukami, K.; Takenawa, T.; Giraud, F.; Claret, M. (1993): Cellular distribution of polyphosphoinositides in rat hepatocytes. In: *Cell Signal* 5 (5), S. 565–581.
- Trimarchi, J. M.; Fairchild, B.; Verona, R.; Moberg, K.; Andon, N.; Lees, J. A. (1998): E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (6), S. 2850–2855.
- Tyagi, Richa; Shenoy, Avinash R.; Visweswariah, Sandhya S. (2009): Characterization of an evolutionarily conserved metallophosphoesterase that is expressed in the fetal brain and associated with the WAGR syndrome. In: *J Biol Chem* 284 (8), S. 5217–5228. DOI: 10.1074/jbc.M805996200.
- Urumow, T.; Wieland, O. H. (1990): Purification and partial characterization of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase from rat liver plasma membranes. Further evidence for a stimulatory G-protein. In: *Biochim Biophys Acta* 1052 (1), S. 152–158.
- Vairo, G.; Livingston, D. M.; Ginsberg, D. (1995): Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. In: *Genes Dev* 9 (7), S. 869–881.
- Valera, Vladimir A.; Walter, Beatriz A.; Linehan, W. Marston; Merino, Maria J. (2011): Regulatory Effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. In: *J Cancer* 2, S. 515–526.

- van Vugt, M.A.; Smits, V. A.; Klompmaker, R.; Medema, R. H. (2001): Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. In: *J Biol Chem* 276 (45), S. 41656–41660. DOI: 10.1074/jbc.M101831200.
- Vats, Abhay N.; Ishwad, Chandra; Vats, Kalyani R.; Moritz, Michael; Ellis, Demetrius; Mueller, Christine *et al.* (2003): Steroid-resistant nephrotic syndrome and congenital anomalies of kidneys: evidence of locus on chromosome 13q. In: *Kidney Int* 64 (1), S. 17–24. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00066.x.
- Verdel, André; Jia, Songtao; Gerber, Scott; Sugiyama, Tomoyasu; Gygi, Steven; Grewal, Shiv I S; Moazed, Danesh (2004): RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. In: *Science* 303 (5658), S. 672–676. DOI: 10.1126/science.1093686.
- Verrey, F.; Jack, D. L.; Paulsen, I. T.; Saier, M. H. Jr.; Pfeiffer, R. (1999): New glycoprotein-associated amino acid transporters. In: *J Membr Biol* 172 (3), S. 181–192.
- Verrey, Francois (2003): System L: heteromeric exchangers of large, neutral amino acids involved in directional transport. In: *Pflugers Arch* 445 (5), S. 529–533. DOI: 10.1007/s00424-002-0973-z.
- Vijayakrishnan, Niranjana; Woodruff, Elvin A.; Broadie, Kendal (2009): Rolling blackout is required for bulk endocytosis in non-neuronal cells and neuronal synapses. In: *J Cell Sci* 122 (Pt 1), S. 114–125. DOI: 10.1242/jcs.036673.
- Volkl, H.; Silbernagl, S. (1982): Mutual inhibition of L-cystine/L-cysteine and other neutral amino acids during tubular reabsorption. A microperfusion study in rat kidney. In: *Pflugers Arch* 395 (3), S. 190–195.
- Volpe, Thomas A.; Kidner, Catherine; Hall, Ira M.; Teng, Grace; Grewal, Shiv I S; Martienssen, Robert A. (2002): Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. In: *Science* 297 (5588), S. 1833–1837. DOI: 10.1126/science.1074973.
- Waes, Gelineau-van; Janee; Maddox; R, Joyce; Smith; M, Lynette *et al.* (2008): Microarray analysis of E9.5 reduced folate carrier (RFC1; Slc19a1) knockout embryos reveals altered expression of genes in the cubilin-megalin multiligand endocytic receptor complex. BioMed Central Ltd. Online verfügbar unter <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/156>, zuletzt aktualisiert am 09.04.2008, zuletzt geprüft am 17.08.2015.
- Wagner, C. A.; Lang, F.; Broer, S. (2001): Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (4), C1077-93.
- Wang, Haopeng; Flach, Henrik; Onizawa, Michio; Wei, Lai; McManus, Michael T.; Weiss, Arthur (2014): Negative regulation of Hif1a expression and TH17 differentiation by the hypoxia-regulated microRNA miR-210. In: *Nature immunology* 15 (4), S. 393–401. DOI: 10.1038/ni.2846.
- Watanabe, Akira; Ogiwara, Hideki; Ehata, Shogo; Mukasa, Akitake; Ishikawa, Shumpei; Maeda, Daichi *et al.* (2011): Homozygously deleted gene DACH1 regulates tumor-initiating activity of glioma cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (30), S. 12384–12389. DOI: 10.1073/pnas.0906930108.

- Weaver, Casey T.; Hatton, Robin D.; Mangan, Paul R.; Harrington, Laurie E. (2007): IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. In: *Annu Rev Immunol* 25, S. 821–852. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.
- Weavers, Helen; Prieto-Sánchez, Silvia; Grawe, Ferdinand; Garcia-López, Amparo; Artero, Ruben; Wilsch-Bräuninger, Michaela *et al.* (2009): The insect nephrocyte is a podocyte-like cell with a filtration slit diaphragm. In: *Nature* 457 (7227), S. 322–326. DOI: 10.1038/nature07526.
- Weber, Stefanie; Taylor, Jaclyn C.; Winyard, Paul; Baker, Kari F.; Sullivan-Brown, Jessica; Schild, Raphael *et al.* (2008): SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. In: *J Am Soc Nephrol* 19 (5), S. 891–903. DOI: 10.1681/ASN.2006111282.
- Weijts, Bart G. M. W.; Bakker, Walbert J.; Cornelissen, Peter W A; Liang, Kuo-Hsuan; Schaftenaar, Frank H.; Westendorp, Bart *et al.* (2012): E2F7 and E2F8 promote angiogenesis through transcriptional activation of VEGFA in cooperation with HIF1. In: *EMBO J* 31 (19), S. 3871–3884. DOI: 10.1038/emboj.2012.231.
- Wessing, A. (1965): The nucleolus and its relations to the ribosomes of cytoplasm. A study of the malpighian vessels of *Drosophila melanogaster*. In: *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 65, S. 445–480.
- Wheaton, William W.; Chandel, Navdeep S. (2011): Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 300 (3), C385-93. DOI: 10.1152/ajpcell.00485.2010.
- Wiesener, M. S.; Munchenhagen, P. M.; Berger, I.; Morgan, N. V.; Roigas, J.; Schwiertz, A. *et al.* (2001): Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. In: *Cancer Res* 61 (13), S. 5215–5222.
- Wikipedia (Hg.) (2015): Gal4/UAS-System. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=137909667>, zuletzt aktualisiert am 13.07.2015, zuletzt geprüft am 16.08.2015.
- Wikipedia (Hg.) (2017): Einzelnukleotid-Polymorphismus. Online verfügbar unter <https://de.wikipedia.org/w/index.php?oldid=162253788>, zuletzt aktualisiert am 11.04.2017, zuletzt geprüft am 26.04.2017.
- Winder, W. W.; Hardie, D. G. (1996): Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. In: *Am J Physiol* 270 (2 Pt 1), E299-304.
- Wodarz, A.; Nusse, R. (1998): Mechanisms of Wnt signaling in development. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, S. 59–88. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.14.1.59.
- Woods, A.; Salt, I.; Scott, J.; Hardie, D. G.; Carling, D. (1996): The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro. In: *FEBS Lett* 397 (2-3), S. 347–351.
- Wu, C. L.; Zukerberg, L. R.; Ngwu, C.; Harlow, E.; Lees, J. A. (1995): In vivo association of E2F and DP family proteins. In: *Mol Cell Biol* 15 (5), S. 2536–2546.

- Wu, Kongming; Chen, Ke; Wang, Chenguang; Jiao, Xuanmao; Wang, Liping; Zhou, Jie *et al.* (2014a): Cell fate factor DACH1 represses YB-1-mediated oncogenic transcription and translation. In: *Cancer Res* 74 (3), S. 829–839. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2466.
- Wu, Kongming; Jiao, Xuanmao; Li, Zhaoming; Katiyar, Sanjay; Casimiro, Mathew C.; Yang, Wancai *et al.* (2011): Cell fate determination factor Dachshund reprograms breast cancer stem cell function. In: *J Biol Chem* 286 (3), S. 2132–2142. DOI: 10.1074/jbc.M110.148395.
- Wu, Kongming; Katiyar, Sanjay; Li, Anping; Liu, Manran; Ju, Xiaoming; Popov, Vladimir M. *et al.* (2008): Dachshund inhibits oncogene-induced breast cancer cellular migration and invasion through suppression of interleukin-8. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (19), S. 6924–6929. DOI: 10.1073/pnas.0802085105.
- Wu, Kongming; Li, Anping; Rao, Mahadev; Liu, Manran; Dailey, Vernon; Yang, Ying *et al.* (2006a): DACH1 is a cell fate determination factor that inhibits cyclin D1 and breast tumor growth. In: *Mol Cell Biol* 26 (19), S. 7116–7129. DOI: 10.1128/MCB.00268-06.
- Wu, Kongming; Yang, Ying; Wang, Chenguang; Davoli, Maria A.; D'Amico, Mark; Li, Anping *et al.* (2003): DACH1 inhibits transforming growth factor-beta signaling through binding Smad4. In: *J Biol Chem* 278 (51), S. 51673–51684. DOI: 10.1074/jbc.M310021200.
- Wu, Liang; Herman, James G.; Brock, Malcolm V.; Wu, Kongming; Mao, Gaoping; Yan, Wenji *et al.* (2014b): Silencing DACH1 promotes esophageal cancer growth by inhibiting TGF-beta signaling. In: *PLoS One* 9 (4), e95509. DOI: 10.1371/journal.pone.0095509.
- Wu, Ligang; Fan, Jihua; Belasco, Joel G. (2006b): MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (11), S. 4034–4039. DOI: 10.1073/pnas.0510928103.
- Wu, Shaoguang; Rhee, Ki-Jong; Albesiano, Emilia; Rabizadeh, Shervin; Wu, Xinqun; Yen, Hung-Rong *et al.* (2009): A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses. In: *Nat Med* 15 (9), S. 1016–1022. DOI: 10.1038/nm.2015.
- Wullschleger, Stephan; Loewith, Robbie; Hall, Michael N. (2006): TOR signaling in growth and metabolism. In: *Cell* 124 (3), S. 471–484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xiao, Bing; Heath, Richard; Saiu, Peter; Leiper, Fiona C.; Leone, Philippe; Jing, Chun *et al.* (2007): Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. In: *Nature* 449 (7161), S. 496–500. DOI: 10.1038/nature06161.
- Yamaguchi, M.; Hayashi, Y.; Hirose, F.; Nishimoto, Y.; Matsukage, A. (1997): Distinct roles of E2F recognition sites as positive or negative elements in regulation of the DNA polymerase alpha 180 kDa catalytic subunit gene promoter during *Drosophila* development. In: *Nucleic Acids Res* 25 (19), S. 3847–3854.
- Yamaguchi, M.; Hayashi, Y.; Matsukage, A. (1995): Essential role of E2F recognition sites in regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene promoter during *Drosophila* development. In: *J Biol Chem* 270 (42), S. 25159–25165.

- Yan, Wenji; Wu, Kongming; Herman, James G.; Brock, Malcolm V.; Fuks, Francois; Yang, Lili *et al.* (2013): Epigenetic regulation of DACH1, a novel Wnt signaling component in colorectal cancer. In: *Epigenetics* 8 (12), S. 1373–1383. DOI: 10.4161/epi.26781.
- Yang, Yi; Wang, Jingjing; Qin, Ling; Shou, Zhangfei; Zhao, Jie; Wang, Huiping *et al.* (2007): Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats. In: *Am J Nephrol* 27 (5), S. 495–502. DOI: 10.1159/000106782.
- Ye, Hong; Rouault, Tracey A. (2010): Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. In: *Biochemistry* 49 (24), S. 4945–4956. DOI: 10.1021/bi1004798.
- Yokoyama, Yuko; Grunebach, Frank; Schmidt, Susanne M.; Heine, Annkristin; Hantschel, Maik; Stevanovic, Stefan *et al.* (2008): Matrilysin (MMP-7) is a novel broadly expressed tumor antigen recognized by antigen-specific T cells. In: *Clin Cancer Res* 14 (17), S. 5503–5511. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4041.
- Yoshioka, Yusuke; Kosaka, Nobuyoshi; Ochiya, Takahiro; Kato, Takashi (2012): Micromanaging Iron Homeostasis: hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. In: *J Biol Chem* 287 (41), S. 34110–34119. DOI: 10.1074/jbc.M112.356717.
- Yuan, Yu-Ren; Pei, Yi; Ma, Jin-Biao; Kuryavyi, Vitaly; Zhadina, Maria; Meister, Gunter *et al.* (2005): Crystal structure of A. aeolicus argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. In: *Mol Cell* 19 (3), S. 405–419. DOI: 10.1016/j.molcel.2005.07.011.
- Zamanian, M.; La Thangue, N. B. (1992): Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from repressing the activity of a cellular transcription factor. In: *EMBO J* 11 (7), S. 2603–2610.
- Zhang, Fujian; Zhao, Ying; Chao, Yufang; Muir, Katherine; Han, Zhe (2013a): Cubilin and amnionless mediate protein reabsorption in Drosophila nephrocytes. In: *J Am Soc Nephrol* 24 (2), S. 209–216. DOI: 10.1681/ASN.2012080795.
- Zhang, Fujian; Zhao, Ying; Han, Zhe (2013b): An in vivo functional analysis system for renal gene discovery in Drosophila pericardial nephrocytes. In: *J Am Soc Nephrol* 24 (2), S. 191–197. DOI: 10.1681/ASN.2012080769.
- Zhang, Huafeng; Gao, Ping; Fukuda, Ryo; Kumar, Ganesh; Krishnamachary, Balaji; Zeller, Karen I. *et al.* (2007): HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. In: *Cancer Cell* 11 (5), S. 407–420. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.04.001.
- Zhou, Qiong; Su, Yuan; Bai, Ming (2008): Effect of antisense RNA targeting Polo-like kinase 1 on cell growth in A549 lung cancer cells. In: *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 28 (1), S. 22–26. DOI: 10.1007/s11596-008-0106-9.
- Zhou, Rui; Czech, Benjamin; Brennecke, Julius; Sachidanandam, Ravi; Wohlschlegel, James A.; Perrimon, Norbert; Hannon, Gregory J. (2009): Processing of Drosophila endo-siRNAs depends on a specific Loquacious isoform. In: *RNA (New York, N.Y.)* 15 (10), S. 1886–1895. DOI: 10.1261/rna.1611309.

Zhu, Hongbin; Wu, Kongming; Yan, Wenji; Hu, Ling; Yuan, Jing; Dong, Yan et al. (2013): Epigenetic silencing of DACH1 induces loss of transforming growth factor-beta1 antiproliferative response in human hepatocellular carcinoma. In: *Hepatology* 58 (6), S. 2012–2022. DOI: 10.1002/hep.26587.

Zhuang, Shufei; Shao, Huanjie; Guo, Fengli; Trimble, Rhonda; Pearce, Elspeth; Abmayr, Susan M. (2009): Sns and Kirre, the Drosophila orthologs of Nephrin and Neph1, direct adhesion, fusion and formation of a slit diaphragm-like structure in insect nephrocytes. In: *Development* 136 (14), S. 2335–2344. DOI: 10.1242/dev.031609.

Zu, Xuyu; Zhang, Qinghai; Cao, Renxian; Liu, Jianghua; Zhong, Jing; Wen, Gebo; Cao, Deliang (2012): Transforming growth factor-beta signaling in tumor initiation, progression and therapy in breast cancer: an update. In: *Cell Tissue Res* 347 (1), S. 73–84. DOI: 10.1007/s00441-011-1225-3.

8. Erklärung

Diese Dissertation wurde von Prof. Dr. Dr. Michael Krahn angeregt und ihre Ausarbeitung wurde auch von ihm überwacht.

Ich erkläre hiermit, 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)

(Unterschrift)

9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater für die tolle Betreuung, die hilfreichen Ratschläge, die schnellen email-Antworten und den unkomplizierten Verlauf dieser Doktorarbeit bedanken!

Danke auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppen Krahn und Witzgall für die nette Aufnahme im Labor!

Das größte Dankeschön geht an Flodrun für eure Hilfe, eure Unterstützung und euren Humor!
Ohne euch hätten die Balett Tänzer es nie zur Aufführung geschafft!

Kunst in Epoxid