

# **Identifikation von Calmodulin und C-Myc als Interaktionspartner von Polyduktin**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.) der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Carmen Grünewald**

geboren in Waldbröl

Bonn Januar 2010

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn angefertigt.

1. Referent: Prof. Dr. R. Büttner
2. Referent: Prof. Dr. K. Willecke

Erscheinungsjahr: 2010

Tag der Promotionsprüfung: 18.05.2010

## **Erklärung zur Urheberschaft**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Carmen Grünewald

Bonn, Januar 2010

---

<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>13</b>
<b>1. Die Niere</b>	<b>13</b>
<b>2. Die Leber</b>	<b>15</b>
2.1 Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge	15
<b>3. Polyzystische Nierenerkrankungen</b>	<b>18</b>
3.1 Nephronophthise	19
3.2 Medulläre zystische Nierenerkrankungen (MCDK)	19
3.3 Glomeroluzystische Nierenerkrankung (GCKD)	20
3.3 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)	20
3.3.1 ADPKD Typ I	21
3.3.2 ADPKD Typ II	22
3.4 Autosomal rezessive polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD)	22
3.4.1 Kongenitale hepatische Fibrose (CHF)	25
3.4.2 Das ARPKD-Gen PKHD1	26
3.4.3 Mutationsanalyse des PKHD1-Gens	26
3.4.4 Polyduktin/Fibrocystin	27
3.5 Tiermodelle	30
<b>4. Das Protoonkogen c-Myc</b>	<b>31</b>
4.1 c-Myc und polyzystische Nierenerkrankungen	32
4.2 Das c-Myc-ERT-Fusionsprotein	32
4.3 Die Rosa $\Delta$ neo-Maus	32
<b>5. Zielsetzung</b>	<b>34</b>
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>36</b>
<b>1. Chemikalien</b>	<b>36</b>
<b>2. Verbrauchsmaterialien</b>	<b>39</b>
<b>3. Kits</b>	<b>40</b>
<b>4. DNS-Größenstandards und Protein-Molekulargewichtsstandard</b>	<b>40</b>
<b>5. Radiochemikalien</b>	<b>40</b>
<b>6. Medien und Zusätze für die Kultivierung von Säugerzellen</b>	<b>40</b>



---

<b>7. Antikörper</b>	<b>41</b>
<b>8. Enzyme</b>	<b>41</b>
<b>9. Geräte</b>	<b>41</b>
<b>10. Zellen</b>	<b>42</b>
<b>11. Oligonukleotide</b>	<b>43</b>
11.1 pkhd1cDNS	43
11.2 TAP-Strategie	44
11.3 pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc	44
<b>12. cDNS-Klone</b>	<b>45</b>
<b>13. Methoden</b>	<b>45</b>
13.1 Molekularbiologische Methoden	45
13.2 Proteinbiochemische Methoden	52
13.2 Immunhistochemie	58
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>59</b>
<b>1. Klonierung der murinen pkhd1-cDNS</b>	<b>59</b>
1.1 Klonierungsstrategie der murinen pkhd1-cDNS	60
1.2 Nachweis des offenen Leserahmens der pkhd1-cDNS	61
3.3 Funktioneller Nachweis von Polyduktin	62
3.3 Klonierung einer eGFP-markierten pkhd1-cDNS	63
3.4 Lokalisation von Polyduktin in den Lysosomen	64
<b>2. TAP-Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern von Polyduktin</b>	<b>67</b>
2.1 Klonierung des TAP-Expressionsplasmids	69
2.2 TAP-Aufreinigung	71
2.3 2D-Elektrophorese zur Analyse der aufgereinigten Proteinkomplexe	73
2.4 Koimmunopräzipitation von Polyduktin und Calmodulin	75
2.5 Immunfluoreszenzen in Cos7-Zellen	76
<b>3. Pkhd1ex40 del/del Rosa26<math>\Delta</math>neo myc/myc-Mäuse</b>	<b>78</b>
3.1 Immunhistochemische Untersuchungen von pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc-Mäusen	80
3.2 Kolokalisation von Polyduktin und C-Myc	85

<b>IV. Diskussion</b>	<b>87</b>
1. Klonierung der murinen pkhd1cDNS	87
<b>2. TAP-Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern von Polyduktin</b>	<b>90</b>
3. Pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc-Mäuse	95
<b>V. Literatur</b>	<b>101</b>
<b>VI. Anhang</b>	<b>108</b>
1. Sequenz der pkhd1 cDNS im Vergleich zu Sequenzdaten aus der Ensembl-Datenbank	108
2. Ergebnisse der Massenspektrometrie	125
2.1 Calmodulin	125
2.2 $\beta$ - Tubulin	125
2.3 Aktin	126

## Zusammenfassung

Die autosomal rezessiv vererbte polyzystische Nierenkrankheit ARPKD (autosomal recessive polycystic kidney disease) zählt mit einer Inzidenz von 1 in 20.000 Lebendgeburten zu den häufigsten Nephropatien im Kindesalter. Das klinische Spektrum ist sehr variabel, und in etwa 50% der Fälle versterben die Betroffenen noch innerhalb des ersten Lebensjahrs aufgrund einer respiratorischen Insuffizienz. Die Erkrankung manifestiert sich in Niere und Leber, indem es zur Ausbildung von Zysten in den Sammelrohren der Niere, sowie zu Hyperplasie und Dysplasie der Gallengänge in der Leber kommt. Letztere entstehen durch eine Fehlentwicklung der Duktalplatte, die während der embryonalen Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge den Portaltrakt umgibt. Klassischerweise ist die ARPKD mit einer fortschreitenden kongenitalen Fibrose assoziiert, die innerhalb der hepatischen Periportalfelder auftritt.

Bei der ARPKD handelt es sich um eine monogenetische Erkrankung, die durch Mutationen im *PKHD1*-Gen (polycystic kidney and hepatic disease 1) verursacht wird. Der genomische Locus umfasst 500kb genomischer DNS, in denen mindestens 86 Exone enthalten sind, die in einem komplexen Muster verschiedener Spleißvarianten zusammengesetzt werden. Der längste offene Leserahmen beinhaltet 67 Exone, die für das Protein Polyduktin (Fibrozystin) kodieren. Polyduktin besteht aus 4074 Aminosäuren und besitzt laut Strukturvorhersagen eine große extrazelluläre N-terminale Domäne mit zahlreichen funktionellen Motiven, eine singuläre Transmembrandomäne und einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus mit potentiellen Phosphorylierungsstellen. Der Aufbau des Proteins weist auf eine Funktion als Rezeptor hin. Darüber hinaus scheint der C-Terminus von Polyduktin abgespalten und in den Zellkern transloziert zu werden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die gesamte 12,2 kb umfassende murine *pkhd1* cDNS zu isolieren und in ein eukaryotisches Expressionsplasmid zu ligieren. Durch Sequenzierungen, *in vitro*-Translation und Western-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass der Leserahmen der cDNS nach der PCR-Amplifikation unverändert erhalten blieb. Dies konnte auch durch Zellkulturexperimente bewiesen werden. Nach Transfektion von Cos7-Zellen mit der *pkhd1* cDNS und einem eGFP-*pkhd1*-Fusionskonstrukt konnte Polyduktin an der Zellmembran und in vesikulären Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Eine Vitalfärbung der Lysosomen zeigte, dass es sich bei den angefärbten Vesikeln um Lysosomen handelt. Die Lokalisation des rekombinanten Polyduktin in den Lysosomen ist vermutlich dem Transport zu den Lysosomen über

Phagozytose und Autophagozytose aufgrund der Überexpression zurückzuführen. Durch die Experimente konnte sichergestellt werden, dass die *pkhd1c* cDNS für weitere Funktionsanalysen und die Suche nach Interaktionspartnern genutzt werden kann.

Die Funktion von Polyduktin ist bislang ungeklärt. Die klonierte *pkhd1c* cDNS diente als Grundlage für die Suche nach einem potentiellen Interaktionspartner mittels der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsprotein aus der TAP-Domäne und dem C-Terminus des murinen Polyduktin hergestellt und in HEK293T-Zellen exprimiert. Als potentielle Interaktionspartner wurden  $\beta$ -Tubulin, Aktin und Calmodulin durch Massenspektrometrie identifiziert. Die Interaktion des murinen Polyduktin C-Terminus mit Calmodulin, konnte durch Koimmunopräzipitation und Zellkulturexperimente in Cos7-Zellen bestätigt werden. Die Zellkulturexperimente zeigten, dass es zu einer Kolokalisation des Polyduktin C-Terminus und Calmodulin im Zytoplasma, im Zellkern und den Centrosomen kommt.

Um den Zusammenhang zwischen C-Myc und Polyduktin näher zu analysieren, wurden die beiden bereits beschriebenen Mauslinien *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc* (Jäger et al., 2004) und *Pkhd1<sup>ex40</sup> del/del* (Moser et al., 2005) miteinander gekreuzt. Die doppeltransgenen Mäuse zeigten keine Veränderung der Niere, allerdings konnte eine signifikant erhöhte Proliferationsrate der Cholangiozyten nachgewiesen werden. Zellkulturexperimente zeigten darüber hinaus, dass es zu einer Kolokalisation des Polyduktin C-Terminus und C-Myc in den Nukleoli des Zellkerns kommt.

Sowohl die Interaktion des Polyduktin C-Terminus mit Calmodulin an den Centrosomen, als auch die Interaktion mit C-Myc in den Nukleoli, weisen auf eine Rolle von Polyduktin in der Kontrolle des Zellzyklus hin. Es könnte sich bei Polyduktin folglich um ein Tumorsuppressorprotein handeln.

Darüber hinaus könnte Calmodulin nach der proteolytischen Abspaltung des Polyduktin C-Terminus durch eine direkte Interaktion an seiner Translokation in den Zellkern beteiligt sein.

---

# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
ADPKD	autosomal dominant polycystic kidney disease
Amp.	Ampicillin
ARPKD	autosomal recessive polycystic kidney disease
AS	Aminosäure(n)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C-	Carboxyterminus, carboxyterminal
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion(en)
CAML	Calcium Modulating Cyclophilin Ligand
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNS	copy DNS
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Caln	Calmodulin
Calmodulin	calcium modulated protein
CHF	Congenital Hepatic Fibrosis; kongenitale Leberfibrose
Ci	Curie, Maßeinheit der Radioaktivität
cm	Zentimeter
CoIP	Koimmunopräzipitation
cpk	congenital polycystic kidney
Cre/loxP	Causes recombination / locus of crossover (x) in P1
CT	C-Terminus
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

---

dNTP(s)	Desoxy-Nukleosidtriphosphat(e)
DP	Duktalplatte
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ER	Östrogenrezeptor
et al.	in Verbindung mit Referenzangaben: „et altera“, und andere
for	Synonym für vorwärts („sense“) bei Primerangaben
g	Gramm
GCKD	glomerulozystische Nierenerkrankung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HEK	Human Embryonic Kidney
HGFR	Hepatic Growth Factor Receptor
HNF-1 $\beta$	Hepatocyte Nuclear Factor
IPT	Immunoglobulin-like fold shared by plexin transcription factors
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium zur Kultivierung von <i>E.coli</i>
M	molar
Max	MYC associated factor X
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromolar
mA	Milliampere
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion(en)
MCDK	Medulläre zystische Nierenerkrankung
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
min	Minute(n)
MIZ1	MYC-interacting Zinc Finger Protein 1
ml	Milliliter

---

mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMLV	Moloney-Murine Leukemia Virus
mut	mutiert
Myc	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homologs
N-	Aminoterminus, aminoterminal
Na <sup>2+</sup>	Natriumion(en)
NaAc	Natriumazetat
neo	Neomycinresistenzgen
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NPHP	Nephronophthise
NLS	Nuclear localization signal
pa	Polyadenylierungssignal
p.a.	Synonym für Analysenqualität
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pck	polycystic kidney
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCM	Pericentriolärem Material
PbH1	Parrallel beta-Helix 1
PGK	Phosphoglyceratkinase
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKD	polycystic kidney disease
<i>pkhd1, PKHD1</i>	polycystic kidney and hepatic disease 1
qpa	vierfaches Polyadenylierungssignal
ran	RAs-related Nuclear protein
rev	Synonym für rückwärts („antisense“) bei Primerangaben
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur

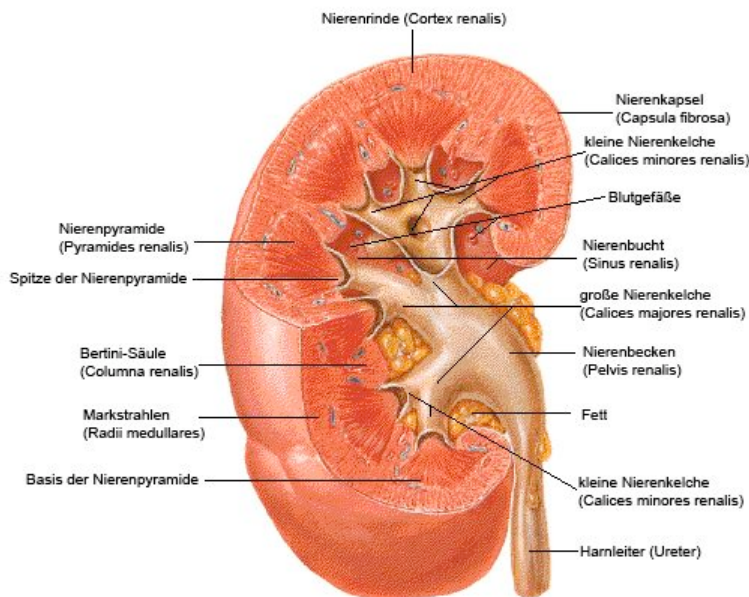
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
sa	Spleißakzeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SMART	Simple Modulat Architecture Research Tool
snoRNPs	small nucleolar RNA-protein complexes
SOX	(SRY (sex determining region Y)-box)
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
Tab.	Tabelle
TAP	Tandem-Affinity-Purification
Taq	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TIG/IPT	Immunoglobulin-like fold shared by plexin transcription factors
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRP	transient receptor potential
UMOD	Uromodulin
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp



# I. Einleitung

## 1. Die Niere

Die paarig angelegten Nieren sind das wichtigste Organ zur Erhaltung der Homöostase. Sie regeln die Wasser- und Salzausscheidung und damit den osmotischen Druck, außerdem sind sie zusammen mit der Lunge für den Säure-Base-Haushalt des Körpers verantwortlich. Als exkretorisches Organ scheiden sie harnpflichtige Stoffwechselprodukte wie Kreatinin (Abbauprodukt aus dem Muskelstoffwechsel), Harnstoff (Abbauprodukt aus dem Eiweißstoffwechsel), Harnsäure (Abbauprodukt der Nukleinsäuren) sowie körperfremde Stoffe (Medikamente) aus. Darüber hinaus übernimmt die Niere eine endokrine Funktion, indem sie z.B. das Peptidhormon Erythropoetin für die Blutbildung synthetisiert.



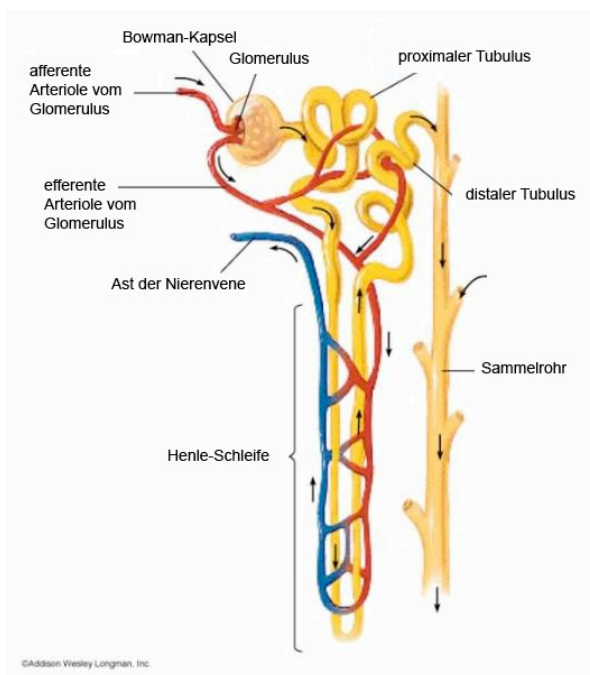
**Abb.1.1: Schematische Darstellung der humanen Niere**

Die Niere kann in die äußere Nierenrinde (*Cortex renalis*) und das innere Nierenmark (*Medulla renalis*) eingeteilt werden. Der im exkretorischen System der Niere gebildete Urin gelangt zunächst in das Nierenbecken (*Pelvis renalis*) und von dort über den Harnleiter zur Blase. Bild modifiziert nach: <http://galileo.phys.virginia.edu/classes/304/kidney.gif>

Beim Menschen liegen die Nieren retroperitoneal beiderseits der Wirbelsäule unterhalb des Zwerchfells und in Höhe des zwölften Brustwirbels bis zum dritten Lendenwirbel. Sie sind von einer bindegewebigen Kapsel, der *Capsula fibrosa*, umgeben und können in zwei Regionen eingeteilt werden, den *Cortex renalis* (Nierenrinde) und die *Medulla renalis* (Nierenmark). Die Medulla wird aus 10 bis 20 Nierenpyramiden gebildet, in denen die

Sammelrohre und die Henleschen-Schleifen liegen. Der ca. 1 cm breite Cortex hingegen enthält die Glomeruli (Nierenkörperchen) und die gewundenen Abschnitte der Nierentubuli (siehe Abbildung 1.1).

Durch die beiden Nierenarterien werden den Nieren 1/3 der Gesamtblutmenge im großen Kreislauf zugeführt. Die Nierenarterie teilt sich in die interlobulären Arterien, aus denen die Radiärarterien hervorgehen, welche ihrerseits die afferenten Arteriolen der Glomeruli abgeben. Das Kapillarnetz eines Glomerulus wird von einer zuführenden Arteriole gespeist (*vas afferens*). Eine efferente Arteriole (*vas efferens*) leitet das Blut wieder aus dem Glomerulus heraus. Anschließend geht es in das Kapillarnetz über, das die Nierentubuli umspinnt und sammelt sich in den Venen (siehe Abbildung 1.2). Die Nierenvenen münden in die untere Hohlvene.



#### Abb. 1.2: Schematischer Aufbau eines Nephrons

Das Nephron bildet die funktionelle Einheit der Niere. Es besteht im Wesentlichen aus dem von der Bowman-Kapsel umgebenen Glomerulus, dem proximalen Tubulus, dem absteigendem und aufsteigendem Ast der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus. Hinzu kommt der ableitende Ast des Sammelrohrs, der mehreren Nephronen gemeinsam ist. Blut tritt über die afferente Arteriole in den Glomerulus ein und verlässt ihn über die efferente Arteriole.

Bild modifiziert nach: <http://i27.photobucket.com/albums/c190/lovesthesunset/anatomy%20and%20physiology/bnephron.jpg>

Jede Niere enthält ca. eine Million Nephronen, die die funktionelle Einheit der Niere darstellen. Jedes Nephron besteht aus einem als Glomerulus bezeichneten Blutkapillarknäuel und einem einzigen langen Tubulus, dessen blindes Ende die Ummantelung des Glomerulus bildet, die als Bowman-Kapsel bezeichnet wird. Das andere Ende bildet einen Nierentubulus der schließlich in das Sammelrohr mündet. Der Blutdruck presst Wasser, Harnstoff, Salze und andere niedermolekulare Solute aus dem im Glomerulus enthaltenen Blut in das Lumen der Bowman-Kapsel, während Blutkörperchen

und Proteine nicht durchtreten können. Das so entstandene Ultrafiltrat gelangt aus der Bowman-Kapsel in den proximalen Nierentubulus, wo durch aktiven Transport 75% der Na<sup>+</sup>-Ionen und in ihrem Gefolge 75% der Cl<sup>-</sup>-Ionen, sowie nahezu alle Glukose- und Aminosäuremoleküle wieder in die Blutbahn übertreten. Die Reabsorbtion des restlichen Wassers erfolgt anschließend im absteigenden Ast der Henle-Schleife, während der aufsteigende Ast undurchlässig für Wasser ist und der Reabsorption von Natriumchlorid dient. Der distale Tubulus mündet mit den Tubuli aus anderen Nephronen in das Sammelrohr. Die zahlreichen Sammelrohre der Niere münden schließlich in das Nierenbecken, von dort gelangt der Harn über den Harnleiter in die Blase (siehe Abbildung 1.2).

## 2. Die Leber

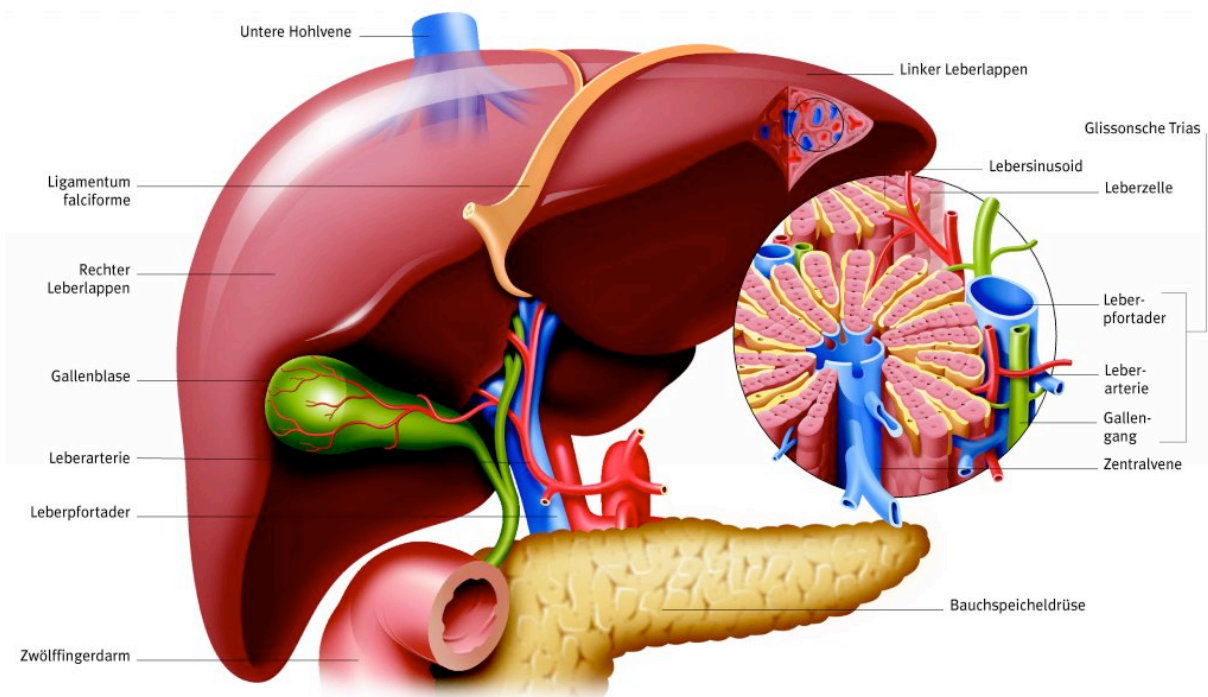
Die Leber ist nach der Haut das zweitgrößte und das zentrale Organ des gesamten Stoffwechsels. Ihre wichtigsten Aufgaben sind die Produktion von lebenswichtigen Proteinen wie z.B. Gerinnungsfaktoren, Speicherung von Nährstoffen wie Glukose und Vitaminen, die Gallenproduktion und der damit verbundene Abbau und die Ausscheidung von Medikamenten und Giftstoffen.

Die Leber ist aus den Leberläppchen aufgebaut, die an der Peripherie von Ästen der *Vena portae* und der *Arteria hepatica* versorgt werden. Deren Blut durchströmt die den Hepatozyten anliegenden Sinusoide und fließt dann durch die Zentralvene ab. In den Winkeln, in denen drei Leberläppchen zusammenstoßen, befindet sich Bindegewebe, das als periportale Felder bezeichnet wird. Jedes dieser Felder enthält drei Gefäße, einen Ast der *Vena hepatica*, einen Ast der *Arteria hepatica* und einen Gallengang. Diese drei Gefäße verlaufen immer gemeinsam und werden als portale oder Glissonsche Trias bezeichnet.

### 2.1 Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge

Im humanen Embryo stellt das am 18. Tag der Schwangerschaft auftauchende hepatische Divertikulum die erste Anlage der Gallengänge und der Leber dar. Es entwickelt sich aus einer Verdickung des endoplasmatischen Epithels an der kopfwärts gelegenen ventralen Wand des Vorderdarms. Ab dem 24. Tag beginnen Leberparenchymzellen in das *Septum*

*transversum* vorzuwachsen und dieses so zu durchdringen, dass es zu vielfältigen Interaktionen zwischen beiden Gewebstypen kommt und letztlich die Bindegewebsstrukturen der Leber ebenso wie deren blutbildende Zellen und die Kupfer-Sternzellen vom *Septum transversum* abstammen. Das hepatische Divertikulum lässt sich von seiner Form her in zwei Teile unterteilen, den *pars hepatica* und den *pars cystica*. Aus dem *pars cystica* entwickeln sich durch Längenwachstum die Anlage der Gallenblase, des Gallenblasenganges und des Hauptgallenganges (*Ductus choledochus*). Bis zur achten Schwangerschaftswoche entwickelt sich das extrahepatische Gallengangssystem durch die Verlängerung des caudalen Teils des hepatischen Divertikulums.



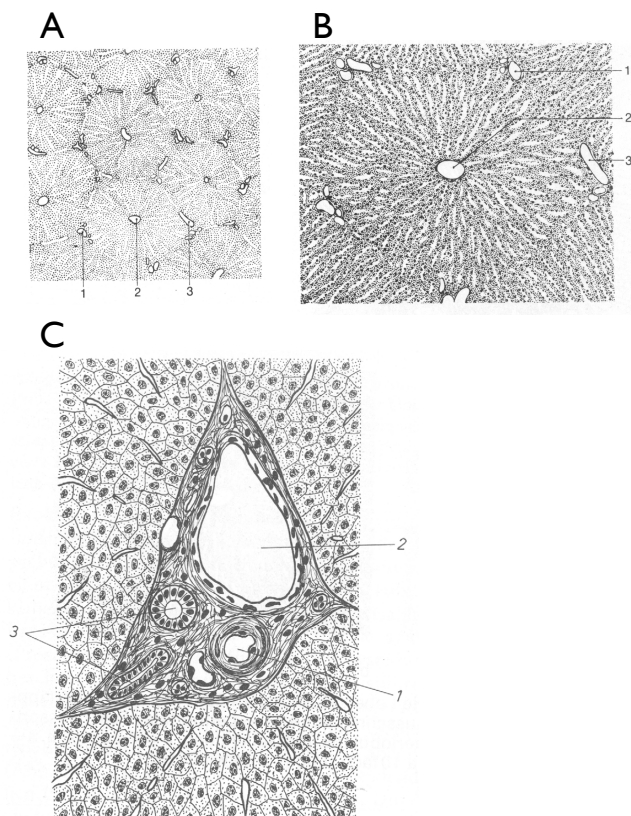
[www.bertelsmann-bkk.de/fileadmin/Redakteure/Bilder/gesundheitslexikon/524970.jpg](http://www.bertelsmann-bkk.de/fileadmin/Redakteure/Bilder/gesundheitslexikon/524970.jpg)

### Abb.1.3: Schematische Darstellung der Leber

Die humane Leber lässt sich in zwei große Leberlappen unterteilen. Der rechte Leberlappen (*Lobus dexter*) liegt unter dem Zwerchfell und ist mit diesem teilweise verwachsen, während der größere linke Leberlappen (*Lobus sinister*) bis in den Oberbauch reicht. An der Unterseite der Leber liegt die Leberpforte (*Porta hepatis*), über die die Pfortader und Leberarterie in die Leber eintreten und die extrahepatischen Gallengänge sie verlassen. Die Leberläppchen bilden die kleinste Baueinheit der Leber und bestehen hauptsächlich aus Hepatozyten. An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen liegen die *Periportalfelder*. In diesen Bindegewebsfeldern liegt jeweils eine *Arteria interlobularis* (ein Ast der Leberarterie), eine *Vena interlobularis* (ein Ast der Pfortader) und ein Gallengang (*Ductus biliferus*).

Das intrahepatische Gallengangssystem entwickelt sich ab der siebten Schwangerschaftswoche aus Hepatozytenvorläuferzellen und ist dabei eng mit der Verzweigung der Portalvene verknüpft. In der achten Schwangerschaftswoche umgibt eine

erst einfache, dann doppelschichtige, zirkuläre Anordnung primitiver Hepatoblasten das Mesenchym der größeren Verzweigungen der Portalvene. Diese Struktur wird als die Duktalplatte bezeichnet und taucht in den folgenden Wochen auch an den kleineren Verzweigungen der Portalvene auf. In der zwölften Schwangerschaftswoche findet eine Umgestaltung der Duktalplatten statt, die auch jetzt wieder an den größeren Ästen der Portalvene beginnt. An kleinen Abschnitten der doppellagigen Duktalplatten kommt es nun zu tubulären Erweiterungen, die im weiteren Verlauf vom Mesenchym der Portalvene umgeben werden. Die Umgestaltung der Duktalplatte beinhaltet sowohl die Entstehung von neuen Epithelien durch Proliferation, als auch den gleichzeitigen Abbau von anderen Gewebestrukturen durch Apoptose. Verbleibende Strukturen der Duktalplatte atrophieren. Für diese Mechanismen ist besonders die Interaktion mit dem, die Venen umgebenden Mesenchym von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung der Duktalplatten scheint die Bildung der intrahepatischen Verästelungen der Leberarterie zu bedingen, da erst anschließend eine vollständige Vaskularisierung stattfindet.



**Abb.1.4: Schematische Darstellung eines Leberläppchens**

(A) Übersicht über mehrere Leberläppchen

1= periportales Feld

2= Zentralvene

3= Schaltvene

(B) Leberläppchen; Ausschnitt aus A

1= periportales Feld

2= Zentralvene

3= Schaltvene

(C) Periportales Feld

1= Ast der Leberarterie

2= Ast der Portalvene

3= Gallengang

(nach Leonardt, 1990)

Die Verästelung der Gallengänge verläuft während der Embryonalentwicklung weiter in Richtung der peripheren Bereiche der Leber, ist aber auch zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht abgeschlossen, sondern erfordert noch weitere vier Wochen.

Die Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge kann somit in drei verschiedene Abschnitte eingeteilt werden: die graduelle Differenzierung von Hepatoblasten zu Gallengangszellen (Cholangiozyten), die Umgestaltung der Struktur der Duktalplatte und die fortschreitende Reifung der umstrukturierten tubulären Strukturen zu Gallengängen. Die normale Entwicklung der Gallengänge hängt dabei von der streng geregelten Interaktion zwischen Epithel- und Mesenchymzellen ab, die vom Hilum der Leber bis in die Peripherie entlang der Verästelungen der Portalvene erfolgt (Roskams und Desment, 2008).

### **3. Polyzystische Nierenerkrankungen**

Bei zystischen Nierenerkrankungen kommt es, je nach Art der Erkrankung, zur Ausbildung von Zysten im Tubulus- oder Sammelrohrsystem der Niere, die durch Proliferation der epithelialen Zellen und durch Sekretion von Flüssigkeit ins Lumen sackartiger Ausstülpungen der einzelligen Epithelschicht entstehen (Wilson, 2002).

Die polyzystischen Nierenerkrankungen stellen eine genetisch und klinisch heterogene Erkrankungsgruppe dar, die durch eine progrediente Zystenbildung in unterschiedlichen Nephronabschnitten, sowie eine variable Lebersymptomatik charakterisiert ist. Sie stellen eine der häufigsten monogenetischen Erbkrankheiten dar, für die bisher keine spezifische Therapie bekannt ist. Heute werden vor allem die erblichen polyzystischen Nierenerkrankungen von den durch frühembryonale Entwicklungsstörungen hervorgerufenen und erworbenen Nierendysplasien unterschieden.

Die Gruppe der hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen umfasst neben der autosomal dominant erblichen (ADPKD = **autosomal dominant polycystic kidney disease**), und der autosomal rezessive erblichen (ARPKD = **autosomal recessive polycystic kidney disease**) polyzystischen Nierenerkrankung, die Nephronophthise und die medulläre zystische Nierenerkrankung. Alle hereditären zystischen Nierenerkrankungen manifestieren sich bereits während der Embryonalentwicklung (Wilson, 2004).

### 3.1 Nephronophthise

Die Nephronophthise (NPHP) ist eine autosomal rezessiv erbliche polyzystische Nierenerkrankung, die sich üblicherweise in den ersten 30 Lebensjahren manifestiert. Die Inzidenz beträgt in den USA 1:900 000, in Kanada hingegen 1:50 000 (Hildebrandt et al., 2009). Charakteristisch sind bilateral auftretende Zysten im corticomedullären Bereich der Niere, die jedoch nicht zu einer Vergrößerung der Niere führen. Trotz ihrer relativ niedrigen Inzidenz ist die Nephronophthise die am häufigsten auftretende hereditäre Nephropathie, die zu einer terminalen Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter führt (Hildebrandt und Otto, 2000). Die ersten Symptome, die zu einer Diagnose der Erkrankung führen sind in den meisten Fällen Polyurie, Polydipsie, Enuresis und Anämie. Sie treten durchschnittlich im Alter von sechs Jahren auf. In 10-20% der Fälle sind neben der Niere auch andere Organe betroffen. Mutationen in den Genen *NPHP1* sowie *NPHP3*, *NPHP4* und *NPHP5* führen in 10-15% der Nephronophthisepatienten zum Auftreten des Senior-Løken-Syndroms (Salomon et al., 2009), bei dem es neben einer terminalen Niereninsuffizienz zu einer Degeneration der Retina kommt (Løken et al., 1961). Mutationen im *NPHP1*-Gen können in seltenen Fällen zum Auftreten des Joubert-Syndroms führen, bei dem es zur Fehlentwicklung des *Vermis cerebelli* sowie anderen Teilen des Kleinhirns kommt (Parisi et al., 2004).

Entsprechend dem Alter, in dem die Erkrankung auftritt und den mutierten Genen, die zur Manifestation der Erkrankung führen, können verschiedene Typen der Nephronophthise unterschieden werden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind neun verschiedene Gene bekannt, deren Mutation zur NPHP führt (Hildebrandt, Attanasio und Otto, 2009).

### 3.2 Medulläre zystische Nierenerkrankungen (MCDK)

Bei den medullären zystischen Nierenerkrankungen handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte tubulo-interstitielle Nephropathie. Die MCDK manifestiert sich durch einen ähnlichen Phänotyp wie die Nephronophthise, mit bilateral verkleinerten Nieren und Nierenzysten im Bereich der Medulla. Im Gegensatz zur Nephronophthise manifestiert sie sich jedoch typischerweise erst im Erwachsenenalter.

2004 konnte das für das Auftreten von MCDK Typ 1 verantwortliche Gen einer chromosomalen Region von weniger als 650 kb auf Chromosom 1 zugeordnet werden.

Die Funktion des *MCDK1*-Gens und dessen Genprodukts bleiben allerdings weiterhin unklar (Wolf et al., 2004).

Für das Auftreten von MCDK Typ 2 scheint eine Mutation im Uromodulin-Gen (*UMOD*) verantwortlich zu sein. Die Funktion von Uromodulin ist noch weitestgehend unklar. Man vermutet, dass es an der Aufrechterhaltung der Integrität der Henle-Schleife beteiligt ist, immunologische Funktionen übernimmt und den Organismus vor Infektionen der Harnwege schützt (Hart et al., 2002).

### **3.3 Glomerulozystische Nierenerkrankung (GCKD)**

Die glomerulozystische Nierenerkrankung stellt eine der seltensten Nephropathien dar. Sie wird autosomal-dominant vererbt, kann aber auch sporadisch auftreten. Sie ist durch zystische Erweiterungen der Glomeruli, was zu einer Erweiterung des Bowmanschen Spalts führt, sowie zystische Erweiterungen der proximalen Tubuli charakterisiert. Die zystischen Veränderungen des Glomerulus ziehen eine renale Dysfunktion nach sich.

Bis jetzt konnten zwei verschiedene Gene identifiziert werden, deren Mutation zum Auftreten der GCKD führen. Eines ist das HNF-1 $\beta$ -Gen (HNF-1 $\beta$ : hepatocyte nuclear factor) (Bingham et al., 2001), bei dem zweiten handelt es sich um *UMOD*, das auch eine Rolle in der medullären zystischen Nierenerkrankung zu spielen scheint (Lens et al. 2005). Bei mehreren Patienten mit GCKD konnte keine Mutation in einem der beiden Gene nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass Mutationen in weiteren Genen für das Auftreten dieser Erkrankung verantwortlich sein müssen.

### **3.3 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung(ADPKD)**

Bei der autosomal dominant erblichen polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) handelt es sich um die am häufigsten auftretende erbliche Nierenerkrankung. Sie tritt mit einer Inzidenz von 1:800 mit vollständiger genetischer Penetranz auf und betrifft somit vier bis sechs Millionen Patienten weltweit.

Charakteristisch für die ADPKD ist eine Manifestierung im frühen Erwachsenenalter, obwohl sich Nierenzysten häufig bereits *in utero* als epitheliale Erweiterung verschiedener Nephronsegmente darstellen.



Makroskopisch ist bei ADPKD Patienten eine beidseitige progressive Vergrößerung der Nieren zu beobachten, die von einer Vielzahl von Zysten unterschiedlicher Größe hervorgerufen wird. Dabei gehen die Zysten aus verschiedenen Segmenten des Nephrons hervor, so dass sich zystische Erweiterungen der Nierentubuli und daraus hervorgehende Zysten sowohl im Cortex als auch in der Medulla der Niere finden.

Klinische Symptome der ADPKD sind Hypertonie, Hämaturie, Polyurie, wiederkehrende Entzündungen des Harnapparats, sowie Nierensteine. Zur terminalen Niereninsuffizienz kommt es jedoch bei nur ca. 50 % der betroffenen Patienten (Wilson und Goilav, 2007).

Die ADPKD kann in zwei verschiedenen Typen auftreten, die sich zwar in ihrer physiologischen und pathologischen Manifestation nicht unterscheiden, doch verschiedene genetische Ursachen haben.

### **3.3.1 ADPKD Typ I**

In ca. 90 % der ADPKD Patienten ist eine Mutation im *PKD1* Gen, das auf dem kurzen Arm von Chromosom 16 lokalisiert ist, für das Auftreten der Erkrankung verantwortlich (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995). Das *PKD1* Gen erstreckt sich über ca. 52 kb genomischer DNA und kodiert eine cDNS mit einer Länge von 14,5 kb, die aus 46 Exonen besteht. Das PKD1 Genprodukt Polycystin-1 besteht somit aus 4302 Aminosäuren und hat eine Größe von ca. 460 kDa. Computerbasierende Strukturvorhersagen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei Polycystin-1 um ein Protein mit einer 2330 Aminosäuren umfassenden stark glykosylierten N-terminalen extrazellulären und einer 225 Aminosäuren umfassenden C-terminalen intrazellulären Domäne handelt, die durch elf Transmembrandomänen von einander getrennt werden. Verschiedene Strukturmodelle im extrazellulären Bereich von Polycystin-1 weisen darauf hin, dass das Protein mit Komponenten der extrazellulären Matrix und anderen Zelloberflächenproteinen interagiert. Hierauf deutet auch die Lokalisation von Polycystin-1 an den Fokalkontakten hin (Hughes et al., 1995; Wilson und Goilav, 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Polycystin-1 an den primären Zilien von Nierenepithelzellen lokalisiert ist, wo es als Mechanosensor fungiert, indem es in Folge von flüssigkeits-induzierten Scherkräften, die auf das Zilium wirken, das assoziierte Protein Polycystin-2 aktiviert und so für den Influx des Second Messengers  $Ca^{2+}$  sorgt (Nauli et al., 2003). Darüber hinaus konnte eine proteolytische Abspaltung des C-Terminus von Polycystin-1

und eine Translokation in den Nukleus nachgewiesen werden, wo er Einfluss auf den Wnt- und den AP-1 Signalweg nimmt (Chauvet et al., 2004).

### **3.3.2 ADPKD Typ II**

Bei 10-15 % der ADPKD-Patienten wird die Erkrankung durch eine Mutation im *PKD2* Gen verursacht. Bei ihnen tritt die Erkrankung in der Regel in einer mildereren Form auf und schreitet langsamer voran als bei Patienten mit einer Mutation im *PKD1* Gen (Hateboer et al., 1999). Das *PKD2* Transkript umfasst mit einer Länge von 5 kb 15 Exone, die für Polycystin-2, ein Membranprotein von 968 Aminosäuren kodieren. Strukturvorhersagen weisen auf sechs Transmembrandomänen und intrazelluläre N- und C-Termini hin (Mochizuki et al., 1996). Polycystin-2 ist ein typischer Vertreter der TRP-(transient receptor potential) Kanäle, die durchlässig für zweiwertige Kationen wie  $Ca^{2+}$  sind (Koulen et al., 2002).

Nauli et al. postulieren nach verschiedenen Zellkulturexperimenten folgenden Zusammenhang zwischen Polycystin-1 und -2: Polycystin-1 nimmt mit seiner großen extrazellulären Domäne die Beugung eines Ziliums durch den Flüssigkeitsstrom in den Nierentubuli wahr und reagiert darauf mit einer Konformationsänderung. Das mechanische Signal wird durch die Aktivierung des assoziierten Polycystin-2  $Ca^{2+}$ -Kanals in ein chemisches Signal umgewandelt. Der veränderte  $Ca^{2+}$ -Spiegel in der Zelle beeinflusst verschiedene Zellfunktionen, wie Genexpression, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose, was zu einer Veränderung in Gewebe- und Organentwicklung führen kann (Nauli et al., 2003).

### **3.4 Autosomal rezessive polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD)**

Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) gehört mit einer Inzidenz von 1:20.000 zu den häufigsten erblichen Nephropathien, die sich bereits im Säuglings- bis frühen Kindesalter manifestieren. Schwer betroffene Kinder (30 bis 50% aller Patienten) sterben kurz nach oder während der Geburt an einer respiratorischen Insuffizienz. Bei Patienten, die die Neonatalperiode überleben, stehen arterielle Hypertonie, chronisches Nierenversagen und portale Hypertension, die aus der mit ARPKD stets einhergehenden kongenitalen Leberfibrose resultiert, klinisch im Vordergrund (Zerres et al., 1998).

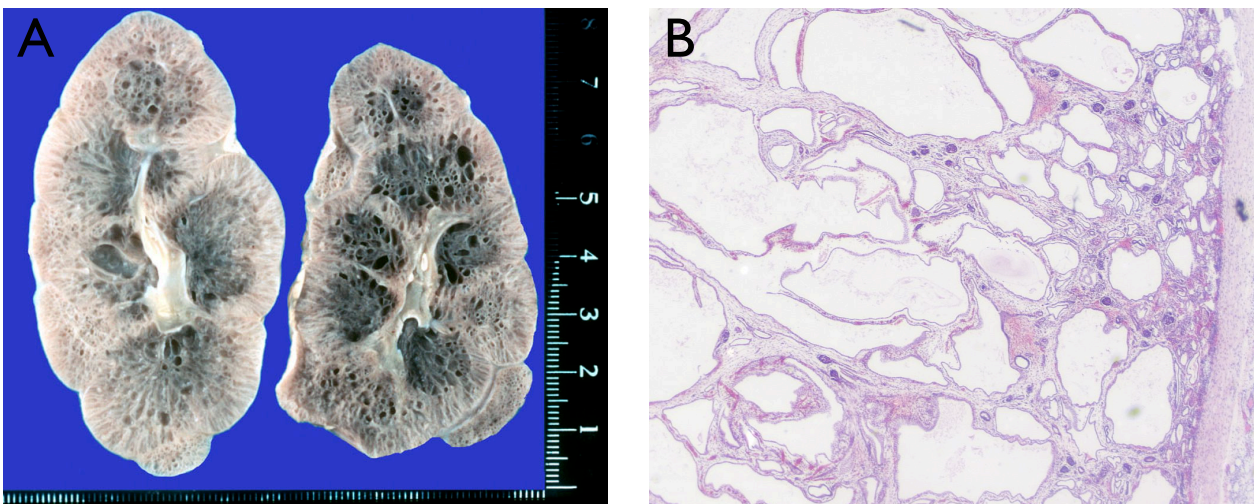
**Tab. 1.1: Übersicht der hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen**

Tabellarische Darstellung der verschiedenen hereditären polyzystischen Nierenerkrankungen, die verantwortlichen Gene und ihre genomische Lage, sowie die von ihnen kodierten Proteine. AD: autosomal-dominant, AR: autosomal-rezessiv (Tab. verändert und aktualisiert nach: Wilson, 2004; Dixon-Salazar et al., 2004; Wilson und Goilav, 2007; Salomon et al., 2008)

Erkrankung	Erbgang	betroffenes Gen	chromosomale Lokalisation	Protein
<b>Polyzystische Nierenerkrankungen</b>				
<b>ARPKD</b>	AD	<i>PKD1</i>	16p13.3	Polycystin-1
		<i>PKD2</i>	4q21	Polycystin-2
<b>ARPKD</b>	AR	<i>PKHD1</i>	6p21-23	Polyduktin/ Fibrocystin
<b>Nephronophthise</b>				
	AR	<i>NPHP1</i>	2q12-13	Nephrocystin-1
		<i>NPHP2</i>	9q22-31	Inversin
		<i>NPHP3</i>	3q21-22	Nephrocystin-3
		<i>NPHP4</i>	1p36	Nephrocystin-4
		<i>NPHP5</i>	3q21.1	Nephrocystin-5
		<i>NPHP6</i>	12q21.32	Nephrocystin-6
		<i>NPHP7</i>	16q	Glis2
		<i>NPHP8</i>	16q	RPGRIP1L
		<i>NPHP9</i>	17q11	Nek8
		<i>AHI1</i>	6q23.3	Jouberin
<b>medulläre zystische Nierenerkrankungen</b>				
	AD	<i>MCKD1</i>	1q21	?
		<i>MCKD2 (UMOD)</i>	16q12	Uromodulin
<b>glomerozystische Nierenerkrankung</b>				
	AD	<i>HNF-1<math>\beta</math></i> <i>UMOD</i>	17q12 16q12	HNF-1 $\beta$ Uromodulin

Bei der ARPKD treten die krankhaften Veränderungen der Nieren immer bilateral und symmetrisch auf, dabei kommt es zu zystischen Ektasien der Sammelrohre, die zunächst nur einen Durchmesser von ca. 2 mm haben, sich aber im Laufe der weiteren Überlebenszeit bis zu einem Durchmesser von ca. 1 cm vergrößern (Zerres, 1992).

Durch die starke Vergrößerung der Nieren kommt es zu einer Anhebung des Zwerchfells, was zur Folge hat, dass sich die Lunge des Fötus nicht regelrecht entfalten kann. Dies führt bei 30-50% der Neugeborenen bereits perinatal zu einer tödlichen respiratorischen Insuffizienz (Lens et al., 1997; Zerres et al., 1998). In einigen Fällen kann es durch eine verminderte renale Ausscheidung des Feten intrauterin zur Ausbildung eines Fruchtwassermangels kommen, wodurch phänotypisch das Bild einer sogenannten Potter-Sequenz entsteht, die erstmals 1964 durch V. Osathanondh und E.L. Potter beschrieben wurde. Die Potter-Sequenz wird auch als Oligohydramnion-Sequenz bezeichnet und umfasst die durch den Fruchtwassermangel hervorgerufenen klinischen Auswirkungen (typische Gesichtsdysmorphien, Hypoplasie der Lunge, Fehlbildungen im Urogenitaltrakt sowie die Ausbildung von Klumpfüßen). Histologisch ist bereits kurz nach der Geburt eine Leberveränderung nachweisbar, die die Leberfunktion jedoch nicht beeinträchtigt.



**Abb.1.5: krankhafte Veränderungen der Niere bei ARPKD-Patienten**

(A) Makroskopische Darstellung einer fetalen ARPKD-Niere (Schwangerschaftswoche 34). Die Niere erscheint schwammartig und stark vergrößert, einzelne Nephronabschnitte erweitert. Einzelne Zysten sind erkennbar. (B) Mikroskopisches Schnittpräparat einer ARPKD-Niere mit den typischen zystischen Erweiterungen von proximalen Tubuli und Sammelrohren (H&E-Färbung).

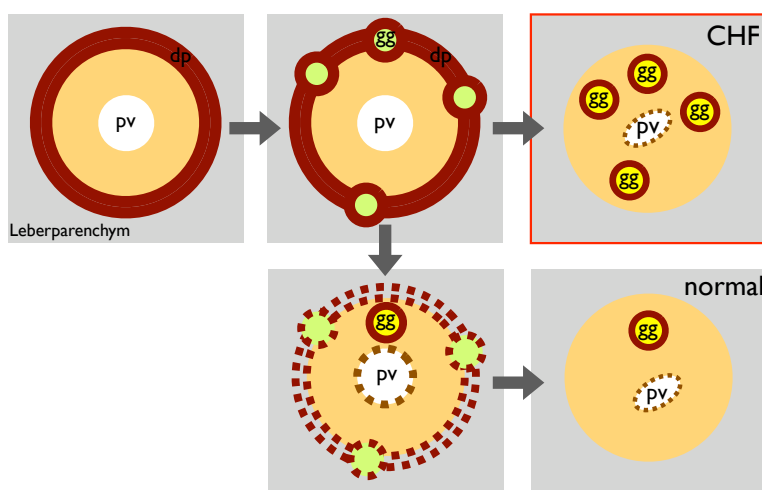
Bei ca. 50 % der betroffenen Patienten kommt es zu einem milderem Verlauf der Erkrankung, so dass sie die erste Lebensdekade überleben. Die fortschreitende

Niereninsuffizienz kann in einigen dieser Fälle durch Dialyse und Nierentransplantation kompensiert werden (Roy et al., 1996). Das klinische Bild wird in diesen Fällen neben der Niereninsuffizienz durch Pfortaderhochdruck, hervorgerufen durch die kongenitale Leberfibrose, sowie bakterielle Infektionen der Nieren und der Harnwege bestimmt (Zerres et al., 1998).

### 3.4.1 Kongenitale hepatische Fibrose (CHF)

Die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung manifestiert sich im Gegensatz zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung in der Leber mit einem Krankheitsbild, das nur sehr selten als separate Erkrankung auftritt und als kongenitale hepatische Fibrose (CHF) bezeichnet wird (O. Akhan et al. 2007).

Die Leber von ARPKD-Patienten stellt sich makroskopisch in den meisten Fällen völlig unauffällig dar. In seltenen Fällen erscheint sie vergrößert oder verfestigt. Histologisch fällt eine massiv erhöhte Anzahl von Gallengängen auf, die auf eine fehlerhafte Umorganisation der Duktalplatte während der Entwicklung der kleinen interlobulären hepatischen Gallengänge zurückzuführen ist (MacSween, 1986). Daneben kommt es zu einer fibrotischen Vergrößerung der Periportalfelder und einer Dysplasie der proliferierenden Gallengänge. Zu den klinischen Manifestationen der CHF gehören Pfortaderhochdruck und Cholangitis. Die Symptome sind aber häufig diffus, was eine Diagnose der CHF erschwert (O. Akhan et al. 2007).



**Abb. 1.6: Fehlentwicklung der intrahepatischen Gallengänge**

Während der Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge kommt es zu einer Umorganisation der Duktalplatte. Läuft dies, wie im Falle der CHF nicht regelrecht ab, bleiben embryonale Gallengangstrukturen innerhalb des Leberläppchens zurück. (pv Portalvene, dp Duktalplatte, gg Gallengang, CHF kongenitale Leberfibrose)

### 3.4.2 Das ARPKD-Gen *PKHD1*

Durch genetische Kopplungsanalysen konnte gezeigt werden, dass das für das Auftreten der ARPKD verantwortliche Gen auf Chromosom 6p21-cen lokalisiert ist (Guay-Woodford et al., 1995). 2002 gelang es zwei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander das humane ARPKD-Gen, das als **P**olycystic **K**idney and **H**epatic **D**isease **1** (*PKHD1*) bezeichnet wurde, zu identifizieren (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002). Onuchic et al. gelang die Identifikation des krankheitsverursachenden Gens durch „positional cloning“, während Ward et al. das *PKHD1*-Gen als Ortholog des humanen ARPKD-Gens in der Pck-Ratte, einem Tiermodell für polyzystische Nierenerkrankungen, nachweisen konnten.

Das humane *PKHD1*-Gen umspannt ca. 570 kb genomischer DNS und umfasst 86 Exone, die in verschiedenen Varianten zusammengespleißt werden. Das höchste Expressionsniveau konnte mittels Northern-Blot-Analysen in humaner fetaler und humaner adulter Niere, sowie schwächer in der Leber ermittelt werden (Onuchic et al., 2002; Ward et al., 2002).

Nachdem 2002 das murine Ortholog des humanen *PKHD1*-Gens identifiziert wurde, konnte außerdem eine schwache Expression in Herz, Magen, Dünndarm, Muskel, Uterus und Plazenta nachgewiesen werden. Die Detektion von *pkhd1* RNS ist während der Embryogenese der Maus ab Tag 12,5 in der sich entwickelnden Niere möglich. In der postnatalen Niere ist eine starke Expression in den Sammelrohren und eine schwächere in proximalen und distalen Tubuli vorhanden. In den Glomeruli konnte keine Expression von *pkhd1* nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch in den sich entwickelnden intrahepatischen Gallengängen, den großen Gefäßen, im embryonalen Lungenparenchym, in den Pankreasgängen, der Trachea und in der Skelettmuskulatur eine Expression von *pkhd1* erfolgt (Nagasawa et al., 2002).

### 3.4.3 Mutationsanalyse des *PKHD1*-Gens

Die Identifikation von *PKHD1*-Genmutationen schafft eine wichtige Grundlage sowohl für die Analyse der molekularen Ursachen der ARPKD als auch für die Diagnose und genetische Beratung von Familien. Bis heute sind 525 verschiedene Mutationen im *PKHD1*-Gen identifiziert worden. Die Mutationen sind über den gesamten Genbereich verteilt, der für die extrazelluläre Domäne von Polyduktin kodiert. Nur die sinnverändernde „Missense-Mutation“ T36M scheint mit einer höheren Frequenz aufzutreten. Sie konnte in

15 bis 20 % nicht verwandter ARPKD-Patienten verschiedener ethnischer Herkunft nachgewiesen werden (Bergmann et al., 2005). Die meisten der identifizierten Mutationen führt zu einem Aminosäureaustausch, während es in 45% der Fälle zu Abbruchmutationen kommt (Bergmann et al., 2004).

Eine Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp bei ARPKD-Patienten besteht nur für die Art der Mutation, nicht jedoch für die Genregion, in der die Mutation liegt. Zwei trunkierende Mutationen führen bei allen untersuchten Patienten immer zu einem schweren, perinatalen oder neonatalen Phänotyp. Im Gegensatz dazu kann eine Abbruch- und eine Aminosäureaustauschmutation sowohl zu einem schweren, als auch zu einem mildereren Phänotyp führen. Auch das Vorhandensein von Spleißmutationen führt in allen Fällen zu einem schwereren Phänotyp als Aminosäureaustauschmutationen (Bergmann et al., 2005; Sharp et al., 2005).

#### 3.4.4 Polyduktin/Fibrocystin

Der längste offene Leserahmen von *PKHD1* umfasst 12,6 kb, beinhaltet 67 Exons und kodiert für ein putatives Protein von 4074 Aminosäuren und einer Größe von 447 kDa (Ward et al., 2002). Topologische Untersuchungen mit SMART (**s**imple **m**odulate **a**rchitecture **r**esearch **t**ool) lassen auf ein TypI-Transmembranprotein mit einer großen (3858 AS) N-terminalen extrazellulären und einer kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne schließen, das als Polyductin (Onuchic et al., 2002) oder Fibrocystin (Ward et al., 2002) bezeichnet wird.

Darüber hinaus konnten in der extrazellulären Domäne sechs Bereiche identifiziert werden, die Homologien zu IPT-(immunoglobuline like fold shared by **p**lexin **t**ranscription factors)-Domänen aufweisen. Diese Motive sind ähnlich der Immunglobuline gefaltet und z.B. in Zelloberflächenrezeptoren der Sema-Familie wie dem „Hepatocyte Growth-Factor Receptor“ und Plexinen, sowie in Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie zu finden. Die Parallele zum HGF-Rezeptor lässt die Vermutung zu, dass Polyduktin ebenfalls die Rolle eines Rezeptors übernehmen könnte, allerdings scheint es sich bei Polyduktin um ein neuartiges Protein zu handeln, da andere Charakteristika von Zelloberflächenrezeptoren nicht nachweisbar sind (Nagasawa et al., 2002).

Neben den IPT-Domänen ergab die SMART-Analyse noch Hinweise auf neun bis zehn PbH1-(**p**arallel **b**eta **H**elix **1**)-Domänen, die sich zwischen der singulären

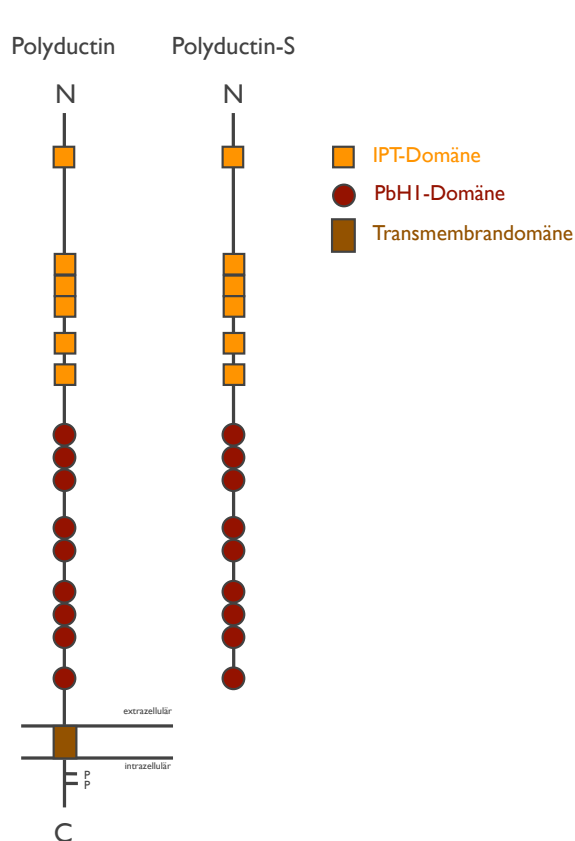
Transmembrandomäne und den IPT-Domänen befinden. Diese Domänen wurden bisher hauptsächlich in bakteriellen Polysaccharidasen gefunden, wo sie sowohl für die Ligandenbindung als auch für die katalytische Aktivität des Enzyms verantwortlich sind. Die Tatsache, dass diese Domänen auch in der N-terminalen Domäne von Polyduktin vorliegen, lassen eine katalytische Funktion des Proteins vermuten.

Motivanalysen mit dem Programm PROSITE zufolge ist die extrazelluläre Domäne von Polyduktin wie bei vielen Zelloberflächenproteinen stark glykosyliert. In der zytoplasmatischen Domäne hingegen finden sich zwei cAMP/cGMP-, aber keine Tyrosin-Phosphorylierungstellen (Onuchic et al., 2002).

Durch variable Spleißarrangements kommt es zu strukturellen Unterschieden in den translatierten Polypeptiden. Die auftretenden Genprodukte bilden vermutlich zwei Klassen: eine Gruppe, deren Produkte die Transmembrandomäne besitzen und somit vermutlich mit der Plasmamembran assoziiert sind. Zu dieser Klasse gehört das Gesamtprotein, das durch den längsten offenen Leserahmen kodiert wird, sowie Polypeptide, denen einige der mittleren Domänen fehlen. Die zweite Klasse besteht aus Genprodukten, denen die Transmembrandomäne fehlt und die somit sekretiert werden könnten (Onuchic et al., 2002).

Mehrere Studien konnten zeigen, dass Polyduktin vor allem in den primären apikalen Zilien und den dazugehörenden Basalkörpern des Nierenepithels, sowie den Cholangiocyten lokalisiert ist (Ward et al, 2003; Zhang et al., 2004; Menezes et al., 2004; Wang et al., 2004; Masyuk et al., 2003). Die Lokalisation an den Basalkörpern von primären Zilien konnte auch für andere Zystenproteine wie Polycystin-1 und -2, Polaris und Cystin nachgewiesen werden. Diese Proteine scheinen in einem Komplex vorzuliegen und sind für die regelrechte Ausbildung und Funktion der Zilien unerlässlich (Yoder et al., 2002). 2006 konnte gezeigt werden, dass auch Polyduktin in diesem Komplex vorliegt und mit Polycystin-2 interagiert. Die Interaktion zwischen beiden Proteinen erfolgt allerdings nicht direkt, sondern wird durch Kinesin-2 vermittelt (Wu et al., 2006). Dabei scheint Polyduktin die Kalziumkanal-Aktivität von Polycystin-2 zu regulieren (Kim et al., 2008).





**Abb.1.7: Struktur von Polyduktin und Polyduktin-S**

Strukturvorhersagen zeigten, dass es sich bei Polyduktin um ein TypI-Transmembranprotein handelt. Die große extrazellulär N-terminale Domäne umfasst neben sechs IPT-Domänen, neun eventuell zehn PbH1-Domänen. Die intrazelluläre C-terminale Domäne beinhaltet zwei potentielle Phosphorylierungsstellen. Neben der membran-assoziierten Variante von Polyduktin, scheint noch eine durch alternatives Spleißen entstandene sezernierte Variante des Proteins zu existieren, der die Transmembrandomäne fehlt (Polyduktin-S).

Als ein weiterer potentieller Interaktionspartner konnte 2005 CAML (calcium modulating cyclophilin ligand) identifiziert werden. Auch dieses Protein spielt eine Rolle in der Regulation des zytosolischen Kalziumreservoirs (Nagano et al., 2005). Allerdings konnte die Interaktion von Polyduktin und CAML bis jetzt nur *in vitro* gezeigt werden.

Die Rolle von Polyduktin als integrales Membranprotein könnte in der Funktion eines Rezeptors, eines Liganden oder auch beidem liegen. Diese Hypothese wird von jüngsten Ergebnissen gestützt, die beschreiben, dass Polyduktin einem komplexen Prozess ausgesetzt ist, bei dem es zum Abspalten der Ektodomäne und einem zeitgleichen Freisetzen des intrazellulären Anteils kommt (Kaimori et al., 2007). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen kalziumabhängigen Prozess handelt (Hiesber et al., 2006).

Um die Funktion von Polyduktin zu verstehen, ist es deshalb von großer Wichtigkeit weitere Informationen über Interaktionspartner zu erlangen und diese *in vitro* zu bestätigen. Interagierende Proteine könnten Aufschluss über Signalwege geben, in denen Polyduktin involviert ist und die für die deregulierte Proliferation der Nierentubuli und die Fehlbildung der embryonalen Duktalplatte während der Leberentwicklung sorgen.

### 3.5 Tiermodelle

Es existieren verschiedene Tiermodelle für ARPKD, die zum Verständnis der Erkrankung und der Funktion von Polyduktin beigetragen haben. Einige Tiermodelle sind durch eine spontane Mutation entstanden und zeigen einen Phänotyp, der in Bezug auf Morphologie, Ort der Zystenentstehung, extrarenale Manifestation und Progression der ARPKD entsprechen. Hierzu gehört die PCK-Ratte, die eine spontane Spleißmutation im *PKHD1*-orthologen Gen trägt. Diese Ratte zeigt polyzystische Veränderungen in der Niere, erweiterte Gallengänge, eine kongenitale Fibrose in der Leber und Cholangiozyten mit kurzen missgebildeten Zilien, in denen Polyduktin nicht nachweisbar ist (Sanzen et al., 2001; Masyuk et al., 2003). Auch die *cpk*-Maus (**c**ongenital **p**olycystic **k**idney) stellt ein durch spontane Mutation entstandenes Modell für polyzystische Nierenerkrankungen dar und weist den für die ARPKD charakteristischen Phänotyp in Niere und Leber auf. Die krankheitsverursachende Mutation liegt im *cpk*-Gen, das für Cystin codiert. Cystin ist ebenfalls in den primären Zilien lokalisiert und scheint essentiell für die Ausbildung von polarisierten Epithelien zu sein, wie in Zellkulturexperimenten gezeigt werden konnte (Hou et al., 2002).

Nachdem es Nagasawa et al. 2002 gelang das orthologe *PKHD1*-Gen im murinen Genom zu identifizieren, besteht nun auch die Möglichkeit, gezielt Mausmodelle zu erstellen, die Mutationen im *pkhd1*-Gen tragen. Die *pkhd1*<sup>ex40</sup>-Maus stellt das erste Mausmodell dieser Art da. Bei ihr wurde Exon 40 des murinen *pkhd1*-Gens, das Exon 41 des humanen Gens entspricht, durch die Insertion einer Neomycin-Resistenzkassette deletiert. Dieses Exon konnte in Expressionsanalysen schon früh während der Embryonalentwicklung, aber auch in adulten Geweben in verschiedenen alternativen Transkripten nachgewiesen werden (Nagasawa et al., 2002), weshalb es für die Herstellung einer *pkhd1*-defizienten Maus ausgewählt wurde. Eine Untersuchung auf Transkriptebene zeigte jedoch, dass die Zerstörung des Locus eine Genexpression weder komplett verhinderte, noch die Bildung eines massiv verkürzten Genprodukts zur Folge hatte, obwohl Exon 40 erfolgreich deletiert wurde. Die Mäuse zeigen keinen Nierenphänotyp, allerdings kommt es in der Leber zu massiven Fehlbildungen der Gallengänge, die der kongenitalen hepatischen Fibrose in ARPKD-Patienten entspricht (Moser et al., 2005).

Darüber hinaus gibt es verschiedene Mausmodelle, in denen durch Deletion unterschiedlicher Exone versucht wurde, die Expression von Polyduktin vollständig auszuschalten. Alle Mausmodelle zeigen einen ausgeprägten Leberphänotyp, während

der Nierenphänotyp variabel ist. Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass bis heute keines der *pkhd1*-defizienten Mausmodelle den Phänotyp der humanen ARPKD vollständig widerspiegelt.

#### 4. Das Protoonkogen c-Myc

Die Myc-Protoonkogene (myelocytomatosis viral oncogene homologs) gehören zu den pleiotropen Transkriptionsfaktoren. Sie weisen die charakteristischen Helix-Schleife-Helix (bHLH)- und „Leucin-Zipper“-Domänen auf und koordinieren verschiedene intra- und extrazelluläre Transkriptionsprogramme, die für normales und tumorhaftes Zellwachstum verantwortlich sind. C-Myc ist in den meisten humanen Tumoren dereguliert, jedoch findet sich in den seltensten Fällen eine Mutation innerhalb des c-Myc-Gens, die zu einer erhöhten Expression führt. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Expression von c-Myc ab Überschreitung eines bestimmten Schwellenwertes zu Apoptose führt. Häufig kommt es zu Veränderungen von onkogenen Signalen, die der Regulation der c-Myc-Expression vorgeschaltet sind (Evan et al., 2009).

Die Wirkung von c-Myc in der Zelle wird wie bereits erwähnt durch das eigene Expressionsniveau, aber auch durch die Interaktion mit anderen bHLH-Proteinen bestimmt, die die Funktion von c-Myc als Transkriptionsfaktor entweder verstärken oder inhibieren.

1991 wurde Max (**MYC** associated factor **X**) als Interaktionspartner von c-Myc identifiziert (Blackwood & Eisenmann, 1991). Myc-Max-Dimere binden an die E-Box verschiedener Zielgene, von denen die meisten einen positiven Effekt auf die Proliferation der Zelle haben (Weinberg, 2007). Eine inhibierende Wirkung hat c-Myc als Heterodimer in Kombination mit MIZ1 (**MYC**-interacting **Z**inc finger protein **1**) auf Gene, die durch Initiator-Sequenzen reguliert werden (Pelengaris et al., 2002). Die Identifikation von Myc-Zielgenen stellt sich als schwierig dar. Einige Gene wurden anhand ihrer ektopischen Expression, andere anhand ihres Myc-Bindungsmotivs identifiziert. Allerdings ist nicht klar, ob dies tatsächlich der physiologischen Situation in der Zelle entspricht. Hinzu kommt, dass die Bindung von Myc an die Promotorregion verschiedener Gene stark vom jeweiligen Zelltyp abhängig ist (Capellen et al., 2007).

#### 4.1 *c-Myc* und polyzystische Nierenerkrankungen

In der *cpk*-Maus konnte 1992 gezeigt werden, dass es in den zystischen Nieren der Tiere zu einer veränderten Expression von *c-Myc* kommt. Sowohl in den Nephronanlagen und Nierentubuli von Wildtyp, als auch von *cpk*-Mäusen konnte in der späten pränatalen, als auch in der frühen neonatalen Niere eine erhöhtes *c-Myc*-RNS-Level nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den *cpk*-Mäusen, verringerte sich dieser *c-Myc*-RNS-Level in den Wildtyptieren nach der Geburt (Harding et al, 1992). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass es in den Zystenepithelien von polyzystischen Nieren zu einer Fehlregulation der *c-Myc*-Expression kommt, die von den jeweils beteiligten mutierten Proteinen ausgelöst wird.

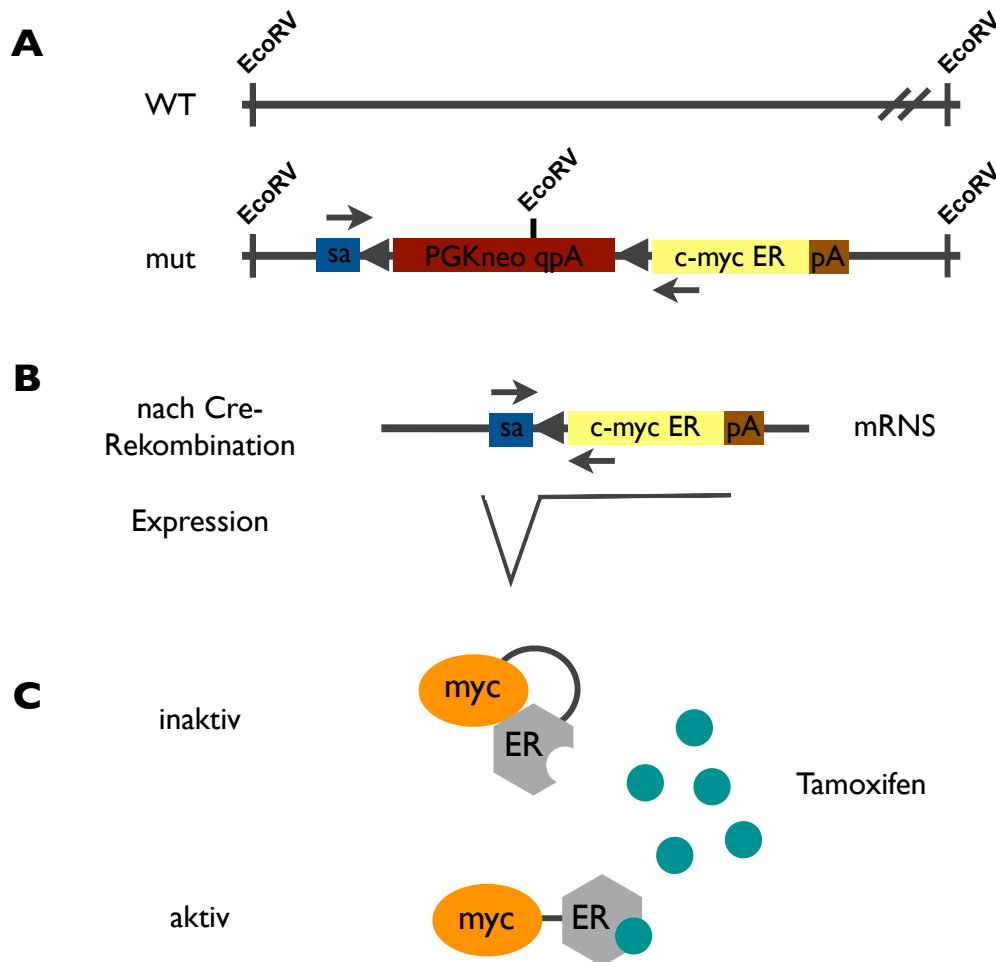
#### 4.2 Das *c-Myc*-ER<sup>T</sup>-Fusionsprotein

Um den Einfluss von *c-Myc* auf die Zelle zu untersuchen, entwickelten Littlewood et al. 1995 ein *c-Myc*-ER<sup>T</sup>-Fusionskonstrukt. Dieses führt zur Expression eines Fusionsproteins aus der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) und dem *c-Myc*-Protein. Durch Fusion von *c-Myc* an die Bindedomäne des ER kann die Wirkung von einer *c-Myc* Überexpression in einem festgelegten temporären Fenster erfolgen, da es erst zu einer Aktivierung des Fusionsproteins und damit zur Translokation in den Kern kommt, wenn ein Ligand an die ER-Ligandenbindedomäne bindet. Um auszuschließen, dass es zu einer Aktivierung des Fusionsproteins durch die Bindung von endogenem Östrogen oder anderen Steroidhormonen kommt, wurde eine Mutation in die Östrogenbindedomäne eingefügt. Durch den Austausch von Glycin zu Arginin an Position 525, kann es nur zu einer Aktivierung des Fusionsproteins kommen, wenn Tamoxifen gebunden wird.

#### 4.3 Die *Rosa $\Delta$ neo*-Maus

Das *c-Myc*-ER<sup>T</sup>-Fusionskonstrukt wurde 2004 genutzt, um eine transgene Mauslinie zu generieren, in der es möglich war, die Folgen einer Überexpression von *c-Myc* zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde das *c-Myc*-ER<sup>T</sup>-Fusionskonstrukt durch homologe Rekombination in den ROSA26-Genlocus eingebracht, was für eine ubiquitäre Expression des Fusionsproteins sorgt (Jäger et al., 2004). Im ROSA26-Lokus selbst wurden drei Transkripte gefunden. Zwei von ihnen ergeben in

Leserichtung keinen offenen Leserahmen, der für ein funktionelles Protein kodiert, während ein Transkript entgegen der Leserichtung für ein bisher unbekanntes Protein kodiert. Die Expression dieses Gens stört aber in keiner Weise die Expression des inserierten Transgens (Zambrowicz et al., 1997).



**Abb. 1.8 Schematische Darstellung des transgenen ROSA26-Lokus und der Aktivierung des c-Myc-Proteins durch Tamoxifen**

(A) Darstellung des WT- und des mutierten ROSA26-Lokus. (B) Durch Cre-Rekombination wird die gefloخته PGKneo-Selektionskassette aus dem mutierten ROSA26-Lokus entfernt, so dass es zur Transkription der MycER-RNS kommen kann. (C) Darstellung des MycER-Fusionsproteins, das ohne die Bindung von Tamoxifen inaktiv im Zytoplasma vorliegt. Durch Bindung von Tamoxifen wird es aktiviert und transloziert in den Zellkern. Blauer Kasten: Spleißakzeptor-Sequenz, graue Dreiecke: LoxP-Sequenzen, roter Kasten: PGKneo-Selektionskassette und vierfaches Polyadenylierungssignal, gelber Kasten: c-MycER-cDNS, brauner Kasten: Polyadenylierungssignal; Pfeile: Oligonukleotide, die zur Genotypisierung der ROSA $\Delta$ neo-Mäuse genutzt werden können. Abbildung modifiziert nach Jäger et al. 2003

## 5. Zielsetzung

Trotz seiner kausalen Involvierung in ARPKD ist die biologische Funktion von Polyduktin bislang unbekannt. Eindeutige Homologien zu bekannten Proteinen bestehen nicht, so dass es bislang keine konkrete Vorstellung darüber gibt, wie Mutationen im *PKHD1*-Gen zur Entstehung der Nieren- und Leberpathologie führen. Im intrazellulären Bereich des Proteins sind potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden, die eine Rolle bei der intrazellulären Weiterleitung von Signalen spielen könnten. Dem C-Terminus kommt zudem eine besondere Bedeutung zu, da er durch proteolytische Spaltung ins Zytoplasma freigesetzt wird und in den Nukleus transloziert (Kaimori et al., 2007; Hiesberger et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass der Polyduktin C-Terminus in Signaltransduktionswege involviert ist. Um Aufschluss über diese Signalwege zu erlangen, wäre es von großer Wichtigkeit potentielle Interaktionspartner von Polyduktin zu identifizieren. Bislang konnte nur ein putativer Interaktionspartner von Polyduktin *in vitro* identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um CAML, ein Protein, dass an der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt ist (Nagano et al., 2005).

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die gesamte murine *pkhd1*-cDNS zu isolieren und in ein eukaryotisches Expressionsplasmid zu klonieren, damit sie für weitere Experimente, wie der Suche nach Interaktionspartnern zur Verfügung steht.

Um potentielle Interaktionspartner von Polyduktin zu identifizieren, sollte die TAP-Aufreinigungsstrategie genutzt werden. Im Gegensatz zu einem Hefe-Zwei-Hybrid-Ansatz erlaubt sie die Expression und Isolierung von Proteinkomplexen unter nahezu nativen Bedingungen. Die Identifikation der potentiellen Interaktionspartner sollte durch 2D-Gelelektrophorese und anschließende massenspektrometrische Analysen erfolgen. Für die TAP-Strategie wurde der murine Polyduktin C-Terminus eingesetzt, da er aufgrund seiner proteolytischen Abspaltung und der potentiellen Phosphorylierungsstellen vermutlich in Signaltransduktionswege involviert ist. Die Interaktion mit anderen Proteinen sollte durch weitere Analysen wie Koimmunopräzipitationen und Zellkulturexperimente verifiziert werden.

1992 konnte gezeigt werden, dass es in der polyzystischen Niere der C57BL/6J-cpk-Maus zu einer erhöhten Transkriptionsrate des Protoonkogens *c-myc* kommt (Harding et al., 1992). Dies weist darauf hin, dass der Phänotyp der Mäuse auf eine gestörte Regulation von *c-myc* zurückzuführen ist (Harding et al., 1992). Um den Zusammenhang zwischen C-

Myc und Polyduktin näher zu analysieren, wurden durch Verpaarung der bereits beschriebenen Mauslinien Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc (Jäger et al., 2004) und *Pkhd1*ex40 del/del (Moser et al., 2005) doppeltransgene Mäuse hergestellt. Durch verschiedene immunhistochemische Analysen sollte der Leberphänotyp der Mäuse analysiert werden. Darüber hinaus sollte die Interaktion von Polyduktin und C-Myc weiter analysiert werden. Durch Zellkultur- und Immunfluoreszenzversuche sollte gezeigt werden, ob und wo es zu einer physischen Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommt.

## II. Material und Methoden

Der Umgang mit gentechnisch veränderten Bakterien erfolgte gemäß den Grundregeln des sauberen mikrobiologischen Arbeitens.

Gentechnisch veränderte Organismen wurden nach ihrer Erzeugung erfasst und durch Autoklavieren (Bakterien- und Säugerzellen) oder Verbrennung (Mäuse) vernichtet, wenn sie nicht mehr benötigt wurden.

Molekular- und zellbiologische Arbeiten wurden, soweit nicht anders vermerkt, entsprechend gängiger Protokollsammlungen (Sambrook et al, 1989) durchgeführt.

### 1. Chemikalien

Alle Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p. A.

2-Propanol	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Aceton	Fluka, Neu-Ulm
Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung 30 %	Roth, Karlsruhe
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, München
Ampholyte pH 3-10	Fluka, Neu-Ulm
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Aquatex	Merck, Darmstadt
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Calmodulin-Säulenmaterial	Stratagene, La Jolla (USA)
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete mini (Protease-Inhibitoren-Cocktail)	Roche, Penzberg
Coomassie "SimplyBlue"	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxy-Nucleotidtriphosphat (dNTPs)	GeneCraft, Köln
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München



---

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München
Eosin	Merck, Darmstadt
Erdnussöl	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
Fugene Transfektionsreagenz	Roche, Penzberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Glutathione Sepharose 4B	Amersham Bioscience, Freiburg
Glycerol	VWR, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hämatoxylin	Fluka, Neu-Ulm
Hepes	Serva, Heidelberg
IgG-Agarose	Sigma-Aldrich, München
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, München
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ligasepuffer (10x)	New England Biolabs, Schwalbach
Lysotracker red	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Magnesiumacetat 1M	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
NP-40 (Igepal)	Sigma-Aldrich, München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad Life Science, München
N,N-Dimethylformamide	Sigma-Aldrich, München
Natriumacetat (NaOAc)	Applied Biosystems, Warrington (UK)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt

---

Natronlauge 1 N und 5 N	Merck, Darmstadt
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Novex BisTris-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Novex BisTris-ZOOM-Gele	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS-Running-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE Sample Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Oligodesoxynukleotide	Sigma-Aldrich, München
Oligo(dT)12-18 Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
Paraplast plus	McCormick Scientific, St. Louis (USA)
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, München
PCR-Puffer (10x) und MgCl <sub>2</sub> -Lösung (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Proteinladepuffer (Roti-Load)	Roth, Karlsruhe
Puffer für Restriktionsendonucleasen	New England Biolabs, Schwalbach
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Salzsäure 1 N und 4 N	Fluka, Neu-Ulm
Stickstoff flüssig	Linde, Pullach
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, München
Tissue Tek	Sakura, Heppenheim
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Trypton	Merck, Darmstadt
VectaShield Eindeckmedium	Vector, Burlingame (USA)
Xylol	Merck, Darmstadt
ZOOM-Strips pH 3-10	Invitrogen, Karlsruhe
ZOOM 2D Protein Solubilizer	Invitrogen, Karlsruhe

## 2. Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Mikrotiterplatten	Brand, Wertheim
Blaukappenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Labortechnik, Solingen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Köningshofen
Einbettkassetten	NeoLab, Woburn (UK)
Einmalspritzen 5 ml	Omnifix B. Braun, Sheffield (UK)
Einmalartikel für Zellkultur	Greiner, Solingen
Entsalzungssäulen PD-10 Desalting Columns	GE-Healthcare, San Francisco
Kapillarspalt-Objektträger	Dako, Hamburg
Leersäulen, Poly Prep	BioRad, München
Mikrotom-Klingen A35	Feather, Osaka (JP)
Objektträger Histobond	Marienfeld, Lauda-Köningshofen
Objektträger für Zellmikroskopie	
1 $\mu$ -slide 8 well ibiTreat	ibidi GmbH, Martinsried
Paraffinkassetten Tissue Tek uni cassette	Sakura, Heppenheim
Parafilm M	Pechiney plastic packaging, Chicago
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße 200 $\mu$ l	Axygen Scientific, Union City (USA)
Petrischalen 10 cm und 15 cm	Greiner Labortechnik, Solingen
Pipettenspitzen, 10 $\mu$ l	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen, 100 und 1000 $\mu$ l	Greiner Labortechnik, Solingen
Pipettenspitzen, Filter tip 10, 100, 1000 $\mu$ l	Axygen Scientific, Union City (USA)
PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme BioMax Light Film	Kodak, Rochester (USA)
Skalpelle, Einweg	Feather, Osaka (JP)
Sterilfilter 0,2 $\mu$ m	Nalgene, Neerijse (BE)
Whatman 3 mm Filterpaper	Schleicher und Schuell, Dassel
ZOOM Equilibration Trays	Invitrogen, Karlsruhe

### 3. Kits

ECL plus western blotting detection system	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (UK)
Protein Assay	BioRad Life Science, München
Qiagen HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction kit	Qiagen, Hilden
TnT Quick Coupled	
Transcription/Translation Systems	Promega, Mannheim
TOPO TA Cloning Kit (pCRII-TOPO)	Invitrogen, Karlsruhe

### 4. DNS-Größenstandards und Protein-Molekulargewichtsstandard

1 kb Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
100 bp Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
SeeBlue Plus2	Invitrogen, Karlsruhe

### 5. Radiochemikalien

L-[ <sup>35</sup> S] Methionin 18,5 MBq (0,500 mCi)	Hartmann Analytic, Braunschweig
---	---------------------------------

### 6. Medien und Zusätze für die Kultivierung von Säugerzellen

Dulbecco's Modification of Eagles Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching (A)
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	PAN Biotech, Wien, (A)

## 7. Antikörper

goat anti Fibrocystin C-Terminus human	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz (USA)
rabbit anti TAPtag	Genscript, New Jersey (USA)
Polyclonal Rabbit Anti-Cow Cytokeratin WSS	Dako, Hamburg
rat anti Ki67	Dako, Hamburg
mouse anti Calmodulin	Sigma Aldrich, München
mouse anti c-myc	Biomol, Hamburg
Alexa Fluor 488 rabbit anti goat	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 goat anti mouse	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 rabbit anti mouse	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 donkey anti goat	Invitrogen, Karlsruhe
anti Rabbit HRP	Dako, Hamburg
anti Goat HRP	Dako, Hamburg

## 8. Enzyme

Antarktische alkalische Phosphatase	NEB, Schwalbach
Expand Long Template DNA Polymerase	Roche, Penzberg
Proteinase K	Roche, Penzberg
Restriktionsendonukleasen	NEB, Schwalbach
RNAse A	Roche, Penzberg
Superscript III reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
TEV-Protease	Invitrogen
T4 DNA-Ligase	NEB, Schwalbach

## 9. Geräte

Agarose-Gelelektrophoresesysteme	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Bakterien-/Hefenschüttler Innova 4000	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Digitalkamera KY-F70B	JVC, London (UK)
Einbettautomat Tissue Tek VIP	Miles Scientific, Niantic (USA)

Entwickler X-O-Mat 1000 processor	Kodak, Rochester (USA)
Expositionskassetten X-Ray Cassette	Rego X-Ray, Augsburg
Feinwaage BP211S	Sartorius, Göttingen
Flexcyclor	Analytic Jena, Jena
Geltrockner 583 Gel dryer	BioRad Life Science, München
Gießstation Tissue Tek III	Miles Scientific, Niantic (USA)
Horizontalschüttler KS 125 basic	Kika Labortechnik, Staufen
Immunostainer TechMate 500 plus	Dako, Hamburg
Inkubator B5060 E und T6060	Heraeus, Hanau
IPG-Runner	Invitrogen, Karlsruhe
Kryostat CM 1900	Leica, Nussloch
Laborwecker TR 118	Oregon scientific, Portland (USA)
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	
Axioskop 50	Zeiss, Göttingen
020.519.011.DM LB 100S	Leica, Nussloch
Mikrotom CP 60	Microm, Walldorf
Grundschnittmicrotom	Leica, Nussloch
Mikrowelle	Siemens, München
Nass-Blot System	
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	BioRad Life Science, München
Netzgerät Consort EV 243	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Spannungsquelle ZOOM Dual Power	Invitrogen, Karlsruhe
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
X-Cell Sure Lock	Invitrogen, Karlsruhe
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg

## 10. Zellen

NIH 3T3	murine embryonale Fibroblasten, Cell Lines Service, Eppelheim
Cos7	renale Fibroblasten aus der grünen Meerkatze, Cell Lines Service, Eppelheim
HEK 293	humane embryonale Niere, Cell Lines Service, Eppelheim

## 11. Oligonukleotide

### 11.1 *pkhd1*cDNS

#### Klonierung *pkhd1*cDNS:

MCS cDNA rev	5' AGCACCGGTGCGGCCGCGGTA 3'
MCS cDNA for	5' CGCGGCCGCACCGGTCAT 3'
Polyduktin for2a	5' GCTGAGCTAACTGGACATGA 3'TGC
Polyduktin 5.2rev1	5' GATACGGGTATCGATCCGGGCTG 3'
Polyduktin 5.1for1	5' GACAGTGTCTGCCTTCAGCTG 3'
Polyduktin rev 8	5' CATGCCACAGCTGTTACTG 3'
AvrII for	5' CCATTAGAAGCAATTCACAACAAAT 3'
AvrII rev	5' TCACAGTCACATTCACAGTGTATCC 3'

#### Klonierung *pkhd1*cDNS eGFP:

NotI Kozak eGFP	5' GCGGCCGCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCG 3'
AgeI Sall rev	5' GTCGACACCGGTCTGGATGGTTTCTGGTGGAGTAGTG 3'
Sall rev eGFP	5' GTCCTGTCAGTTATCTAGATCCGGTGGATC 3'
AgeI for eGFP	5' ACCGGTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG 3'

#### Sequenzierung der *pkhd1*cDNS

Seq1 5' GGGCCATACTCCCTGGAAA 3'	Seq2 5' ATCCAGGAGGAGCAGGCCT 3'
Seq3 5' TCTCCCAGGAAGATTGAGTG 3'	Seq4 5' AGTTCTTCAGCGGAGCCAA 3'
Seq5 5' ACAGGTGTTGCATGTGTCAG 3'	Seq6 5' AATTCCAGAGGCTGCCGACA 3'
Seq7 5' CAGGCCTGCTCTATGTGGAT 3'	Seq8 5' GATGTTCCGGTGCGCATGT 3'
Seq9 5' CAAACTCAGGTGGCTGTACA 3'	Seq10 5' GGCCTTGCTGTTAATGCCA 3'
Seq11 5' GTCTCCTCTTTAAATCCAGTG 3'	Seq12 5' CCTTGCTCTGGGTCTCTCT 3'
Seq13 5' CAGCAACACCAGTGGTCACT 3'	Seq14 5' ACAGTACTTACTGTGAAGG 3'
Seq15 5' AGAGGCCGGAGGTTAGCTA 3'	Seq16 5' GTTGTCTATGTTGGCCGGC 3'
Seq17 5' ATGGTCCCTCTGCTTCCTGC 3'	Seq18 5' GCAGAAGACAGCTGTAAAG 3'
Seq19 5' AATCAGCCAATTACCGCCAA 3'	Seq20 5' TCCAAGGCAAAGCTCGGAT 3'
Seq21 5' CAGAGAGAACTGGGTAGCT 3'	Seq22 5' TTCAGAGACCTGGGACAG 3'
Seq23 5' TCTGCAGCTGAGGGACTGT 3'	Seq24 5' GAAGTAACAATCTACACCT 3'

Seq25 5' AGTAGCATTTCATTTCCTC 3'      Seq26 5' CTGTCTAACTACTACGGCT 3'  
 Seq27 5' CAGGTGAAGGTCAAGTTAAG 3'      Seq28 5' AGCTGAAAGTAGGCACTTT 3'  
 Seq29 5' GAGGCAGAGGTCCTCACTG 3'      Seq30 5' AGTGGTGTATCAGCTGGAT 3'  
 Seq31 5' GCTTTCATGTTCGGTGGTCAT 3'      Seq32 5' TCATTGTGGCCACTAGCTC 3'  
 Seq33 5' CCAATAACAGCAGAGAGGAC 3'      Seq34 5' GACTGAGCATGCGGTCCTA 3'  
 Seq35 5' CAATGAGATTCAGAGCCCTC3'      Seq36 5' TGCCTGGCAACAAAGAGAC 3'  
 Seq37 5' CTGTTGGGGCCCTACTAGTG 3'      Seq38 5' AGAAACACGGGATGGCTAT 3'  
 Seq39 5' CCAAACCCAGAGGACTACAA 3'      Seq40 5' ATCAGCTGCTCCTGTTACG 3'

### Klonierung des Polyduktin-CT-Expressionsplasmids

BamHI rev            5' GGATCCTTACTGGATGGTTTCTGGTGGAGT 3'  
 KpnI-Kozak            5' GGTACCGCCGCCAGCATGAAGAAAAGCAAACCCAGAAAA  
    TAAAA 3'

### **11.2 TAP-Strategie**

N'TAPtag rev            5' AGTCGGAATCCTTACTGGATGGTTGGTGCAG 3'  
 N'TAPtag for            5' ATGGATGCATAAGAAAAGCAAACCAAGAAA 3'

### **11.3 *pkhd1*ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc**

#### Nachweis Transgenexpression:

myc for                5' GCATACATCCTGTCCGTCCAAGCA 3'  
 ER TM rev            5' AGTGTGCTTAATCTCAAGAGGGCT 3'

#### Genotypisierung *pkhd1*ex40 del/del:

ARPKD sense            5' CTAAGAGTGAGAAGATGCTGG 3'  
 ARPKD as              5' CTGGGAGATCAACGCTGCTC 3'  
 PGK-PolyA down      5' CTGCTCTTTACTGAAGGCTCTTT 3'

#### Genotypisierung Rosa26 $\Delta$ neo:

WT as                5' CTCCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTT 3'  
 SA1as                5' GACATCATCAAGGAAACCCTGGAC 3'



---

WT1as                      5' CCCATTTTCCTTATTTGCCCTAT 3'

## 12. cDNS-Klone

Mus musculus calmodulin 1

AMSBio, Abington UK

( cDNA clone MGC:64720 IMAGE:6838207 )

## 13. Methoden

### 13.1 Molekularbiologische Methoden

#### 13.1.1 Extraktion von Gesamt-RNS aus Gewebe

Für die Präparation von Organen wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Gewebe für die Präparation von RNS sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Isolierung der Gesamt-RNS wurden Leber und Niere entnommen. Um die RNS vor dem Abbau durch RNasen zu schützen, wurden alle folgenden Schritte des Versuches unter Verwendung steriler Glaswaren und autoklavierter Lösungen durchgeführt. Alle wässrigen Lösungen wurden vor dem Autoklavieren mit 0,1% (v/v) des RNase-Inhibitors DEPC (Diethylpyrocarbonat) vorbehandelt.

Zur Extraktion der Gesamt-RNS wurde eine „single step“ Methode nach Chomczynski und Sacchi (1987) unter Zuhilfenahme des TRIzol von Invitrogen nach Herstellerangaben angewandt. Bei Trizol handelt es sich um eine monophasische Lösung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol. Durch Guanidinisothiocyanat werden Proteine, auch RNasen, denaturiert, inaktiviert und durch Phenol entfernt. Nach Zugabe von Chloroform und der anschließenden Zentrifugation erfolgt eine Phasentrennung in eine Phenol-Chloroform-, eine Interphase und eine wässrige Phase, wobei sich die RNS in der oberen wässrigen Phase befand. Die Fällung der RNS erfolgte durch Zugabe von Isopropanol.

#### 13.1.2 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zur Größenauftrennung der RNS wurde eine Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, da RNS unter physiologischen Salzkonzentrationen starke Sekundärstrukturen ausbildet. Dazu wurde die RNS zunächst mit einem fünftel Volumen

ethidiumbromidhaltigem Ladepuffer versetzt, 10 Minuten bei 65°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in einem 1,2 %igen Agarosegel mit 6% Formaldehyd aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 6 V/cm. Unter UV-Beleuchtung konnte die RNS sichtbar gemacht werden.

### **13.1.3 cDNS-Synthese durch reverse Transkriptase-Reaktion (RT-PCR)**

Zum Nachweis und zur Klonierung geringer Transkriptmengen wurde die Methode der reversen Transkription von mRNA mit anschließender spezifischer PCR-Amplifikation der hergestellten cDNS (copy-DNS) angewandt (Foley et al., 1993). Dabei wurde auf das Enzym SuperSkript III Reverse Transkriptase aus MMLV (**M**oloney **m**urine **l**eukemia **v**irus) der Firma Invitrogen zurückgegriffen und nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **13.1.4 Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, **p**olymerase **c**hain **r**eaction) dient der spezifischen exponentiellen Amplifikation von definierten DNS-Bereichen, indem deren flankierende Enden Basenpaarungen mit Oligonukleotiden eingehen. Die Synthesereaktion wird von einer hitzestabilen DNS-Polymerase, in den meisten Fällen der Taq-DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* durchgeführt, die auch den Hochtemperaturschritt der DNS-Denaturierung übersteht.

Bei dem ersten Schritt der PCR handelt es sich um einen Denaturierungsschritt, der in der Regel bei 94°C erfolgt und für die Trennung der Matrizen-DNS-Stränge sorgt. Während der anschließenden Abkühlung binden die Oligonukleotide spezifisch an den komplementären Bereich der Matrizen-DNS und werden in der Anwesenheit von dNTPs durch die thermostabile DNS-Polymerase komplementär zum Matrizenstrang verlängert, so dass ein neuer DNS-Doppelstrang entsteht. Der neusynthetisierte DNS-Strang dient im nächsten Zyklus der PCR nach der Denaturierung als Vorlage für die nächste Synthesephase. Durch die Wiederholung dieses Zyklus ergibt sich eine exponentielle Vermehrung des zwischen den Oligonukleotiden gelegenen DNS-Bereiches.

Die für die einzelnen PCR-Reaktionen eingesetzten Oligonukleotide sind in Abschnitt 10 angegeben. Die Anlagerungstemperatur wurde jeweils entsprechend der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt. Die Länge des Syntheseschritts wurde entsprechend der Länge des Amplifikats gewählt, dabei wurde pro kb DNS eine Minute festgesetzt.

Temperaturprofil für die Amplifikation der *pkhd1*cDNS:

Expand Long Template PCR-System, Roche

95 °C 15 min  
95 °C 2 min  
55 °C 1 min  
68 °C 3 min + 10 sec pro Zyklus  
68 °C 7 min  
20 Zyklen

Temperaturprofil Genotypisierung Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc:

95 °C 1 min  
55 °C 1 min  
72 °C 1 min  
35 Zyklen

Temperaturprofil Genotypisierung Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc:

94 °C 2 min  
94 °C 45 sec  
55 °C 30 sec  
72 °C 1 min  
72 °C 5 min  
35 Zyklen

**13.1.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNS-Fragmenten wurden horizontale Agarose-Gele verwendet. In Abhängigkeit von der Größe der Fragmente, wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8% bis 2% (w/v) eingesetzt. So ließen sich DNS-Fragmente mit einer Größe von 100 bp bis 15 kb auftrennen. Die entsprechende Menge an Agarose wurde je nach Verwendungszweck des Gels mit TAE- oder TBE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zum Lösen der Agarose aufgekocht. Nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 60°C wurden 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Diese Substanz interkaliert zwischen den aromatischen Ringsystemen der Nukleotide und sorgt dafür, dass die DNS mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden kann. Die geschmolzene Agarose

wurde in eine Gelkammer gegossen, mit einem Kamm der erforderlichen Taschengröße versehen und nach dem Aushärten mit TAE- oder TBE-Laufpuffer überschichtet. Die Proben wurden zur Beschwerung mit 1/10 Volumen Ladepuffer versehen und bei einer konstanten Spannung von 7-10 V/cm aufgetrennt, indem die Nukleinsäuren das Gel in Richtung der Anode und in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell durchwandern. Um die Größe der Fragmente feststellen zu können, wurde ein Größenstandard mit aufgetrennt.

#### **13.1.6 Isolierung und Aufreinigung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNS-Bande von Interesse bei 70% UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Um die DNS aus dem Gelwürfel zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

#### **13.1.7 Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen im analytischen und präparativen Maßstab**

Für die Restriktion von DNS zu Analyse Zwecken wurden 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNS, 10 Units des Enzyms und 2 µl des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffer eingesetzt. Der Ansatz wurde dann mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt und bei der, für das eingesetzte Enzym, optimalen Temperatur für eine bis mehrere Stunden inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für präparative Restriktionen wurden 10 bis 20 µg genomischer oder Plasmid-DNS eingesetzt und mit bis zu 70 U einer Restriktionsendonuklease behandelt. Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde dabei bis auf 100 µl erhöht und auch hier der entsprechende Reaktionspuffer zugegeben. Die Restriktion erfolgte bei der für das Enzym optimalen Temperatur für eine bis mehrere Stunden oder über Nacht.

Die Restriktion mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen erfolgte in einem Ansatz, wenn für beide Enzyme annähernd optimale Pufferbedingungen gefunden werden konnten. War dies nicht der Fall, erfolgte nach der Restriktion mit dem ersten Enzym eine Ethanolpräzipitation der DNS und erst anschließend die Restriktion mit dem zweiten Enzym im geeigneten Puffer.

### **13.1.8 Ethanol-Präzipitation von DNS-Lösungen**

Um DNS-Lösungen zu konzentrieren, umzupuffern oder zu reinigen wurde die Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetats pH 4,6 und 2 Volumeneinheiten 100% Ethanol versetzt. Die Lösung wurde dann für eine halbe bis zu mehreren Stunden bei -80°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein halbstündiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000 rpm. Das DNS-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend im gewünschten Volumen TE-Puffer oder sterilem Wasser resuspendiert.

### **13.1.9 Ligation von DNS-Fragmenten**

Während der Ligrationsreaktion erfolgt eine intra- und intermolekulare Veresterung benachbarter 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatgruppen, die durch das Enzym T4-DNS-Ligase katalysiert wird. Für die Ligation von DNS-Fragmenten wurden zu dem linearisierten Vektor das zu inserierende DNS-Fragment im molaren Verhältnis 1:1 und/oder im Überschuss von 1:3 bis 1:5, 2 µl 10 x Ligasepuffer und eine U T4-Ligase gegeben. Der Ansatz wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Die Ligation erfolgte je nach Ansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht.

### **13.1.10 Herstellung von LB-Ampicillin-Agarplatten**

Für die Herstellung von LB-Ampicillin-Agarplatten wurden 500 ml autoklavierter LB-Agar in der Mikrowelle bei geringer Wärmezufuhr erhitzt, bis sich der Agar vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde der Agar bis auf ca. 60°C abgekühlt und 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Mit diesem Ansatz konnten dann ca. 20 LB-Ampicillin-Agarplatten mit einem Durchmesser von 9 cm gegossen werden.

### **13.1.11 Klonierung von PCR-Produkten**

Für die Klonierung von PCR-Produkten wurde das TOPO-TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen genutzt und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Das Prinzip des Kits beruht darauf, dass viele thermostabile DNS-Polymerasen eine matrixunabhängige Transferaseaktivität besitzen, durch die ein singuläres Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt wird. Der Plasmidvektor pCR®II-TOPO liegt in linearisierter Form mit einfachen 3'-Thymidinüberhängen vor und trägt das Enzym Topoisomerase I in kovalenter Bindung an den Plasmidenden. Diese

vermittelt die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem doppelsträngigen PCR-Produkt und der Vektor-DNS.

Wurde ein Vektor verwendet, der neben der Ampicillinresistenz auch das Gen für die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ-Gen) enthält, konnten rekombinante Bakterienkolonien von nicht-rekombinanten farblich unterschieden werden. Zu diesem Zweck wurden die verwendeten Agarplatten mit 40  $\mu$ l 40  $\mu$ g/ml X-Gal beschichtet. Bei X-Gal handelt es sich um ein Galaktoseanalogon, bei dessen Abbau unter anderem ein Indigofarbstoff entsteht, der für eine Blaufärbung der Bakterienzellen sorgt. Religierte Vektoren besitzen ein intaktes LacZ-Gen, wodurch Bakterien mit diesem Plasmid in der Lage sind X-Gal abzubauen. Kolonien, die aus solchen Bakterien hervorgehen färben sich aus diesem Grund blau. Bei rekombinanten Bakterien wird das LacZ-Gen durch das inserierte DNS-Fragment unterbrochen und damit inaktiviert. Dies hat zur Folge, dass Kolonien, die aus solchen Bakterien hervorgehen, weiß bleiben.

#### **13.1.12 Präparation chemisch kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>-Methode)**

Das Protokoll zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien für die Transformation basiert auf der Methode von Nishimura (1990) und erzielt Transformationsraten von 3 bis  $5 \times 10^6$  Kolonien pro  $\mu$ g DNS.

50 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie *E. coli* XL-1-Blue angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterienrüttler inkubiert. 1 ml der Vorkultur wurden in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0,3 (Beginn der logarithmischen Teilungsphase) kultiviert. Die Zellen wurden auf 4°C abgekühlt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 50 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und anschließend erneut bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 10 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% Glycerol aufgenommen, auf Eis aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -80°C.

#### **13.1.13 Transformation von Plasmid-DNS in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen**

100  $\mu$ l kompetenter *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 bis 10  $\mu$ l Plasmid-DNS oder Ligationsansatz wurde der Transformationsansatz vorsichtig gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min und Abkühlen der Zellen auf Eis. Zu dem Transformationsansatz wurden 450  $\mu$ l LB-Medium gegeben und die Zellen für 45 bis 60 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Abschließend wurden 50 µl der Zellsuspension auf LBamp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Rest der Zellen wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min sedimentiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Auch dieser Ansatz wurde auf LBamp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion von Klonen, die das Plasmid enthalten, erfolgt dann über die im Vektor enthaltene Antibiotikum-Resistenz.

#### **13.1.14 Isolierung von Plasmid-DNS**

Die Methode zur Isolierung von Plasmid-DNS basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Lineare chromosomale DNS denaturiert bei einem pH-Wert von 12 bis 12,6 vollständig und präzipitiert nach einer Neutralisierung bei hoher Salzkonzentration, während die zirkuläre Plasmid-DNS nur unvollständig denaturiert und sehr schnell renaturiert (Birnboim und Doly, 1979).

1 bis 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in ein Eppendorft-Gefäß gegeben, für 1 min bei 8000 rpm sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Sediment wurde in 300 µl Qiagen-Puffer 1 + 100 µg/ml RNase A resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Qiagen-Puffer 2 (Lysispuffer) wurde die Lösung vorsichtig gemischt, bis sie klar wurde und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert, um eine alkalische Lyse der Bakterienzellen zu erlauben. Zur Neutralisation der Lösung und zur Fällung der bakteriellen Proteine und der chromosomalen DNS wurden 300 µl eiskalter Qiagen-Puffer 3 (Neutralisationspuffer) zugegeben. Die als weißer Niederschlag erscheinenden Proteine sowie die chromosomale DNS wurden durch zehnmündige Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNS enthielt, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 600 µl Isopropanol wurde die Plasmid-DNS gefällt und konnte durch zehnmündige Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert werden. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in 50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die erhaltene DNS konnte direkt zur Analyse durch Restriktionsendonukleasen eingesetzt werden.

Für die Isolierung von Plasmid-DNS im präparativen Maßstab wurde das HiSpeed Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

### 13.1.15 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Die Konzentration von DNS- und RNS-Lösungen lässt sich anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels eines Photometers bestimmen. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD, der Verdünnung und einem spezifischen Multiplikationsfaktor. Eine Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht einer DNS-Konzentration von 50 µg/ml dsDNS, 40 µg/ml einzelsträngiger RNS oder 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide.

Das Verhältnis der OD bei 260 nm zur der bei 280 nm gibt Aufschluss über die Kontamination der Lösung mit Proteinen. Der Quotient aus der OD bei 260 nm und bei 280 nm sollte für DNS-Lösungen bei 1,8 und für RNS-Lösungen bei 2,0 liegen.

### 13.1.16 *In vitro*-Translation

Für die *in vitro*-Translation der *pkhd1*cDNS wurde das „TNT® Quick Coupled Transcription/Translation“ System von Promega verwendet. Der Translationsmix enthält die gesamte eukaryotische Transkriptions- und Translationsmaschinerie in Form eines Retikulozytenlysats aus dem Kaninchen. Es erlaubt so die gleichzeitige Transkription und Translation von eukaryotischen cDNS in einem Ansatz. Durch den Einbau von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin während der Translation, kann das translatierte Protein nachgewiesen werden, indem das PAA-Gel nach Auftrennung der Proteine getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert wird.

Für die Transkription/Translation der *pkhd1*cDNS wurden 2 µg Plasmid-DNS pro Ansatz eingesetzt. Ansonsten wurde nach Herstellerangaben verfahren.

## 13.2 Proteinbiochemische Methoden

### 13.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Lämmli, 1970). In Abhängigkeit des Molekulargewichts der Fragmente wurden 8-12 %-ige Polyacrylamidgele angesetzt.

Verwendet wurde das „Mini-PROTEAN Tetra cell-System“ von BioRad Life Science (München). Die Elektrophorese fand bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel statt. Um eine Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteine zu ermöglichen, wurde



ein Molekulargewichtsstandard mit aufgetrennt. Verwendet wurden je nach Größe der aufgetrennten Proteine der SeeBluePlus2- oder der HiMark-Proteinstandard von Invitrogen.

### **13.2.2 Western-Blot Analyse**

Für den Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran wurde das Nass-Blottersystem „Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell“ von BioRad Life Science (München) verwendet. Hierzu wurden auf einem Träger ein Schwämmchen, 2 Whatman-Papiere, das Gel, die PVDF-Membran, 2 Whatman-Papiere und ein weiteres Schwämmchen aufgebaut. Alle Komponenten wurden vorher in Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wurde 1 min in Methanol, 1 min. in Wasser und anschließend 1 min. in Transferpuffer äquilibriert.

Der Transfer erfolgte mehr als 2 Stunden bei Raumtemperatur und 30 Volt oder über Nacht bei 4 °C und 30 Volt. Nachdem mittels Coomassiefärbung der Erfolg des Transfers überprüft wurde, wurde die Membran 1 h in 5 % Magermilchpulver in PBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper bei Raumtemperatur in einem 50 ml Blaukappenröhrchen auf dem Taumelrollenschüttler. Ungebundener Primärantikörper wurde durch drei Waschschriffe mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T von je 10 min entfernt. Eine einstündige Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten speziesspezifischen sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenschüttler. Ungebundener Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 5 % Magermilchpulver in PBS-T und einem einmaligen Waschschriff mit PBS-T entfernt.

Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde das „ECL Plus western blotting detection System“ von GE Healthcare (Chalfont St. Giles (UK)) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Visualisierung des Chemoluminenzens-Signals erfolgte durch Exponierung auf einem Kodak Röntgenfilm.

### **13.2.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen**

Für die Transfektion von Cos7- und NIH3T3-Zellen wurde das FugeneHD-Transfektionsreagenz der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet. Das Tranfektionsreagenz besteht aus Lipiden und mehreren anderen Komponenten. Im

Vergleich zu anderen liposomenbasierenden Transfektionsreagenzien ist es weniger toxisch.

Die Transfektion von HEK293T-Zellen auf 15cm-Zellkulturschalen erfolgte nach der Kalzium-Phosphat-Methode nach Graham und Van der Eb (1973).

In einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Kalziumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen.

#### **13.2.4 Immunfluoreszenzen**

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend durch 4%ige PFA-Lösung für 10 Minuten bei RT fixiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS gewaschen und durch die Behandlung mit 0,25% TritonX in PBS permeabilisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei RT. Der Antikörper gegen Fibrocystin/Polyduktin (Santa Cruz) wurde 1:50 verdünnt, alle anderen 1:100 verdünnt eingesetzt. Dabei wurden die Antikörper in TBS mit 1% BSA und 5% Pferdeserum aufgenommen. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte erneut ein Waschschrift mit PBS und anschließend die Inkubation mit dem Alexa gekoppelten Sekundärantikörper. Auch der Sekundärantikörper wurde in TBS mit 1% BSA und 5% Pferdeserum, bei einer Verdünnung von 1:400, aufgenommen. Abschließend wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt und die Zellen mit Fluoreszenz Eindeckmedium versehen.

#### **13.2.5 Lysosomenfärbung**

Für die spezifische Färbung der Lysosomen wurde der „LysoTracker red“ von Invitrogen verwendet, der eine Vitalfärbung der Lysosomen ermöglicht. Bei diesem lysosomenspezifischen Farbstoff handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an eine schwache Base gekoppelt ist und frei durch Zellmembranen diffundieren kann, so dass eine Vitalfärbung der Lysosomen möglich ist. In den Lysosomen, die einen sauren pH-Wert von <5 aufweisen, kommt es zu einer Protonierung der Base. Dies führt zu einer Verminderung der Membrandurchgängigkeit des Farbstoffs und somit zu einer Anreicherung in den Lysosomen.

Für die Lysosomenfärbung wurden Cos7-Zellen, die mit der *pkhd1*-eGFP-cDNA transfiziert wurden, 48 Stunden auf Zellkulturobjektträgern kultiviert. Der LysoTracker wurde zu einer

Konzentration von 75 nM mit vorgewärmtem D-MEM-Medium verdünnt. Anschließend wurde das Medium in den Zellkulturobjektträgern durch das Färbungsmedium ersetzt und die Zellen eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4% PFA fixiert.

### 13.2.6 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Puffer:

IPP 150 EGTA (Calmodulinelutionspuffer):

20 mM Hepes/KOH pH 7,9

420 mM NaCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

10 mM KCl<sub>2</sub>

25 % Glycerol

0,5 mM DTT

0,1 % NP-40

0,1 mM EDTA

0,5 mM Complete (Roche)

TEV-Puffer:

10 mM Tris/HCl

10 mM Tris/HCl pH 8

150 mM NaCl

0,1 % NP-40

1 mM MgAc<sub>2</sub>

1 mM Imidazol

10 mM β-Mercaptoethanol

10 mM EGTA

IPP 150:

10mM Tris/HCl pH8

150 mM NaCl

0,1 % NP-40

IPP 100:

10 mM Tris/HCl pH8

0,1 % NP-40

IPP 150 CBP (Calmodulinbindungs-Puffer):

10 mM Tris/HCl pH 8

150 mM NaCl

0,1 % NP-40

1 mM MgAc<sub>2</sub>

1 mM Imidazol

10 mM β-Mercaptoethanol

2 mM CaCl<sub>2</sub>

**Durchführung:**

HEK293T-Zellen wurden auf 15 cm Kulturschalen in DMEM ausgesät und am darauf folgenden Tag bei einer Konfluenz von 60 % unter Verwendung der Kalzium/Phosphat-Methode transfiziert. Nach acht Stunden wurde das Medium gewechselt und die Zellen nach 48 Stunden durch Abschaben von den Platten geerntet. Die Zellen wurden bei 4°C in PBS sedimentiert und in 250 µl Puffer A (Lysispuffer) pro Platte aufgenommen. Durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen wurden die Zellen aufgebrochen, so dass der fertige Proteinextrakt durch Zentrifugation (4°C; maximale Geschwindigkeit; 10 Minuten) gewonnen werden konnte. Der so erhaltene Überstand wurde mit dem entsprechenden Volumen IPP100 versetzt, um eine NaCl-Konzentration von 150 mM zu erhalten. Der Überstand von fünf Kulturschalen wurde mit jeweils 500 µl IgG-Agarose versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Taumelrollenschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die IgG-Agarose dreimal mit 10 ml IPP150 und zweimal mit 10 ml TEV-Puffer im Blaukappenröhrchen gewaschen. Anschließend wurde die Agarose in 1 ml TEV-Buffer aufgenommen und 100 Units TEV-Protease zugesetzt. Die Abspaltung des Proteinkomplexes von den IgG-Agarose Partikeln erfolgte ebenfalls über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsschüttler. Nach zwölf Stunden wurde die IgG-Agarose in eine Einmalsäule (Biorad) überführt und mit 2 ml TEV-Puffer gewaschen. Das Eluat wurde aufgefangen und pro ml mit 3 ml CBP-Puffer und 3 µl 1 M CaCl<sub>2</sub> versetzt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz 300 µl Calmodulinsäulenmaterial gegeben und wieder über Nacht bei 4°C auf einem Taumelrollenschüttler inkubiert. Vor der Elution der Proteine wurde das Säulenmaterial dreimal mit 10 ml IPP150 CBP-Puffer gewaschen. Das Säulenmaterial wurde in eine Einmalsäule überführt. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte durch Zugabe von zweimal 500 µl IPP150 EGTA-Puffer und gründliches Mischen. Die Eluate wurden aufgefangen und bei -80°C bis zu ihrer Weiterverarbeitung aufbewahrt.

**13.2.7 Entsalzen von Proteinproben**

Um die Proteinproben nach der TAP-Aufreinigung für die 2D-Gelelektrophorese einsetzen zu können, müssen sie von den aus den Puffern stammenden Salzen befreit werden. Zu diesem Zweck wurden Entsalzungssäulen von GE-Healthcare verwendet. Sie bestehen aus chemisch inertem Polypropylen, das niedermolekulare Substanzen wie Salze festhält, während Proteine die Säule passieren können.

Die Säulen wurden nach Herstellerangaben unter Verwendung des Zentrifugationsprotokolls eingesetzt.

### **13.2.8 Präzipitation von Proteinen**

Die Präzipitation von Proteinen erfolgte durch Zugabe des fünffachen Volumens an Azeton. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Die Präzipitate wurden anschließend getrocknet und für die 2D-Gelelektrophorese in  $145\ \mu\text{l}$  NUPAGE Solubilisierungspuffer 1 (Invitrogen),  $1,4\ \mu\text{l}$  1M DTT,  $1\ \mu\text{l}$  Ampholyt pH 3-10 und  $10,6\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert.

### **13.2.9 2D-Gelelektrophorese**

Die 2D-Gelelektrophorese stellt eine hochauflösende Technik zur Auftrennung komplexer Proteingemische dar. In der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt. Dies kann zum einen über einen immobilisierten pH-Gradienten auf Polyacrylamidbasis oder wie in diesem Fall über Trägerampholyte erfolgen. Die zweite Dimension stellt eine Polyacrylamidelektrophorese dar, in der die weitere Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe erfolgt. Jeder der nach der Coomassiefärbung im Gel sichtbaren Punkte entspricht einer bestimmten Spezies von Proteinen. Die 2D-Elektrophorese erlaubt so eine wesentlich genauere Auftrennung von Proteingemischen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das IPG-Runner-System der Firma Invitrogen verwendet und nach Angaben des Herstellers verfahren.

### **13.2.10 Koimmunopräzipitation**

Für die Koimmunopräzipitation von Polyduktin und Calmodulin wurde auf das Dynabeads-System von Invitrogen zurückgegriffen. Bei diesem System handelt es sich um eine auf magnetischen Partikeln beruhenden Methode zur Proteinisolierung. Zunächst wird ein Antikörper an die mit ProteinA fusionierten Magnetpartikel gebunden. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem zu untersuchenden Proteinkomplex. Der gekoppelte Antikörper bindet spezifisch an Proteine, so dass diese unter Verwendung eines Magneten von den anderen Proteinen getrennt werden können. Vor der Analyse der Proteine werden diese mit Lämmli-Probenpuffer aufgekocht, was für eine Denaturierung der gebundenen Proteinkomplexe sorgt.

Bei der Verwendung des Dynabeads-Systems wurde streng nach Angaben des Herstellers verfahren.

### 13.2 Immunhistochemie

Es wurde die ABC(**A**vidin-**B**iotin-**C**omplex)-Detektionsmethode angewendet, die eine maximale Antigendetektion bei minimalem Antikörpereinsatz erlaubt. Als Chromogen wurde 3-Amino-Ethyl-Carbazol verwendet. Sämtliche Antikörper wurden maschinell angewendet (DAKO Tech Mate 500).

**Tabelle 1. Immunhistochemie: Antikörper, Klone, Vorbehandlung, Verdünnung und Hersteller**

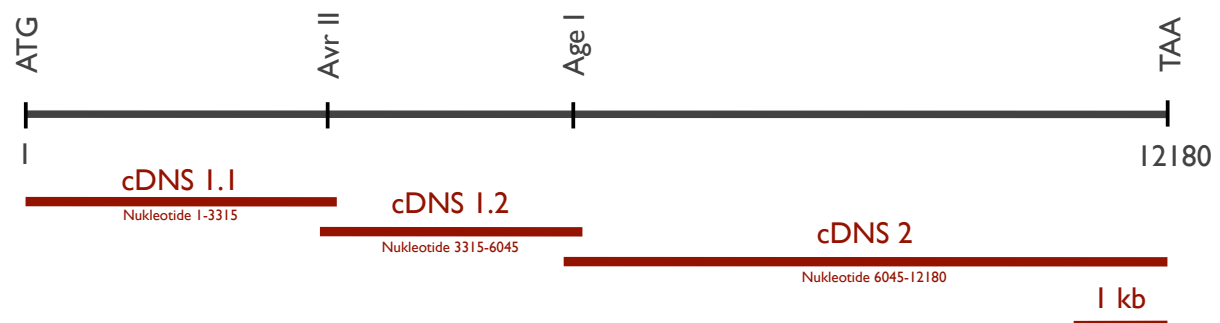
<b>Antikörper</b>	<b>Vorbehandlung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
pan Keratin Antikörper	Dampfkochtopf	1 : 1000	Dako, Hamburg
anti Ki 67	Dampfkochtopf	1 : 25	Dako, Hamburg

### III. Ergebnisse

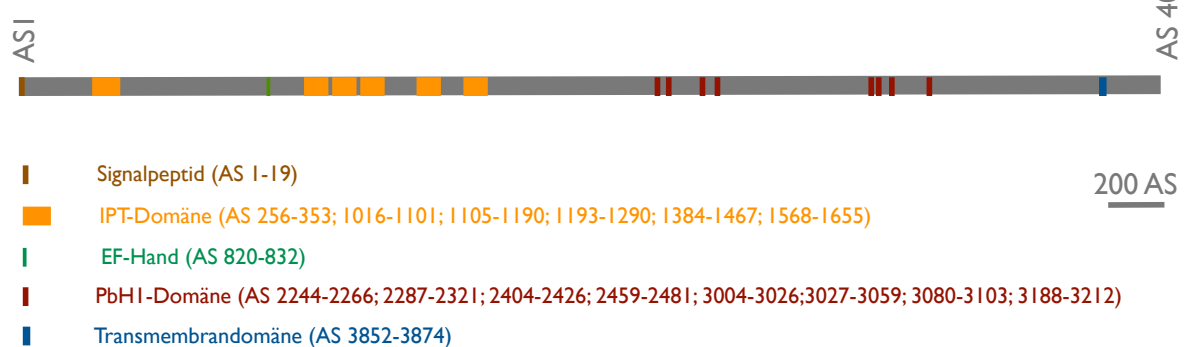
#### 1. Klonierung der murinen *pkhd1*-cDNS

Über die Funktion von Polyduktin und seine Rolle während der fehlerhaften Organogenese bei ARPKD-Patienten ist bis heute wenig bekannt. Für weitere Untersuchungen, wie Lokalisationsstudien, die Suche nach Interaktionspartnern, sowie die Herstellung von Antikörpern wird die murine *pkhd1*-cDNS benötigt.

##### *pkhd1* cDNS



##### Polyduktin



##### Abb. 3.1 Klonierungsstrategie der murinen *pkhd1*-cDNS

Anhand interner Restriktionsstellen wurde die *pkhd1*-cDNS in drei überlappende Fragmente eingeteilt (rote Balken), die für verschiedene Abschnitte von Polyduktin (unten) kodieren. Die Fragmente überlappen einander an den angegebenen Restriktionsstellen und können so über diese ligiert werden. Für die Amplifikation von cDNS1.1 wurden die Oligonukleotide Polyduktin for2a und AvrII rev, für cDNS1.2 die Oligonukleotide AvrII for und Polyduktin 5.2rev1, sowie für cDNS2 die Oligonukleotide Polyduktin 5.1for1 und Polyduktin rev8 verwendet. Die Größenbalken entsprechen einem kb (rot) bzw. 200 Aminosäuren (grau).

## 1.1 Klonierungsstrategie der murinen *pkhd1*-cDNS

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gesamte *pkhd1*-cDNS amplifiziert und in ein eukaryotisches Expressionsplasmid kloniert, so dass sie jetzt für Transfektionen in Säugerzellen genutzt werden kann. Der längste offene Leserahmen des murinen *pkhd1*-Gens umfasst 67 Exone und kodiert für ein Transkript von 12,18 kb. Um dieses Transkript zu amplifizieren, wurde auf die Technik der RT-PCR zurückgegriffen.

In einem ersten Schritt wurde die Gesamt-RNS aus Nierengewebe von C57/Bl6-Mäusen mit Hilfe des TriZOL-Reagenz isoliert. Unter Verwendung einer reversen Transkriptase wurde dann mRNS in Erststrang-cDNS umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR zur Amplifikation des *pkhd1*-Transkripts mit spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Die für die PCR-Reaktion verwendeten Oligonukleotide, sowie die Größe der amplifizierten Fragmente sind Abbildung 3.1 zu entnehmen.

Da die Größe der zu amplifizierenden Transkripte, sowohl durch die reverse Transkription der mRNS als auch durch die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) begrenzt ist, wurde das Gesamttranskript in drei überlappenden Fragmenten amplifiziert. Die Oligonukleotide zur Amplifikation der Transkriptfragmente wurden so gewählt, dass die PCR-Produkte an geeigneten Restriktionsstellen überlappen, so dass sie schließlich zu dem gewünschten Gesamttranskript zusammengesetzt werden können. Eine Übersicht über Länge, Position und Schnittstellen, die für die Klonierung eingesetzt wurden, gibt Abbildung 3.1.

Nach der Amplifikation der drei überlappenden Fragmente durch PCR, wurden diese in pCR®-TOPO®-Vektoren (Invitrogen) subkloniert. Um zu überprüfen, ob durch die PCR Fehler in der Sequenz der cDNS entstanden waren, die zum Einbau eines Stopcodons oder zur Verschiebung des Leserahmens führen würden, wurden Strang und Gegenstrang sequenziert. Die Sequenzierung ergab für die drei Fragmente weder eine Verschiebung des Leserahmens noch das Auftreten eines frühzeitigen Stopcodons, so dass mit den isolierten Fragmenten weitergearbeitet werden konnte (Sequenzen siehe Anhang).

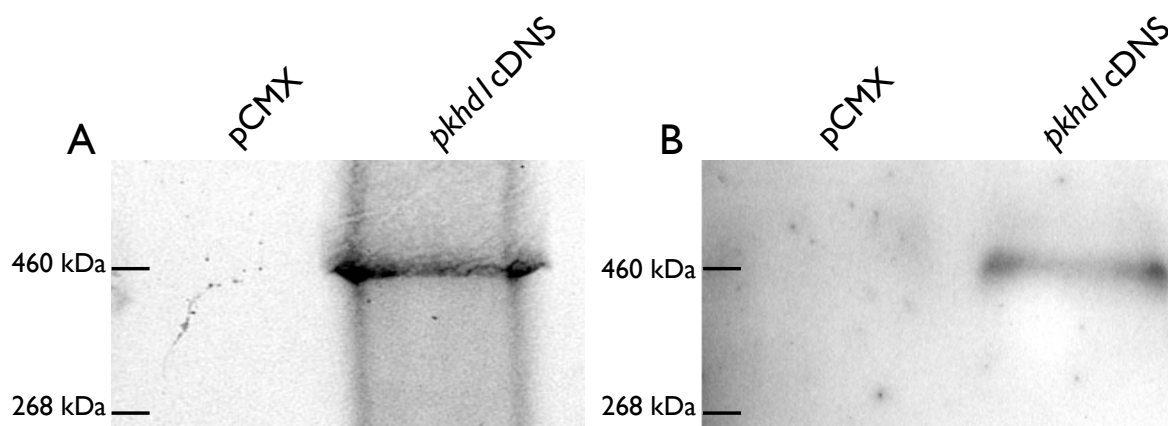
cDNS-Fragment 1.2 wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und AvrII, Fragment 1.2 mit AvrII und AgeI und Fragment 2 mit AgeI und NheI aus den Ausgangsvektoren ausgeschnitten und in den mit KpnI und NheI geschnittenen pCMX-Vektor ligiert.



## 1.2 Nachweis des offenen Leserahmens der *pkhd1*-cDNS

Um zu überprüfen, ob der Leserahmen der klonierten cDNS offen ist und es tatsächlich zur Translation des Gesamtproteins kommt, wurde eine *in vitro*-Translation durchgeführt. Hierfür wurde das TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System genutzt. Hierbei handelt es sich um ein Retikulozytenlysate aus dem Kaninchen, das die gesamte eukaryotische Transkriptions- und Translationsmaschinerie enthält. Es kann somit genutzt werden, um cDNS in eukaryotischen Expressionsplasmiden zu transkribieren und unter Einbau von radioaktivem  $^{35}\text{S}$ -Methionin zu translatieren. Das synthetisierte Protein kann mittels SDS-PAGE seiner Größe entsprechend aufgetrennt werden. Das fertige PAA-Gel wird anschließend getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert. Die Banden auf dem Röntgenfilm geben so Aufschluss über die Größe der translatierten Proteine.

Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis für die Translation der *pkhd1*-cDNS. Auf dem Röntgenfilm ist eine deutliche Bande zu erkennen, die einer Größe von ca. 460 kDa entspricht. Bei dieser Bande handelt es sich vermutlich um Polyduktin. Als Kontrolle wurde der leere pCMX-Vektor eingesetzt.



### Abb.3.2: Nachweis des offenen Leserahmens der *pkhd1* cDNS

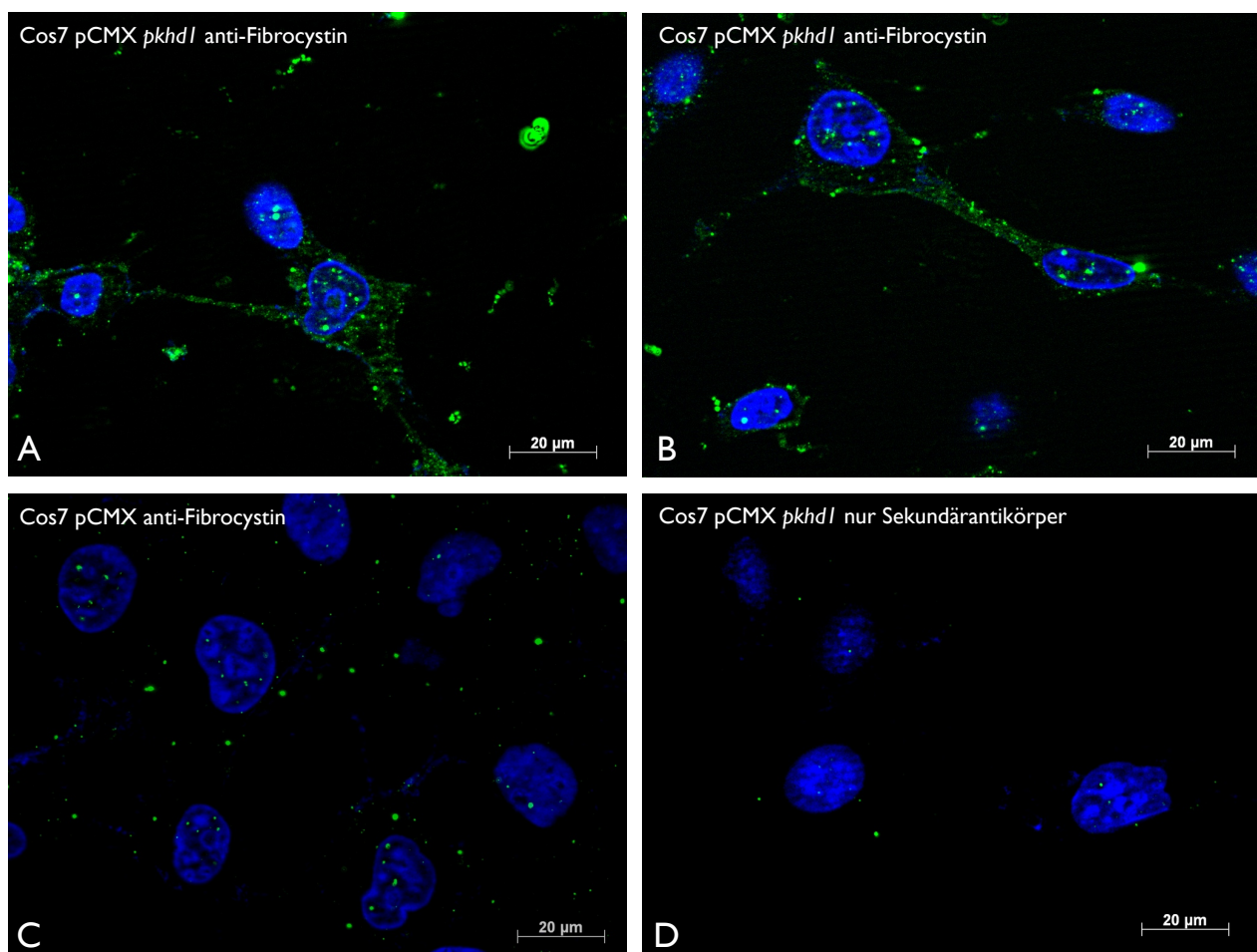
(A) *In vitro* Translation der *pkhd1* cDNS. 10  $\mu\text{l}$  des Translationsansatzes wurden in einem NuPage®Novex 4-12% Bis-Tris-Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt und das getrocknete Gel einem Röntgenfilm exponiert. Als Kontrolle wurde eine Translation des pCMX-Vektors durchgeführt. (B) Western-Blot zum Nachweis von Polyduktin in Proteinextrakten aus NIH-3T3-Zellen. Der primäre Antikörper richtet sich gegen den C-Terminus von humanem Polyduktin. Als Kontrolle wurde ein Proteinextrakt aus NIH-3T3-Zellen, die mit pCMX transfiziert wurden, eingesetzt.

Um zu zeigen, dass die Transkription und Translation der klonierten cDNS auch *in vivo* fehlerfrei funktioniert und es sich bei dem entstehenden Protein tatsächlich um Polyduktin handelt, wurden NIH-3T3-Zellen mit der cDNS, sowie als Kontrolle mit dem leeren pCMX-Vektor transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte

hergestellt. Die Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte ergab unter Verwendung eines primären Antikörpers, der sich gegen den C-Terminus von murinem Polyduktin richtet, eine Bande in der erwarteten Höhe von 460 kDa (Abbildung 3.2).

### 3.3 Funktioneller Nachweis von Polyduktin

Bei Polyduktin handelt es sich um ein TypI-Transmembranprotein (Nagasawa et al., 2002, Onuchic et al., 2002). Um zu zeigen, dass die klonierte cDNS zu einem Protein führt, dass in der Zelle korrekt prozessiert wird, wurden Cos7-Zellen mit der *pkhd1*-cDNS und dem pCMX-Vektor als Kontrolle transfiziert und nach 24 Stunden Immunfluoreszenzen durchgeführt.

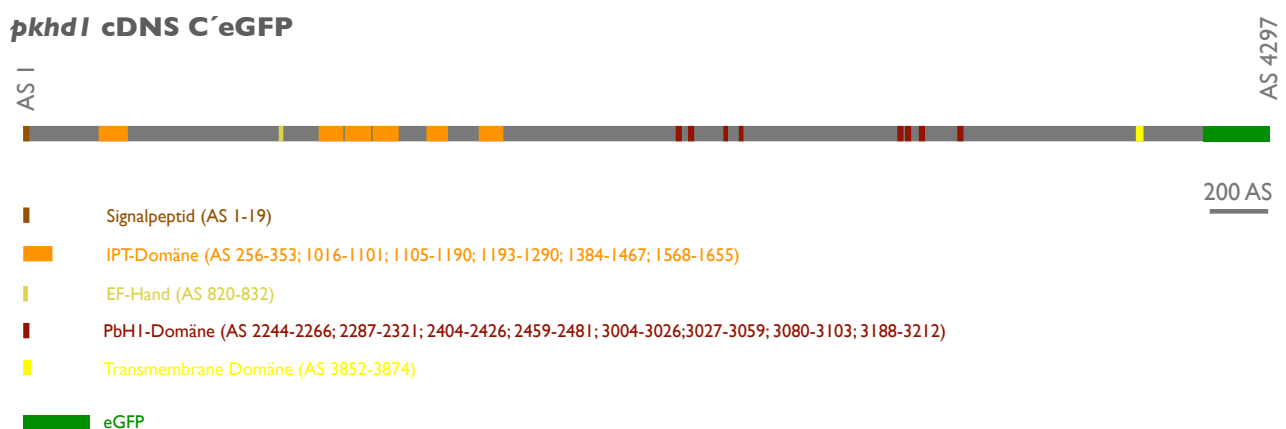


**Abb.3.3: Immunfluoreszenzen von Cos7-Zellen transfiziert mit pCMX *Pkhd1***

(A) und (B) zeigen Apotom-Aufnahmen von Cos7-Zellen, die transient mit pCMX *Pkhd1* transfiziert wurden (Polyduktin grün, DAPI-Kernfärbung blau). Primärantikörper: Goat anti Fibrocystin (SantaCruz), Sekundärantikörper: Alexa 488 anti Goat. (C) und (D): als Kontrollen wurden Cos7-Zellen mit pCMX transient transfiziert und ebenfalls mit den oben angegebenen Antikörpern behandelt (C) bzw. mit pCMX *pkhd1* transfiziert und nur mit dem Sekundärantikörper behandelt (D). Der Größenbalken entspricht 20 µm.

Für die Immunfluoreszenzen wurde der Fibrocystin (Polyduktin) Antikörper von SantaCruz verwendet, der gegen den C-Terminus von humanem Polyduktin gerichtet ist. Da der Antikörper aus der Ziege stammt, wurde als Sekundärantikörper ein Alexa488-konjugierter Antikörper gegen Ziege eingesetzt, so dass in Abbildung 3.3 Polyduktin grün erscheint. Das Experiment zeigt, dass das Protein sowohl in der Plasmamembran als auch im Zytoplasma nachweisbar ist (Abbildungen 3.3 A und B). Als Kontrollen wurden Cos7-Zellen mit dem leeren pCMX-Vektor (Abbildung 3.3 C) bzw. pCMX *pkhd1* (Abbildung 3.3 D) transfiziert und mit Primär- und Sekundär- bzw. nur dem Sekundärantikörper behandelt. In diesen Zellen konnte kein Signal detektiert werden.

Auch Menezes et al. konnten 2004 mit Hilfe von eigens generierten polyklonalen Antikörpern zeigen, dass Polyduktin sowohl an der Zellmembran als auch im Zytoplasma von kultivierten IMCD-(mouse inner medullary collecting duct)-Zellen lokalisiert ist.



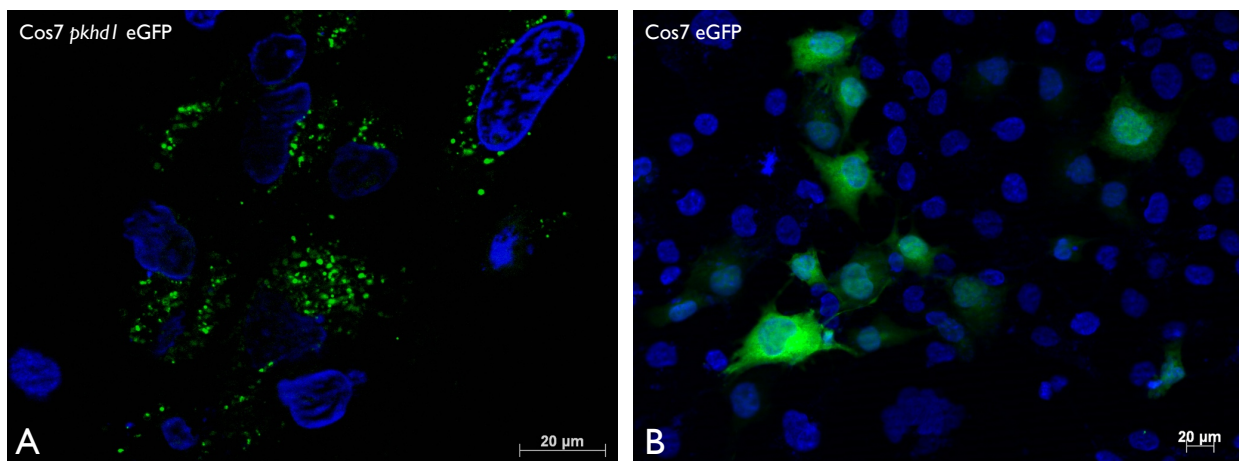
### Abb. 3.4 Schematische Darstellung des C-terminal eGFP-markierten Polyduktin

Die kodierende Sequenz des eGFP-Proteins wurde über PCR an die *pkhd1*-cDNS angehängt, so dass ein Fusionsprotein aus Polyduktin und eGFP entsteht, das einen direkten Nachweis in der Zelle erlaubt. Der Größenbalken entspricht 200 Aminosäuren.

### 3.3 Klonierung einer eGFP-markierten *pkhd1*-cDNS

Da alle kommerziell erhältlichen Antikörper gegen humanes Polyduktin gerichtet sind und somit nur schwache Signale bei der Detektion von murinem Polyduktin liefern, wurde neben der unmarkierten *pkhd1*-cDNS auch eine C-terminal eGFP-(enhanced green fluorescent protein)-markierte Variante hergestellt (Abbildung 3.4). Dies erlaubt eine direkte Detektion von Polyduktin in der Zelle ohne immunologische Techniken. Die eGFP-

Domäne wurde an den C-Terminus von Polyduktin fusioniert um zu gewährleisten, dass nur das vollständige und damit membranständige Protein nachgewiesen werden kann. Abbildung 3.5 gibt die Lokalisation des eGFP-markierten Polyduktin in Cos7-Zellen wieder. Die Zellen wurden mit der *pkhd1*-cDNS bzw. als Kontrolle mit dem leeren pCMX-Vektor transfiziert. Darüber hinaus wurde eine Transfektion mit einem Plasmid durchgeführt, das nur die kodierende Sequenz des eGFPs (pEGFP-C3) enthält, um ausschließen zu können, dass das detektierte Signal von einem alternativen Transkriptionsstartpunkt herrührt, der nur für die Transkription und Translation des eGFP sorgt (Abb.3.5 B). Auch für eGFP-markiertes Polyduktin ist in Cos7-Zellen ein Signal in vesikelartigen Strukturen im Zytoplasma und an der Plasmamembran zu detektieren (Abb. 3.5 A). EGFP allein hingegen ist gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt (Abb. 3.5 B).



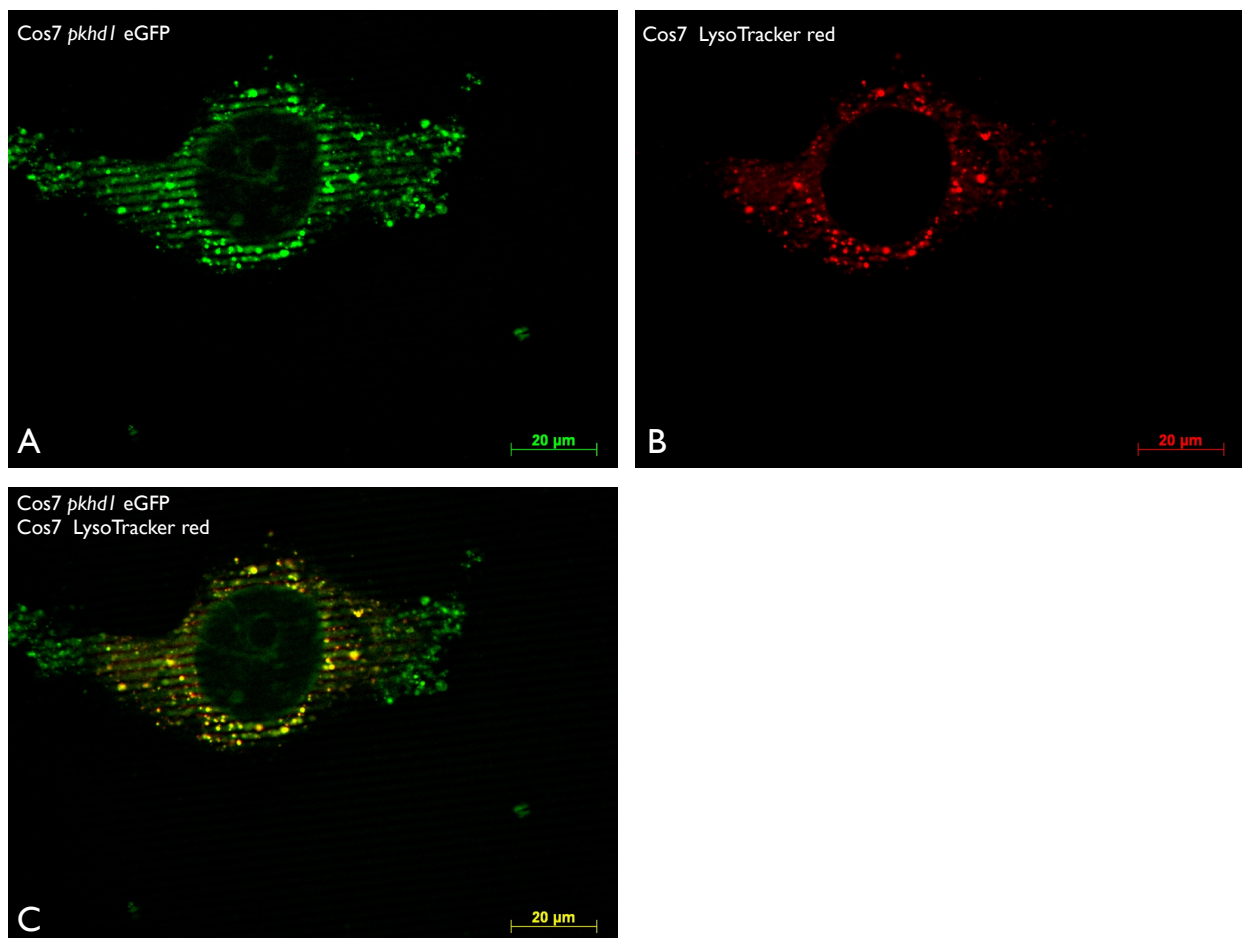
**Abb.3.5 Cos7-Zellen transfiziert mit pCMX *pkhd1*-eGFP und pEGFP-C3**

Apotom-Aufnahme von Cos7-Zellen, die transient mit pCMX *Pkhd1*-eGFP (A) bzw. pEGFP-C3 (B) transfiziert wurden (Polyduktin grün, DAPI-Kernfärbung blau). In Abbildung A sind deutliche vesikelartige Strukturen im Zytoplasma und an der Plasmamembran zu erkennen. Der Größenbalken entspricht 20 µm.

### 3.4 Lokalisation von Polyduktin in den Lysosomen

Um Aufschluss darüber zu erhalten in welchen zellulären Kompartimenten Polyduktin lokalisiert ist, wurden Cos7-Zellen mit der pCMX *pkhd1* eGFP transfiziert und gleichzeitig verschiedene Zellkompartimente wie Endoplasmatisches Retikulum (ER), Golgiapparat und Lysosomen mit spezifischen Antikörpern oder Farbstoffen angefärbt. In ER und Golgiapparat finden posttranslationale Modifikationen von Membranproteinen statt. Da es sich bei Polyduktin um ein TypI-Membranprotein handelt, das laut Strukturvorhersagen

stark glykosyliert werden könnte (Onuchic et al., 2002), ist es denkbar, dass die vesikuläre Färbung von Polyduktin auf eine Lokalisation in einem dieser Kompartimente zurückzuführen ist. Darüber hinaus erfolgt die Degradation von Transmembranproteinen nach der Phagozytose und Transport der Proteine über frühe und späte Endosomen in den Lysosomen (Piper und Luzio, 2007). Auch unlösliche fehlgefaltete Proteine werden durch Autophagozytose zu den Lysosomen transportiert, wo sie degradiert werden (Ding und Yin, 2008).



**Abb. 3.6: Cos7-Zellen transfiziert mit pCMX *Pkhd1*-eGFP**

Apotomaufnahme von Cos7-Zellen, die transient mit pCMX *Pkhd1*-eGFP transfiziert wurden. Zusätzlich wurden die Lysosomen mit Hilfe des LysoTrackers von Invitrogen angefärbt (Polyduktin grün, Lysosomen rot). (A) Lysosomenfärbung, (B) Polyduktin, (C) Überlagerung der Lysosomen- und der Polyduktin-Färbung.

Zur Färbung der Lysosomen wurde ein lysosomenspezifischer Farbstoff genutzt, der eine Vitalfärbung der Lysosomen ermöglicht. Abbildung 3.6 zeigt eine digitale Überlagerung des Polyduktin-eGFP-Signals und der Lysosomenfärbung. So konnte gezeigt werden,

dass Polyduktin in transfizierten Cos7-Zellen in den Lysosomen und an der Zellmembran lokalisiert ist.

Polyduktin konnte weder im ER, noch im Golgiapparat nachgewiesen werden.

Die durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Experimente haben gezeigt, dass es nicht nur gelungen ist, die *pkhd1*cDNS zu klonieren, sondern dass diese auch in funktioneller Form vorliegt. Neben einer Lokalisation von Polyduktin an der Plasmamembran von transfizierten Cos7-Zellen, konnte gezeigt werden, dass das Protein in den Lysosomen vorliegt. Dies ist vermutlich auf die Degradation des Proteins in Folge der Überexpression zurückzuführen.

## 2. TAP-Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern von Polyduktin

Bis heute konnte CAML (calcium modulating cyclophilin ligand) als Interaktionspartner von Polyduktin identifiziert werden (Nagano et al., 2005). Die Identifikation weiterer Interaktionspartner könnte Aufschluss über die Funktion von Polyduktin geben, über die bis heute nur wenig bekannt ist. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die TAP-(tandem affinity purification)-Strategie zur Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern von Polyduktin angewandt.

Die TAP-Methode wurde entwickelt, um Proteinkomplexe, die an das Protein von Interesse binden, schnell und in für die massenspektrometrische Bestimmung ausreichender Qualität aufzureinigen. Dabei erfolgt die Expression des zu untersuchenden Proteins in Zellen in einer nahezu natürlichen Konzentration, so dass es nicht zur Bildung von Proteinkomplexen aufgrund einer starken Überexpression kommt (Rigaut et al., 1999). Die cDNS, die für das Köderprotein kodiert, wird zunächst in einen Expressionsvektor kloniert, der zur Expression des Fusionsproteins aus Köderprotein einem Calmodulinbindungspeptid und einer ProteinA-Domäne führt (Abbildung 3.7).



**Abb. 3.7: Fusionsprotein aus Polyduktin C-Terminus und TAP-Domäne**

Für die TAP-Aufreinigung wurde ein Fusionsprotein aus dem Polyduktin C-Terminus und der TAP-Domäne hergestellt. Diese besteht aus einem Calmodulinbindungspeptid, einer TEV-Spaltungsstelle und einer ProteinA-Domäne und wird N-terminal an das Köderprotein fusioniert.

Die TAP-Aufreinigung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird das Köderprotein samt der interagierenden Proteine über eine ProteinA-Domäne an IgG-Agarose gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt die Abspaltung des Proteinkomplexes durch eine TEV-Protease, dann erfolgt die Bindung an eine Calmodulin-Matrix über ein Calmodulinbindungspeptid. Abschließend kann der Proteinkomplex unter nativen Bedingungen von der Matrix eluiert werden. Eine schematische Übersicht über die TAP-Strategie ist Abbildung 3.7 zu

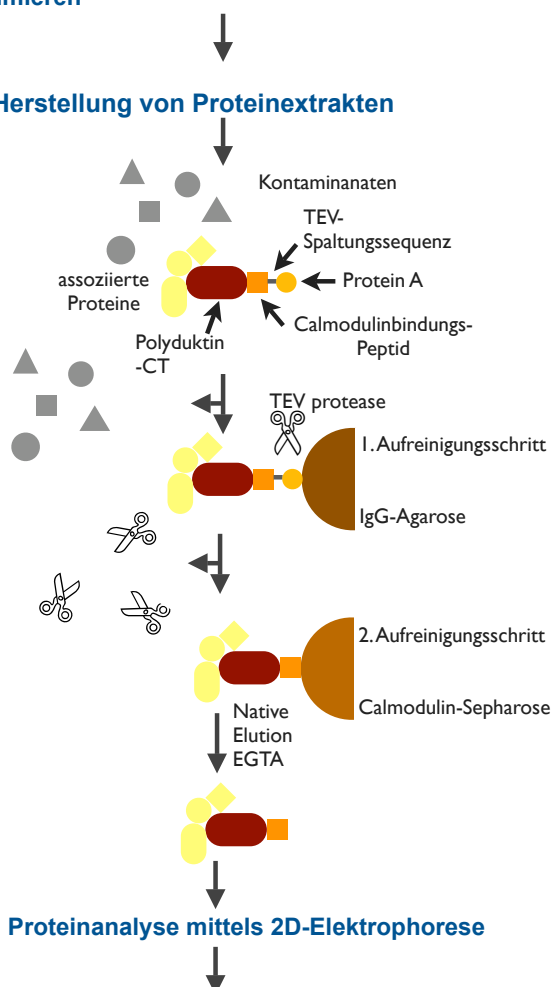


entnehmen. Für die TAP-Strategie wurde nur die 185 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Domäne des murinen Polyduktin eingesetzt, da das Gesamtprotein mit einer Größe von 460 kDa für eine solche Interaktionsstudie zu groß ist. Außerdem weist der intrazelluläre C-Terminus von Polyduktin laut Strukturvorhersagen zwei potentielle Phosphorylierungsstellen auf (Onuchic et al., 2002). Interaktionen mit Proteinen, die an der Signaltransduktion in der Zelle beteiligt sind, sind also für die C-terminale Domäne des Proteins zu erwarten. Darüber hinaus konnten Kamori et al. 2007 zeigen, dass der C-Terminus von Polyduktin abgespalten werden kann, um anschließend in den Kern zu translozieren. Es ist denkbar, dass Polyduktin im Kern mit anderen Proteinen, wie z.B. Transkriptionsfaktoren interagiert und so an der Expression von Genen beteiligt ist, die Einfluss auf die Zellproliferation nehmen.

**1. Generierung von rekombinanten HEK293T-Zellen, die den TAP-markierten Polyduktin-C-Terminus exprimieren**

**2. Herstellung von Proteinextrakten**

**3.**



**Abb. 3.8 Schematische Darstellung der TAP-Strategie zur Suche nach Interaktionspartnern von Polyduktin**

Zunächst werden HEK293T-Zellen mit dem Expressionsplasmid transfiziert, nach 48h geerntet und Proteinextrakte hergestellt. Diese werden zunächst über eine ProteinA-Matrix aufgereinigt. So werden nicht im Proteinkomplex vorliegende Proteine entfernt. Anschließend erfolgt die Abspaltung der ProteinA-Domäne durch eine TEV-Protease. In einem zweiten Aufreinigungsschritt wird der Proteinkomplex durch das Calmodulin-bindende Peptid des Köderproteins an eine Calmodulinmatrix gebunden. Nach einigen Waschschritten erfolgt die Elution des Proteinkomplexes unter nativen Bedingungen durch EGTA. Die Analyse der Proteinkomplexe erfolgt mittel 2D-Gel-Elektrophorese. Einzelne Proteine können durch Massenspektrometrie identifiziert werden.

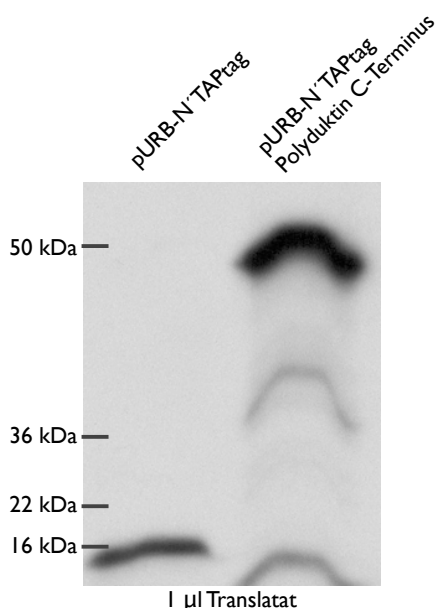


## 2.1 Klonierung des TAP-Expressionsplasmids

Zunächst musste der für die zytoplasmatische Domäne des murinen Polyduktin kodierende Anteil der *pkhd1*-cDNS Nukleotide 11.625 bis 12.180 in ein TAP-Expressionsplasmid eingesetzt werden. Dazu wurden durch PCR eine *Ascl*- und eine *Bam*HI-Restriktionsstelle an die 555 bp umfassende und für den C-Terminus von Polyduktin kodierende Sequenz der cDNS angehängt. Als Matrize für die PCR-Reaktion diente die bereits im Rahmen dieser Arbeit isolierte *pkhd1*-cDNS. Anschließend wurde das cDNS-Fragment über die erwähnten Schnittstellen in das Plasmid pURB-N'TAPtag eingesetzt. Das fertige Plasmid sorgt für die Expression eines Fusionsproteins, das N'-terminal die TAP-Domäne trägt (Abbildung 3.7).

Um sicher zu stellen, dass nach der PCR-Reaktion keine Mutationen eingefügt wurden, die den Leserahmen des Fusionsproteins verändern, wurde das Plasmid auf Strang und Gegenstrang vollständig sequenziert. Es wurde keine solche Mutation in der kodierenden Sequenz für das Fusionsprotein gefunden.

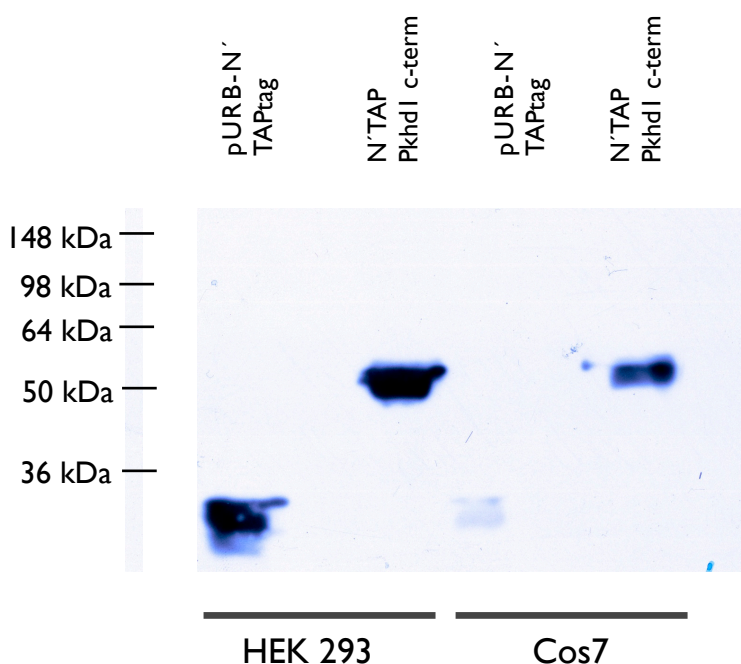
Dies konnte auch durch eine *in vitro*-Translation des Expressionsplasmids bestätigt werden. Wieder wurde ein Retikulozytenlysat aus Kaninchen unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -Methionin eingesetzt, das translatierte Protein in einem 10%igen PAA-Gel entsprechend seiner Größe von ca. 48 kDa aufgetrennt, das Gel getrocknet und anschließend einem Röntgenfilm exponiert. Als Kontrolle wurde der pURB-N'TAPtag-Vektor genutzt, der für eine Expression der TAP-Domäne sorgt. Das Ergebnis der *in vitro*-Translation ist Abbildung 3.9 zu entnehmen.



**Abb. 3.9** *in vitro*-Translation des *pkhd1*-TAP-Fusionsplasmids

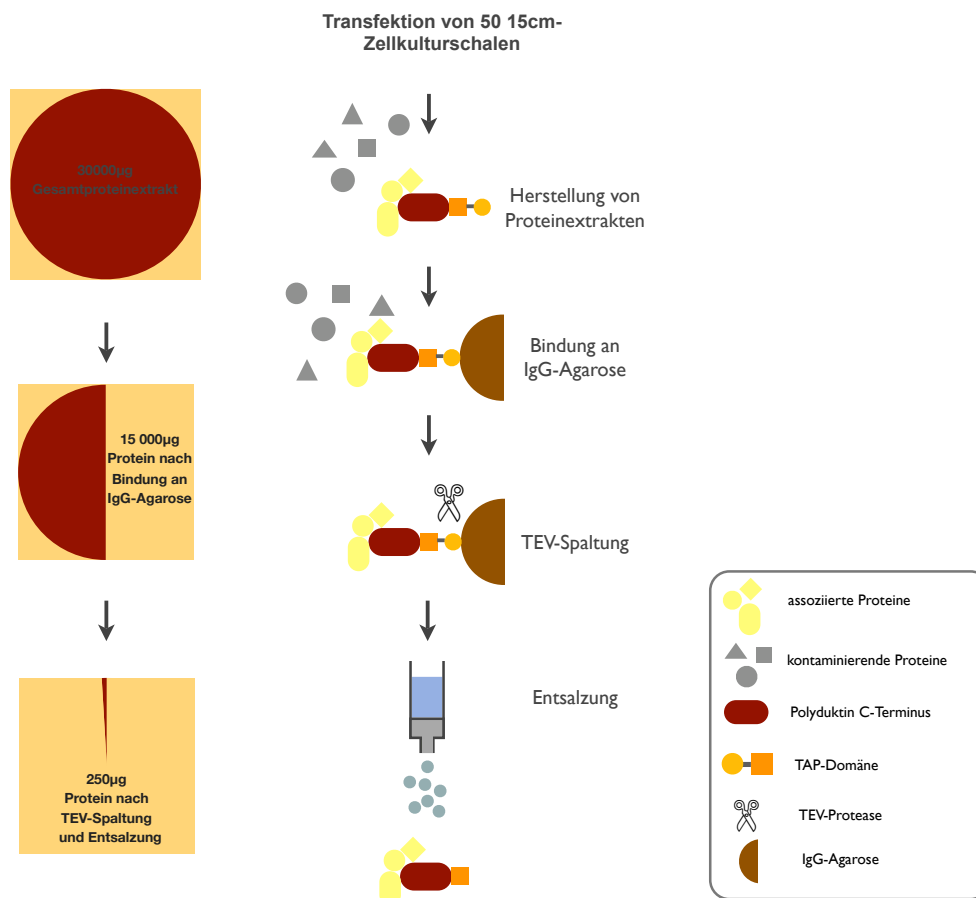
In einem 10%igen PAA-Gel wurden *in vitro*-Translatate des Fusionsplasmids (pURB-N'TAPtag *pkhd1* c-term) und pURB-N'TAPtag aufgetrennt. Eine starke Bande ist auf der Höhe von 48 kDa zu erkennen, was der Größe des Fusionsproteins entspricht. In der Kontrollspur ist die TAP-Domäne sichtbar.

Wie erwartet kann ein Protein mit einer Größe von 48 kDa in der Spur nachgewiesen werden, in der das Translatat des *pkhd1*-TAP-Fusionsplasmids aufgetrennt wurde. In der Kontrollspur ist ein kleines Protein sichtbar, das vermutlich der TAP-Domäne entspricht. In einem Zellkulturexperiment wurde darüber hinaus überprüft, ob sich das Fusionsprotein auch *in vivo* exprimieren lässt und welche Nierenzelllinie am geeignetsten ist. Zu diesem Zweck wurden HEK293T(human embryonic kidney)- sowie Cos7-Zellen (Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze) mit dem *pkhd1*-TAP-Fusionsplasmid und dem leeren pURB-N'TAP-Vektor transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt. Eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines gegen die TAP-Domäne gerichteten Antikörpers zeigt sowohl in den Proteinextrakten aus HEK293T-Zellen, sowie in dem aus Cos7-Zellen die erwarteten Banden von 48 kDa für das Fusionsprotein und 18 kDa für die TAP-Domäne (Abb. 3.10). Obwohl in allen Spuren die gleichen Proteinmengen aufgetrennt wurden, waren die Signale in den Proteinextrakten aus Cos7-Zellen schwächer. Dies lässt darauf schließen, dass beide Proteine besser in HEK293T-Zellen exprimiert werden oder diese Zellen mit einer höheren Effizienz transfiziert werden können. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Experimenten nur mit dieser Zelllinie gearbeitet.



**Abb. 3.10 Western-Blot-Analyse verschiedener Proteinextrakte zum Nachweis der Expression des Polyduktin-TAP-Fusionsproteins**

Um die Expression des Fusionsproteins zu überprüfen wurden HEK293T- und Cos7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Die Analyse der Proteinextrakte, von denen jeweils 20 µg aufgetragen wurde, erfolgte unter Verwendung des anti-TAPtag Antikörpers (genscript). Sowohl in den Kontrollspuren (pURB-N'TAP) als auch in denen des Fusionsproteins (N'TAP *pkhd1* c-term) konnten die erwarteten Proteine von 18 bzw. 48 kDa detektiert werden.



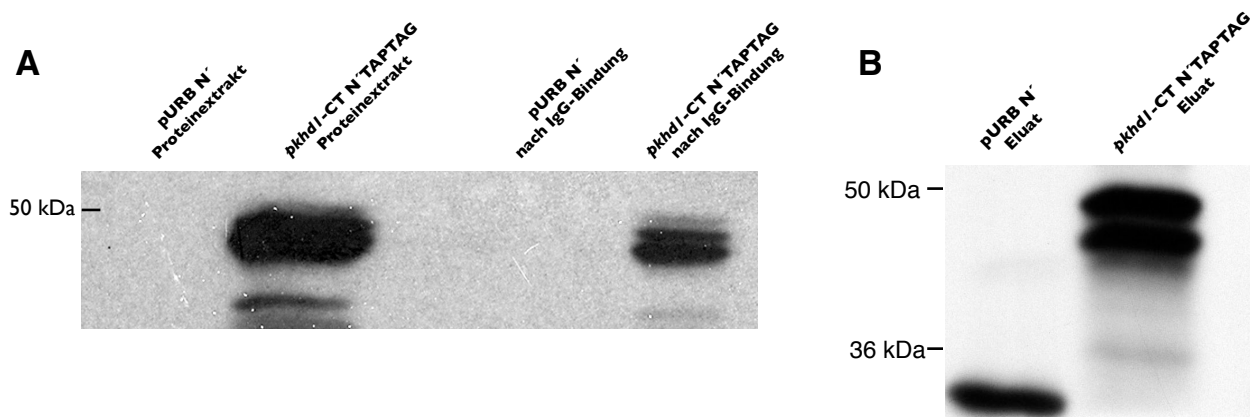
### Abb. 3.11 Proteineinsatz für die TAP-Aufreinigung

Für die TAP-Strategie wurden jeweils 50 15cm-Zellkulturschalen mit dem Polyduktin-TAP-Fusionskonstrukt und dem leeren TAP-Expressionsplasmid transfiziert. Nach Herstellung der Proteinextrakte wurden 30 mg Protein für die Bindung an die IgG-Matrix eingesetzt. Ca. 15 mg des Proteinextrakts konnten an die IgG-Agarose gebunden werden. Nach der TEV-Spaltung und der anschließenden Entsalzung der Proben und der Fällung der Proteine konnten 250 µg Protein für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden. Dies entspricht ca. 1% der eingesetzten Proteinmenge.

## 2.2 TAP-Aufreinigung

Für die Aufreinigung von Proteinkomplexen, die mit dem C-Terminus des murinen Polyduktin assoziiert sind, wurden zunächst jeweils 50 15-cm-Gewebekulturschalen nach der Kalzium/Phosphat-Methode mit jeweils 20 µg des *pkhd1*-TAP-Plasmids bzw. des leeren pURB-N-TAP-Vektors transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die HEK293T-Zellen mit frischem DMEM-Medium versorgt und nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurde ein Proteinextrakt hergestellt, von dem jeweils 30 µg für eine Western-Blot-Analyse zurückbehalten wurden, dies entspricht in etwa 1/1000 der Gesamtproteinmenge, die für die TAP-Aufreinigung eingesetzt wurde (Abbildung 3.12, Proteinextrakt). Die Proteinextrakte wurden entsprechend dem Protokoll mit Puffer versetzt um die

gewünschte Salzkonzentration einzustellen und zusammen mit IgG-Agarose über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert (siehe Material und Methoden). Anschließend wurde 1/1000 des Überstandes für eine Western-Blot-Analyse entnommen (Abb. 3.12 Überstand nach IgG). Durch mehrfaches Waschen der IgG-Agarose wurden Proteine, die nicht in dem Proteinkomplex um den Polyduktin-C-Terminus bzw. die TAP-Domäne gebunden waren, entfernt. Die Elution der Proteinkomplexe erfolgte durch eine zwölfstündige Inkubation mit TEV-Protease bei 4°C. Auch von diesem Eluat wurde 1/1000 des Gesamtvolumens für weitete Analysen entnommen (Abb. 3.12 Eluat).



**Abb. 3.12 Western-Blot-Analyse der Proteinextrakte aus einzelnen TAP-Aufreinigungsschritten**

Jeweils 30 µg des Gesamtproteinextrakts, sowie 1/1000 des Gesamtvolumens des Überstandes nach der IgG-Bindung und des Eluats nach der TEV-Spaltung wurden in einem 10%igen PAA-Gel aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Für den Nachweis des Fusionsproteins wurde für Membran A der anti Fibrocystin/Polyduktin-Antikörper von SantaCruz genutzt. Sowohl im Gesamtproteinextrakt, als auch im Überstand nach der Bindung an die IgG-Matrix konnte eine Bande von 48 kDa detektiert werden. Für Membran B wurde der anti TAP-Antikörper (genscript) genutzt. Sowohl im Eluat der TAP-Domäne, sowie im Eluat, das das Fusionsprotein enthält, konnten die charakteristischen Banden von 18 und 48 kDa nachgewiesen werden.

Da sich in vorhergehenden Versuchen gezeigt hatte, dass die Bindung und Elution der Proteinkomplexe an die Calmodulin-Matrix nur sehr ineffizient erfolgt, wurde auf diesen zweiten Aufreinigungsschritt verzichtet. Wie Abbildung 3.10 und 3.12 A zu entnehmen ist, konnte das Fusionsprotein aus Polyduktin und der TAP-Domäne in großer Menge in den HEK293T-Zellen exprimiert werden. Da für die Detektion der Proteine im Western-Blot ein Antikörper gegen Polyduktin eingesetzt wurde, konnte die TAP-Domäne in der Kontrolle (pURB-N'TAP) nicht nachgewiesen werden. Auch nach der zwölfstündigen Bindung des Fusionsproteins an IgG-Agarose, konnte im Überstand immer noch ungebundenes Protein nachgewiesen werden, wie die Bande von 48 kDa in Abbildung 3.12 A zeigt. Für die

Analyse der Eluate nach Inkubation mit TEV-Protease, wurde der Antikörper gegen die TAP-Domäne eingesetzt. So konnte in dieser Western-Blot-Analyse neben dem Fusionsprotein auch die TAP-Domäne allein nachgewiesen werden (Abb. 3.12 B). Durch den ersten Aufreinigungsschritt der TAP-Aufreinigungsmethode lässt sich also nicht nur das Polyduktin-TAP-Fusionsprotein isolieren, sondern auch die TAP-Domäne allein. So ist es möglich, bei der folgenden Analyse der Proteinkomplexe zwischen Proteinen, die an den C-Terminus von Polyduktin binden und solchen, die nur an die TAP-Domäne binden, zu unterscheiden.

Damit eine Analyse der Proteinkomplexe durch 2D-Gelelektrophorese möglich war, mussten die Eluate zuvor von in Puffern enthaltenen Salzen befreit werden. Zu diesem Zweck wurden Entsalzungssäulen der Firma GE-Healthcare verwendet. Die im Eluat befindlichen Proteine wurden anschließend durch Aceton gefällt.

### **2.3 2D-Elektrophorese zur Analyse der aufgereinigten Proteinkomplexe**

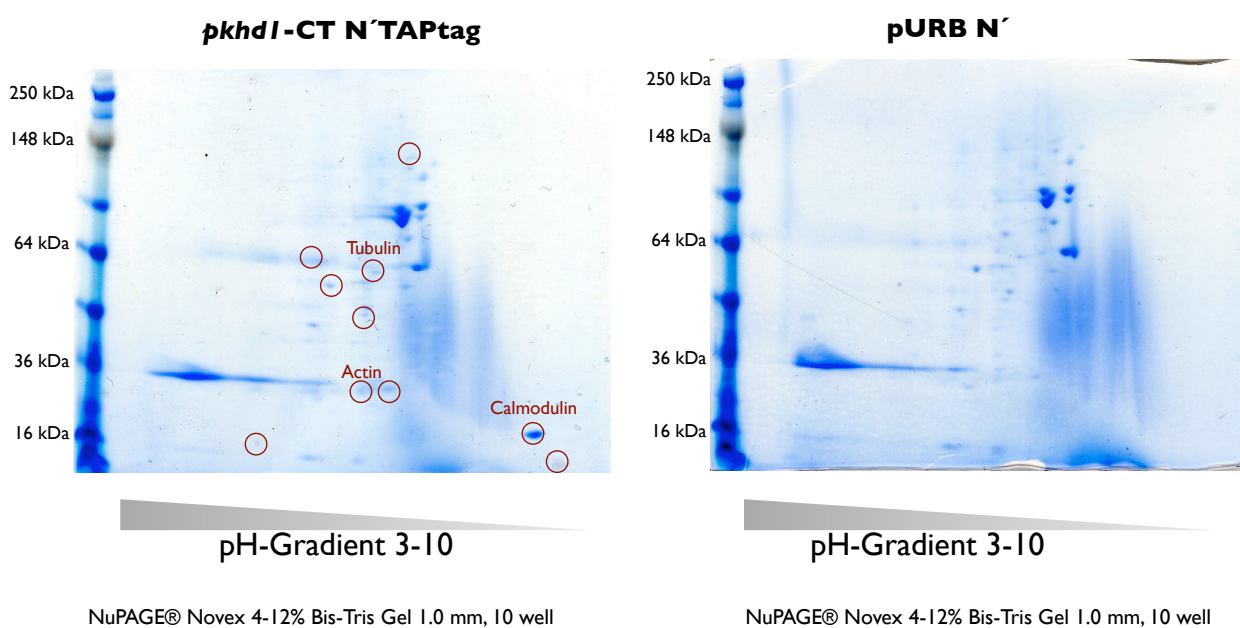
Die elektrophoretische Auftrennung der isolierten Proteinkomplexe erfolgte unter Verwendung des 2D-Elektrophoresesystems ZOOM®-System. Die gefällten Proteine wurden in Solubilisierungspuffer aufgenommen und die Ampholytstreifen für die isoelektrische Fokussierung der Proteine durch diesen Solubilisierungspuffer über Nacht rehydratisiert. Für die 2D-Elektrophorese wurden 280 µg Protein eingesetzt, was einem Prozent der anfangs eingesetzten Proteinmenge entspricht (siehe Abbildung 3.11). Anschließend wurde die isoelektrische Fokussierung der Proteine (1.Dimension) und die Auftrennung nach ihrer Größe (2.Dimension) durchgeführt. Die Gele wurden mit SimplyBlue™ SafeStain gefärbt um die isolierten Proteine im Gel sichtbar zu machen. Die Verwendung von SimplyBlue™ SafeStain erlaubt im Gegensatz zu herkömmlichen Coomassie-Färbelösungen die massenspektrometrische Bestimmung der Proteine anschließend an die Gelelektrophorese.

Wie bereits erwähnt wurden nicht nur die Proteinkomplexe, die mit dem Polyduktin-TAP-Fusionsprotein isoliert wurden, für die Gelanalyse verwendet, sondern auch die Kontrolle, die durch den Einsatz der TAP-Domäne allein entstand.

Die beiden Gele wurden miteinander verglichen um Spots zu identifizieren, die im Gel für das Fusionsprotein auftauchen, aber nicht im Kontrollgel. Solche Spots wurden mithilfe einer Pipettenspitze ausgestochen und bis zu ihrer weiteren Analyse bei -80°C

aufbewahrt. Es wurden 10 verschiedene Proteinspots isoliert, von denen in dreien genug Protein für eine massenspektrometrische Bestimmung enthalten war.

Abbildung 3.13 zeigt, welche Spots ausgewählt wurden und für die massenspektrometrische Bestimmung eingesetzt wurden. Während neun der ausgeschnittenen Spots schwach sichtbar waren, ist ein Spot bei einer Größe von 16 kDa im sauren pH-Bereich besonders auffällig.



### Abb. 3.13 2D-Gele zur Analyse der Proteinkomplexe

Die isolierten Proteinkomplexe wurden in 2D-Gelelektrophoretisch entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Größe aufgetrennt. Das linke Gel zeigt die Proteine, die mit dem Fusionsprotein isoliert wurden, das rechte zeigt das Kontrollgel. Die beiden Gele unterscheiden sich in zehn verschiedenen Spots, wobei ein Spot bei 16 kDa und einem sauren pH-Wert besonders stark vertreten ist.

Die massenspektrometrische Analyse führte zur Identifikation von drei verschiedenen Proteinen, die in Abbildung 3.13 angegeben sind. Bei der Probe, die bei einer Größe von ca. 35 kDa isoliert wurde handelt es sich um Aktin, während es sich bei der Probe, die auf der Höhe von ca. 62 kDa lief, um  $\beta$ -Tubulin handelt. Das im sauren Bereich des fokussierte Protein von ca. 16 kDa konnte als Calmodulin (**calcium modulated protein**) identifiziert werden.

Die Identität der anderen Proteine konnte nicht bestimmt werden, da sie für eine massenspektrometrische Analyse in zu geringen Mengen vorlagen.

---

In den folgenden Experimenten wurde nur die Interaktion zwischen Polyduktin und Calmodulin näher analysiert, da dieses Protein im Kontext einer Kalzium-abhängigen Signaltransduktion am interessantesten erschien.

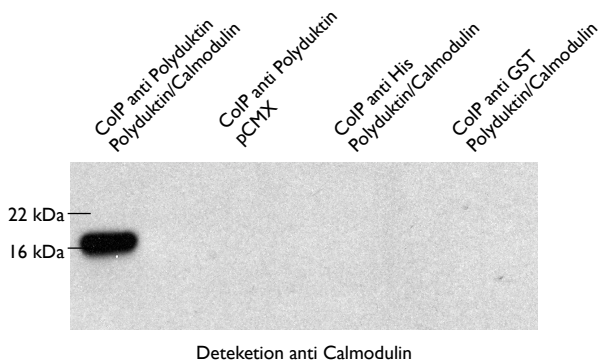
## 2.4 Koimmunopräzipitation von Polyduktin und Calmodulin

Um die Interaktion von Polyduktin und Calmodulin durch weitere molekularbiologische Methoden zu bestätigen, musste die cDNS, die für den murinen Polyduktin C-Terminus kodiert, zunächst in den pCMX-Vektor kloniert werden. Dies war nötig, um ausschließen zu können, dass es zu einer Interaktion zwischen der TAP-Domäne und Calmodulin kommt.

Zu diesem Zweck wurden durch eine PCR-Reaktion unter Verwendung der Oligonukleotide „KpnI-Kozak“ und „BamHI rev“ die benötigten Restriktionsstellen sowie eine Kozak-Sequenz an die Nukleotide 11.625 bis 12.180 der *pkhd1*-cDNS angefügt. Das so entstandene PCR-Fragment wurde in den pCMX-Vektor eingesetzt und sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass es durch die PCR-Reaktion nicht zu einer Veränderung der Nukleotidabfolge kam.

Das generierte Polyduktin-CT-Expressionsplasmid, sowie ein kommerziell erworbenes Calmodulin-Expressionsplasmid wurden genutzt um Kotransfektionen von HEK293T-Zellen durchzuführen. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt.

Für die Koimmunopräzipitation wurde das Dynabeads-System genutzt, das auf einer magnetischen Separation von einzelnen Antikörpergebundenen Proteinen beruht. Zunächst wurden 5 µg des anti Fibrocystin/Polyduktin Antikörpers an 50 µl ProtA-Magnetpartikel gekoppelt und anschließend mit 100 µg der Proteinextrakte aus den kotransfizierten Zellen, sowie zur Kontrolle mit Proteinextrakten aus pCMX transfizierten Zellen inkubiert. Um ausschließen zu können, dass es zu einer unspezifischen Bindung der Proteine an den Antikörper kommt, wurden zwei weitere Kontrollen durchgeführt, indem die unspezifischen Antikörper anti GST und anti His an die Magnetpartikel gekoppelt wurden und ebenfalls mit den Proteinextrakten aus den kotransfizierten Zellen inkubiert wurden.



**Abb. 3.14 Western-Blot Analyse der Koimmunopräzipitation von Polyduktin und Calmodulin**

Für die Koimmunopräzipitation von Polyduktin und Calmodulin wurde der anti Fibrocystin Antikörper gegen den humanen Polyduktin C-Terminus eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Proteinextrakt aus HEK293T-Zellen eingesetzt, die mit dem leeren pCMX-Vektor transfiziert wurden. Außerdem wurden zwei Kontrollen mit unspezifischen Antikörpern (anti His und anti GST) durchgeführt. Die Detektion im Western-Blot erfolgte mit einem anti Calmodulin Antikörper. Nur in der Spur, in der Proteinextrakte aus Polyduktin-CT und Calmodulin kotransfiziert wurden und die CoIP mit dem anti Fibrocystin Antikörper durchgeführt wurde, konnte eine Bande von 16 kDa detektiert werden.

Die isolierten Proteine wurden in einem PAA-Gel aufgetrennt und eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung des anti Calmodulin-Antikörpers durchgeführt (Abbildung 3.14). Nur in der Spur, in der der Proteinextrakt aus den kotransfizierten Zellen mit anschließender Inkubation mit dem anti Fibrocystin/Polyduktin Antikörper aufgetragen wurden, konnte eine Bande von 16 kDa detektiert werden, die Calmodulin entspricht.

Dieses Experiment zeigt, dass es zu einer Interaktion zwischen dem Polyduktin-C-Terminus und Calmodulin kommt. Die durch die TAP-Aufreinigung festgestellte Interaktion zwischen den beiden Proteinen ist demnach nicht auf die TAP-Domäne zurückzuführen.

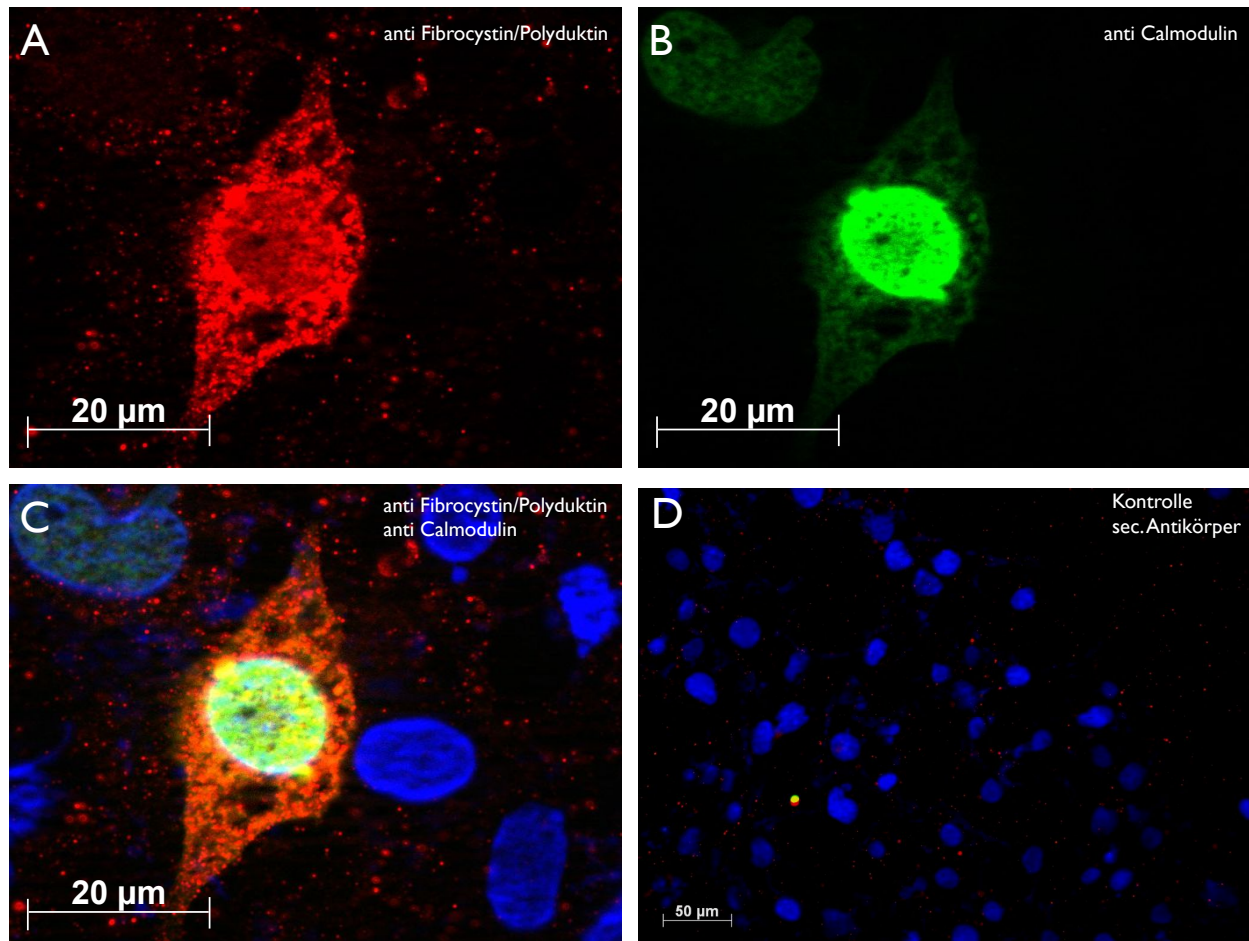
## 2.5 Immunfluoreszenzen in Cos7-Zellen

Um festzustellen in welchem Kompartiment der Zelle es zu einer räumlichen Kollokalisierung von Polyduktin und Calmodulin kommt, wurden Cos7-Zellen mit dem Polyduktin-CT- und dem Calmodulin-Expressionsplasmid kotransfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen fixiert und Immunfluoreszenzen unter Verwendung der Antikörper gegen Polyduktin und Calmodulin durchgeführt (Abbildung 3.15). Die Überlagerung der beiden Signale zeigte, dass es zu einer Lokalisation der beiden Proteine im Zytoplasma, im Zellkern und an den Zentrosomen kommt (Abbildung 3.15 C).

Die durchgeführten Experimente zur Kollokalisierung von Polyduktin und Calmodulin zeigen, dass es auch ohne die TAP-Domäne zu einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommt und dass sie sich im gleichen Kompartiment der Zellen befinden. Die Interaktion ist



also nicht auf eine artifizielle Bindung von Calmodulin an die TAP-Domäne zurückzuführen.



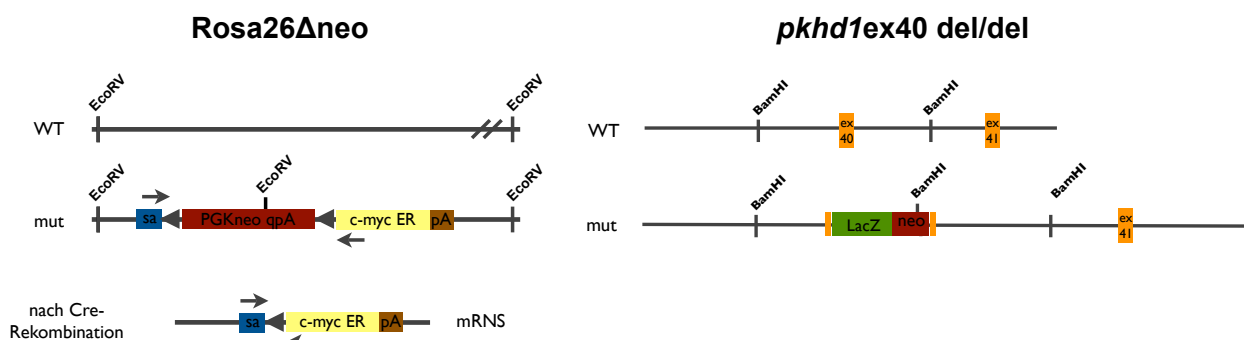
**Abb.3.15: Immunfluoreszenzen von Cos7-Zellen transfiziert mit *pkhd1*-CT und *Calm*-cDNS**

(A), (B) und (C) zeigen Apotom-Aufnahmen von Cos7-Zellen, die transient mit *pkhd1*-CT und *Calm*-cDNS transfiziert wurden. A zeigt das Signal für Polyduktin (rot), während B die Färbung von Calmodulin zeigt (grün). C zeigt eine digitale Überlagerung der beiden Signale. Primärantikörper: Goat anti Fibrocystin (SantaCruz) und Mouse anti Calmodulin (Sigma), Sekundärantikörper: Alexa 488 anti mouse und Alexa 594 anti goat. (D) Als Kontrolle wurden Cos7-Zellen mit transfiziert und nur mit den sekundären Antikörpern behandelt. Der Größenbalken entspricht 20 µm bzw 50 µm. DAPI-Kernfärbung blau.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen die TAP-Aufreinigungsmethode zur Isolation von Interaktionspartnern des Polyduktin C-Terminus zu etablieren und Calmodulin,  $\beta$ -Tubulin und Aktin als Interaktionspartner zu identifizieren. Darüber hinaus konnten weitere potentielle Interaktionspartner isoliert werden, deren Menge für eine massenspektrometrische Identifikation nicht ausreichend waren. Dies zeigt jedoch, dass die TAP-Methode geeignet ist, um Interaktionspartner von Polyduktin zu isolieren.

### 3. *Pkhd1*ex40 del/del Rosa26Δneo myc/myc-Mäuse

1992 konnte von Harding et al. gezeigt werden, dass es in den zystischen Erweiterungen der Nierentubuli der *cpk*-Maus zu einer veränderten Expression von *c-myc* kommt. Um den Zusammenhang zwischen Polyduktin und C-Myc näher zu untersuchen, wurden doppeltransgene Mäuse aus der Polyduktin defizienten *pkhd1*ex40 del/del-Maus (Moser et al, 2005) und der *c-myc* überexprimierenden RosaΔneo-Maus (Jäger et al., 2004) hergestellt.



**Abb 3.16 Schematische Darstellung des Rosa26- und des *pkhd1*-Lokus**

Zur Erstellung der Rosa26Δneo-Maus wurde die *c-myc*-cDNS (gelb), sowie eine PGKneo-Kassette (rot) in den Rosa26-Lokus inseriert. Nach Cre-Rekombination wird die Selektionskassette deletiert und es kommt zur Expression von *c-myc*. Um Exon 40 des *pkhd1*-Gens zu zerstören und gleichzeitig Aufschluss über die Expression von *pkhd1* zu erhalten, wurden neben einer neo-Resistenz (rot) auch eine LacZ-Kassette (grün) in Exon 40 (orange) eingefügt.

Für die anstehenden Versuche wurden zunächst Rosa26mut-Mäuse (myc-cDNS und PGKneo-Kassette im Rosa26-Lokus) mit Sox2-Cre Mäusen verpaart. Da bei diesen Mäusen Cre bereits ab Tag 6,5 der Embryogenese ubiquitär exprimiert wird, kommt es bereits im frühen Embryo in allen Geweben zur Cre-Rekombination. Dies hat zur Folge, dass in den nachfolgenden Generationen die PGKneo-Kassette aus dem Rosa26-Lokus deletiert wird und es zu einer Expression der c-Myc cDNS kommt. Diese Rosa26Δneo-Mäuse werden im Folgenden als Rosa26Δneo myc/myc bezeichnet.

Im nächsten Schritt wurden Rosa26Δneo myc/+ Mäuse (heterozygot) mit *pkhd1*ex40 del/del Mäusen gekreuzt. Für diese Verpaarung konnten keine Rosa26Δneo myc/myc (homozygot) eingesetzt werden, da diese infertil sind (persönliche Mitteilung Dr. R. Jäger). Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden *pkhd1*ex40 del/+ Rosa26Δneo myc/+ wurden anschließend untereinander verpaart, um *pkhd1*ex40 del/del Rosa26Δneo myc/myc

doppelt transgene Mäuse zu erhalten. Die unterschiedlichen Genotypen traten in der nach Mendel erwarteten Häufigkeit auf.

Für die Aktivierung des c-Myc wurden die Tiere im Alter von vier Wochen mit Tamoxifen behandelt. Hierzu wurde über fünf Tage täglich 1 µg Tamoxifen in 100 µl Erdnussöl intra-peritoneal injiziert. Am nachfolgenden Tag wurden die behandelten Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und Leber, Niere, Pankreas, Herz, Milz, Dünndarm und Hoden entnommen, da in diesen Organen eine Expression von *pkhd1* nachgewiesen werden konnte (Nagasawa et al., 2002). Organe, die für Gewebeschnitte genutzt werden sollten, wurden sofort in 4%iges PFA in PBS überführt, oder für Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Außerdem wurden Proben für RNS und Protein-Präparationen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Um sicher zu stellen, dass Veränderungen des Phänotyps der doppeltransgenen Mäuse nicht auf das verabreichte Erdnussöl zurückzuführen sind, wurde einer Kontrollgruppe von Mäusen über fünf Tage 100 µl Erdnussöl ohne Tamoxifen injiziert.

Alle Mäuse erschienen bis zu diesem Zeitpunkt gesund und verhielten sich unauffällig. Auch die Organe zeigten keine makroskopisch sichtbaren Auffälligkeiten.

Um das Rosa26Δneo myc/myc-Transgen nicht nur auf genomischer Ebene, sondern auch seine Expression nachzuweisen, wurde eine RT-PCR-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde RNS mittels des TriZOL Reagenzes aus den Lebern von Mäusen mit den vier untersuchten Genotypen isoliert. Die RNS wurde in cDNS umgeschrieben und anschließend eine PCR durchgeführt. Um das transgene humane C-Myc von endogenem C-Myc unterscheiden zu können, wurden für die PCR Oligonukleotide eingesetzt von denen das eine in der Östrogenrezeptor- und das andere in der Myc-Region der cDNS bindet.



**Abb. 3.17 RT-PCR zum Nachweis der Expression des Rosa26Δneo myc/myc-Transgens**

Die RT-PCR ergab für die Leber aus Mäusen, die das Rosa26Δneo myc/myc-Transgen homozygot tragen die erwartete Bande von 150 bp. Diese Bande konnte in WT- und *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen nicht detektiert werden. Auch die Kontrolle (H<sub>2</sub>O) zeigte keine Bande

### 3.1 Immunhistochemische Untersuchungen von *pkhd1ex40 del/del*

#### **Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc-Mäusen**

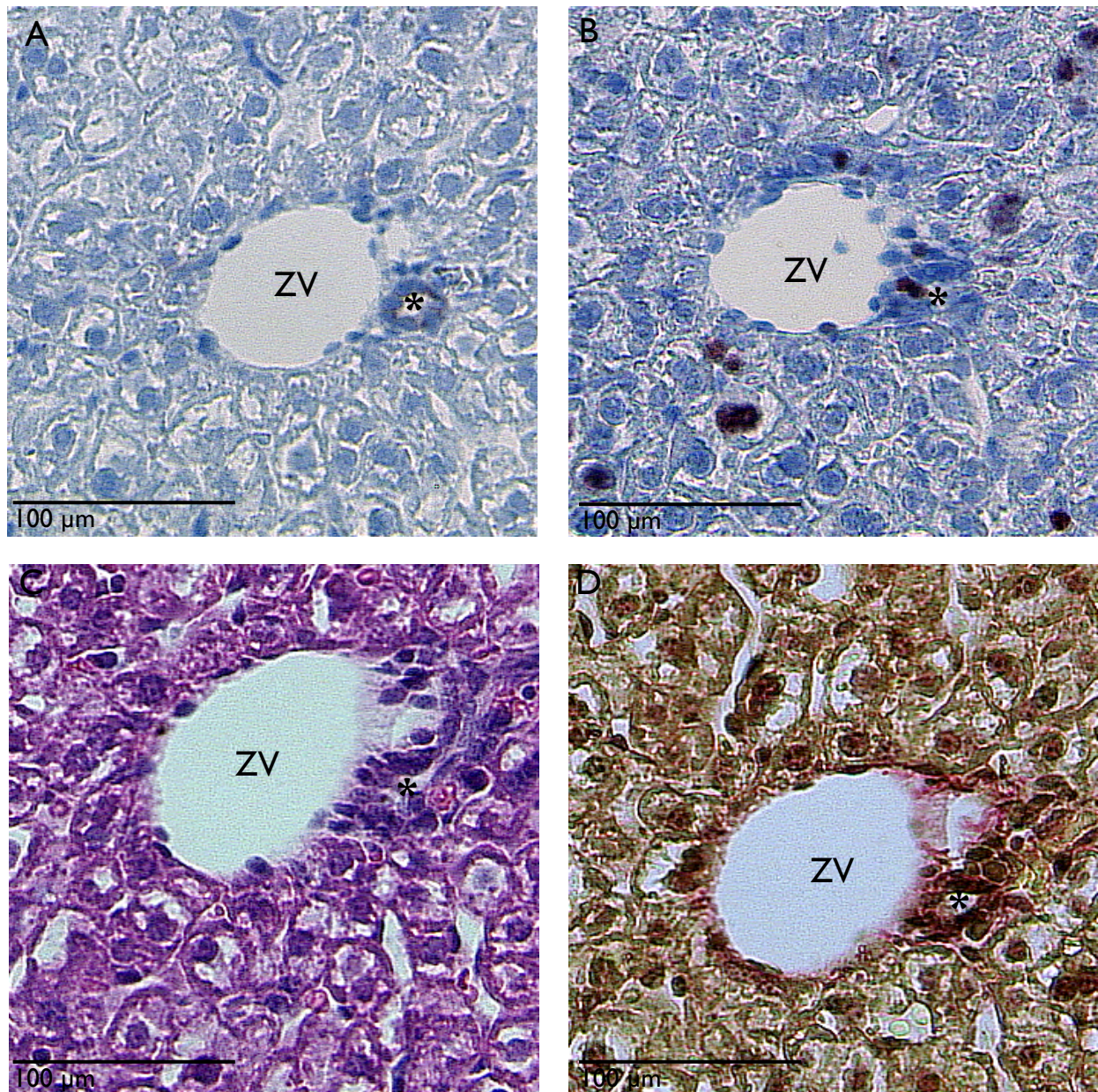
Von den entnommenen Organen wurden histologische Schnitte angefertigt und verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. In Niere, Pankreas, Herz, Milz, Dünndarm und Hoden konnten keine morphologischen Veränderungen festgestellt werden.

H&E-Färbungen der Leberschnitte zeigten, dass es sowohl in den *pkhd1ex40 del/del*- als auch in den *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*- Mäusen zu einer Fehlentwicklung des intrahepatischen Gallengangssystems kommt. Um die Gallengänge eindeutig identifizieren zu können, wurden Gewebeschnitte mit einem pan-Keratin-Antikörper gefärbt. Die Färbung zeigte, dass es nicht nur zu einer Erweiterung der intrahepatischen Gallengänge kommt, sondern auch zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl der Gallengänge in einem Periportalfeld. In den *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen kommt es im Vergleich zu den *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen zu einer stärkeren Erweiterung der Gallengänge, wie Abbildungen 3.20 und 3.21 zu entnehmen ist. *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäuse hingegen zeigten keine vom WT-abweichende Veränderung der Periportalfelder (Abb. 3.18 und 3.19).

Sirius-Färbungen der Leberschnitte zeigten, dass es in den *pkhd1ex40 del/del*- und den *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen außerdem zu einer periportal Fibrose kommt. Auch diese tritt in den doppeltransgenen Mäusen verstärkt auf (Abb. 3.20 D und 3.21 D), während in den *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen keine Fibrose zu beobachten ist (Abb. 3.19 D).

Um festzustellen, ob es zu einem veränderten Proliferationsverhalten in den Lebern der verschiedenen Mäuse kommt, wurden Ki67-Färbungen durchgeführt. In den Lebern von WT- und *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen konnten in keinem der angeschnittenen Gallengänge proliferierende Zellen identifiziert werden (exemplarisch Abb. 3.18 B und 3.219 B). Auch die Cholangiozyten der *pkhd1ex40 del/del*-Mäuse (Abb. 3.20 B) zeigten nur wenig Proliferation, während es in den *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen zu einer starken Proliferation der Cholangiozyten kommt (Abb. 3.21 B).

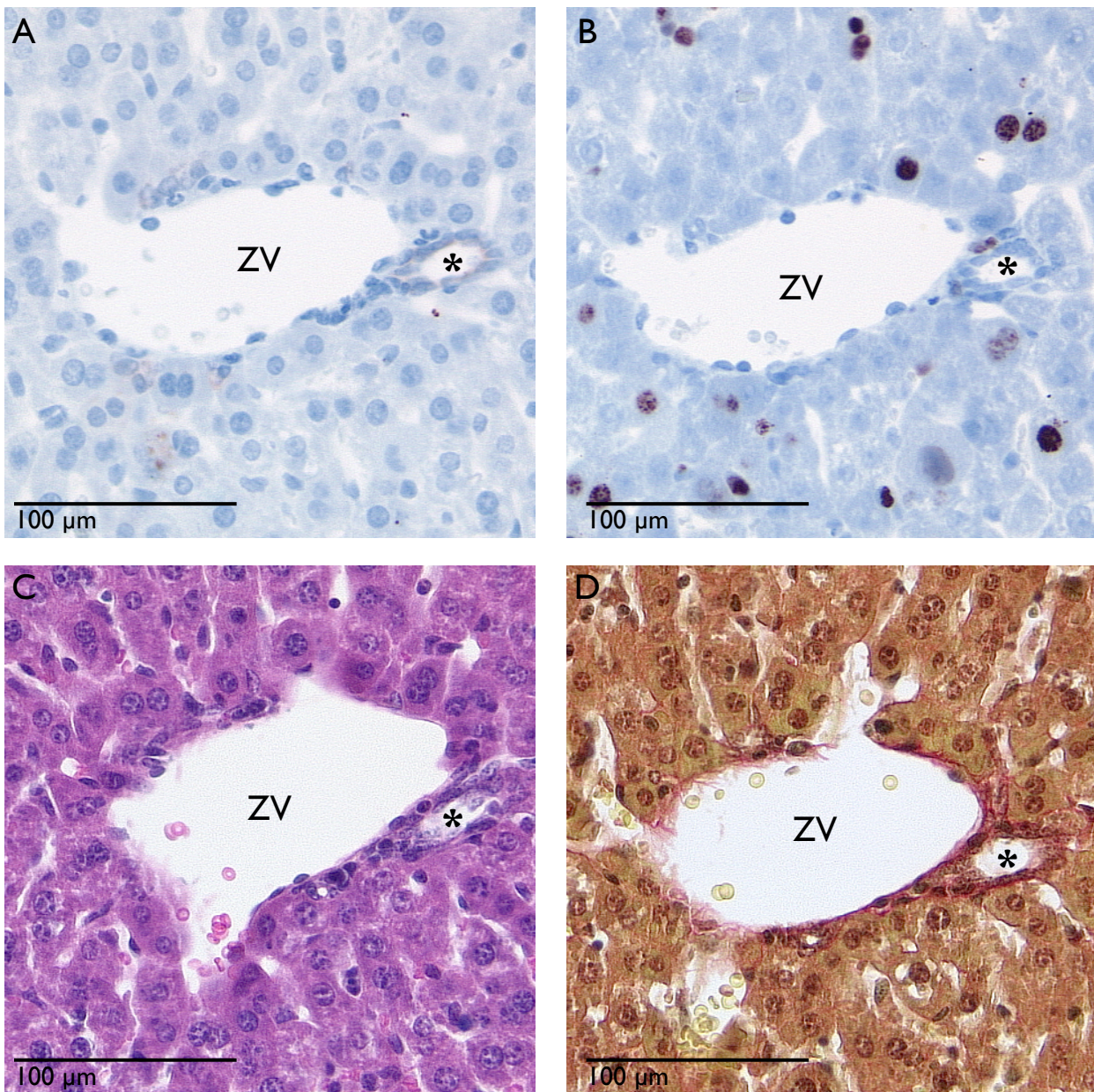




**Abb. 3.18: Serienschnitte der Leber von WT-Mäusen**

In jedem periportalen Feld findet sich eine Zentralvene begleitet von einem Gallengang (A). Die Cholangiozyten zeigen keinerlei Proliferation (B). (A) pan-Keratin-Antikörper-Färbung (B) Ki67-Färbung (C) H&E-Färbung (D) Sirius-Färbung, ZV Zentralvene, \* Gallengang. Der Größenbalken entspricht 100µm.

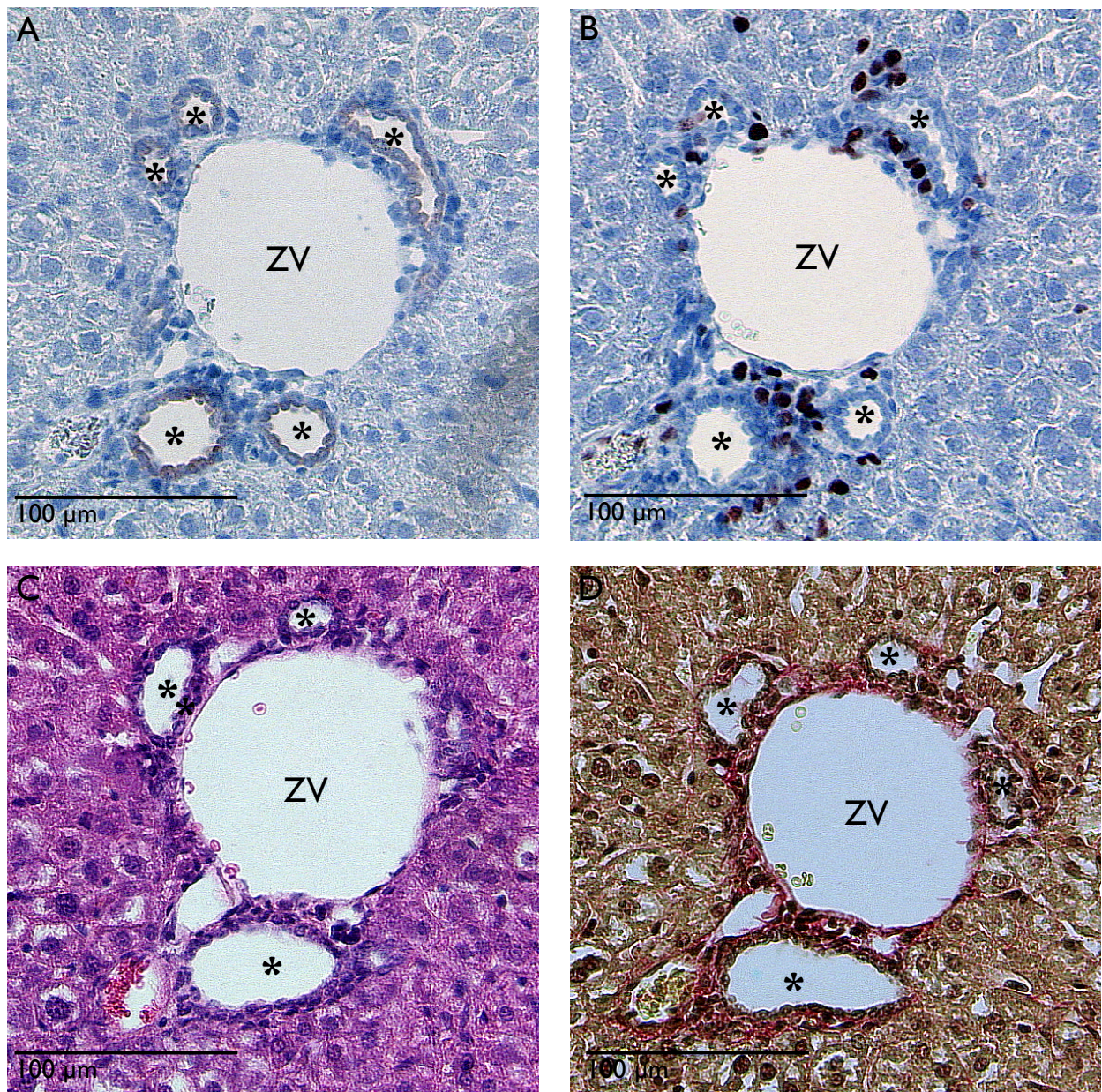




**Abb. 3.19: Serienschritte der Leber von *Rosa26Δneo myc/myc*-Mäusen**

Serienschritte der Leber einer *Rosa26Δneo myc/myc*-Maus. Die Schnitte zeigen keinerlei morphologische Auffälligkeiten (A) pan-Keratin-Antikörper-Färbung (B) Ki67-Färbung (C) H&E-Färbung (D) Sirius-Färbung, ZV Zentralvene, \* Gallengang. Der Größenbalken entspricht 100μm.

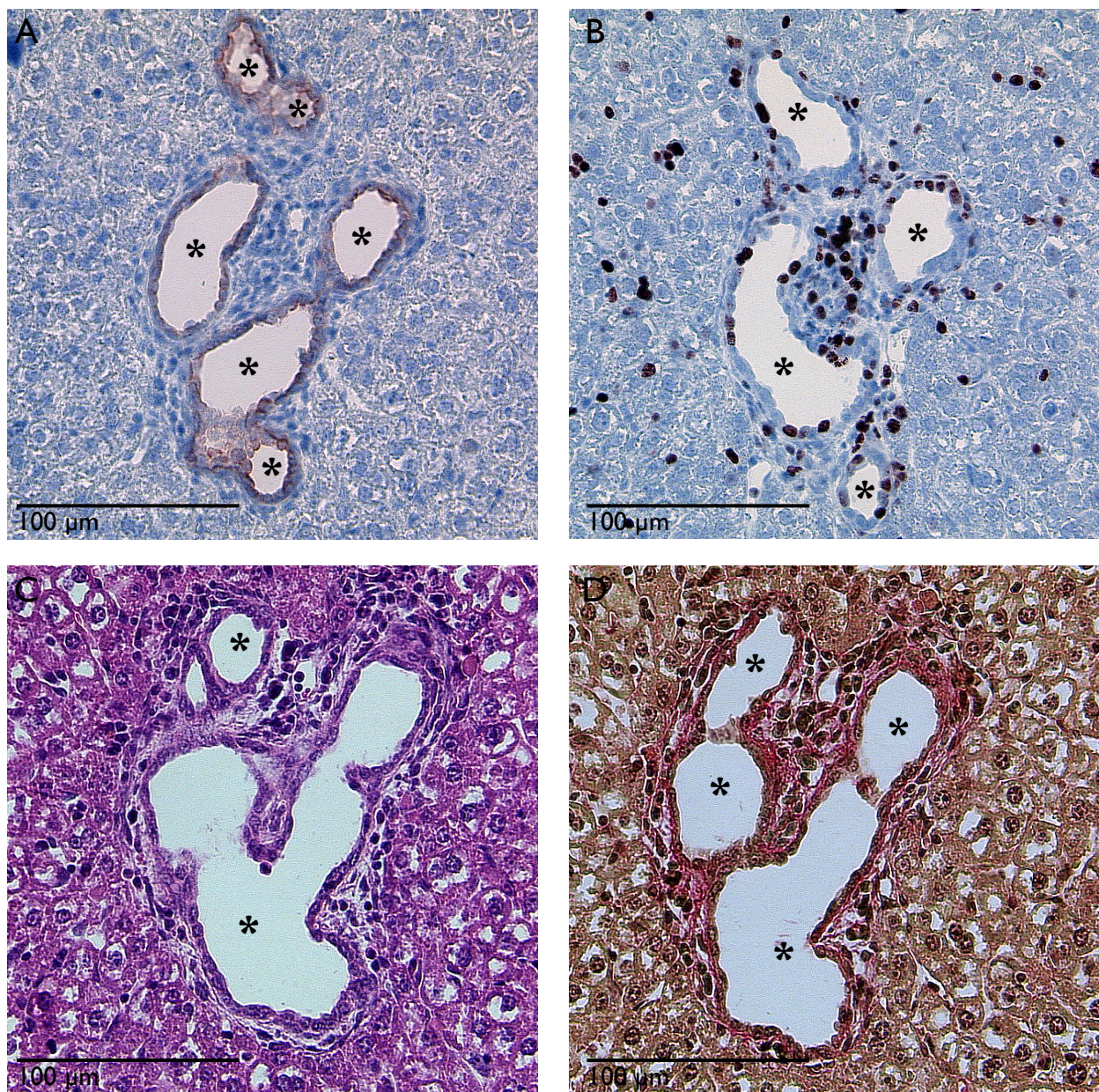




**Abb. 3.20: Serienschritte der Leber von *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen**

Die Zentralvene ist von einer erhöhten Anzahl von erweiterten Gallengängen umgeben (A), deren Cholangiozyten jedoch keine Proliferation zeigen (B). Innerhalb des Periportalfeldes kommt es zur Fibrose (D). (A) pan-Keratin-Antikörper-Färbung (B) Ki67-Färbung (C) H&E-Färbung (D) Sirius-Färbung, ZV Zentralvene, \* Gallengang. Der Größenbalken entspricht 100µm.



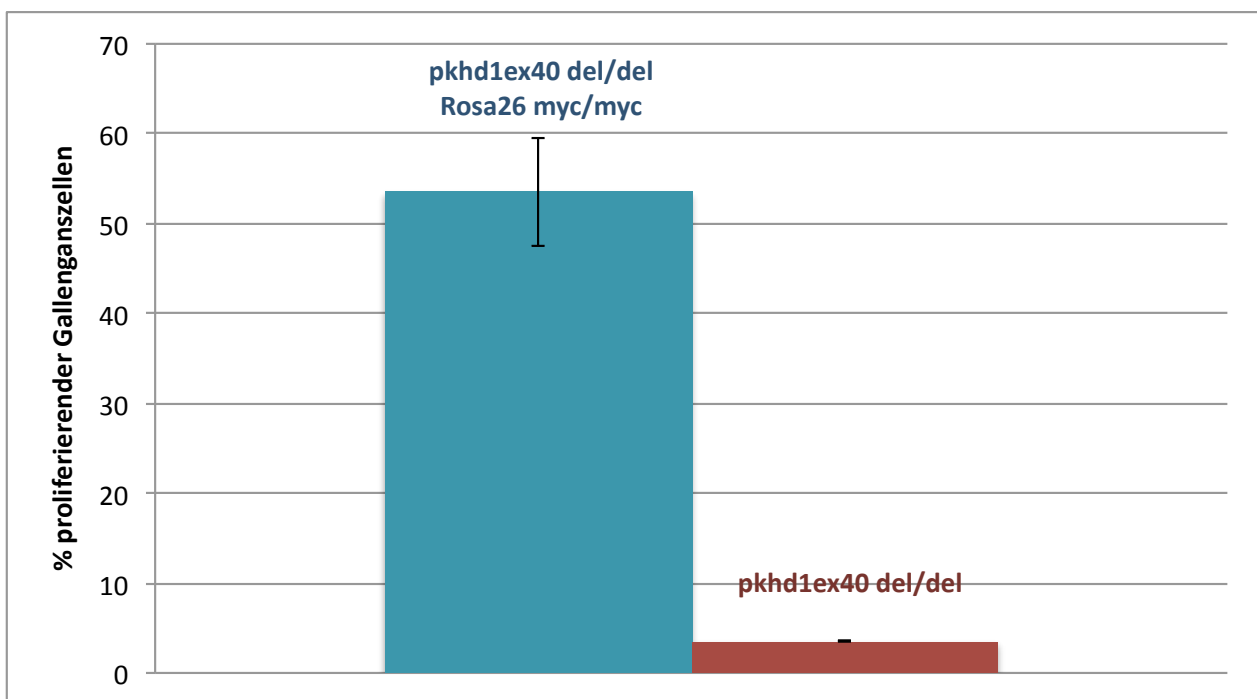


**Abb. 3.21: Serienschritte der Leber von *pkhd1ex40 del/del Rosa26Δneo myc/myc*-Mäusen**

Innerhalb des periportalen Feldes befinden sich mehrere stark delatierte Gallengänge (A). Im Gegensatz zu den *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen kann eine große Zahl proliferierender Cholangiozyten detektiert werden (B). Es tritt verstärkt eine Portalfeldfibrose auf (D). (A) pan-Keratin-Antikörper-Färbung (B) Ki67-Färbung (C) H&E-Färbung (D) Sirius-Färbung, ZV Zentralvene, \* Gallengang. Der Größenbalken entspricht 100 μm.



Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden die proliferierenden Cholangiozyten von jeweils 20 Gallengänge von fünf *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen und fünf *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen gezählt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.22 graphisch dargestellt. Während in *pkhd1ex40 del/de*-Mäusen nur ca. 4% der Cholangiozyten proliferieren, sind es in den doppeltransgenen Mäusen ca. 53%. Es kommt also zu einer signifikanten Vermehrung von Cholangiozyten, die mitotisch aktiv sind.



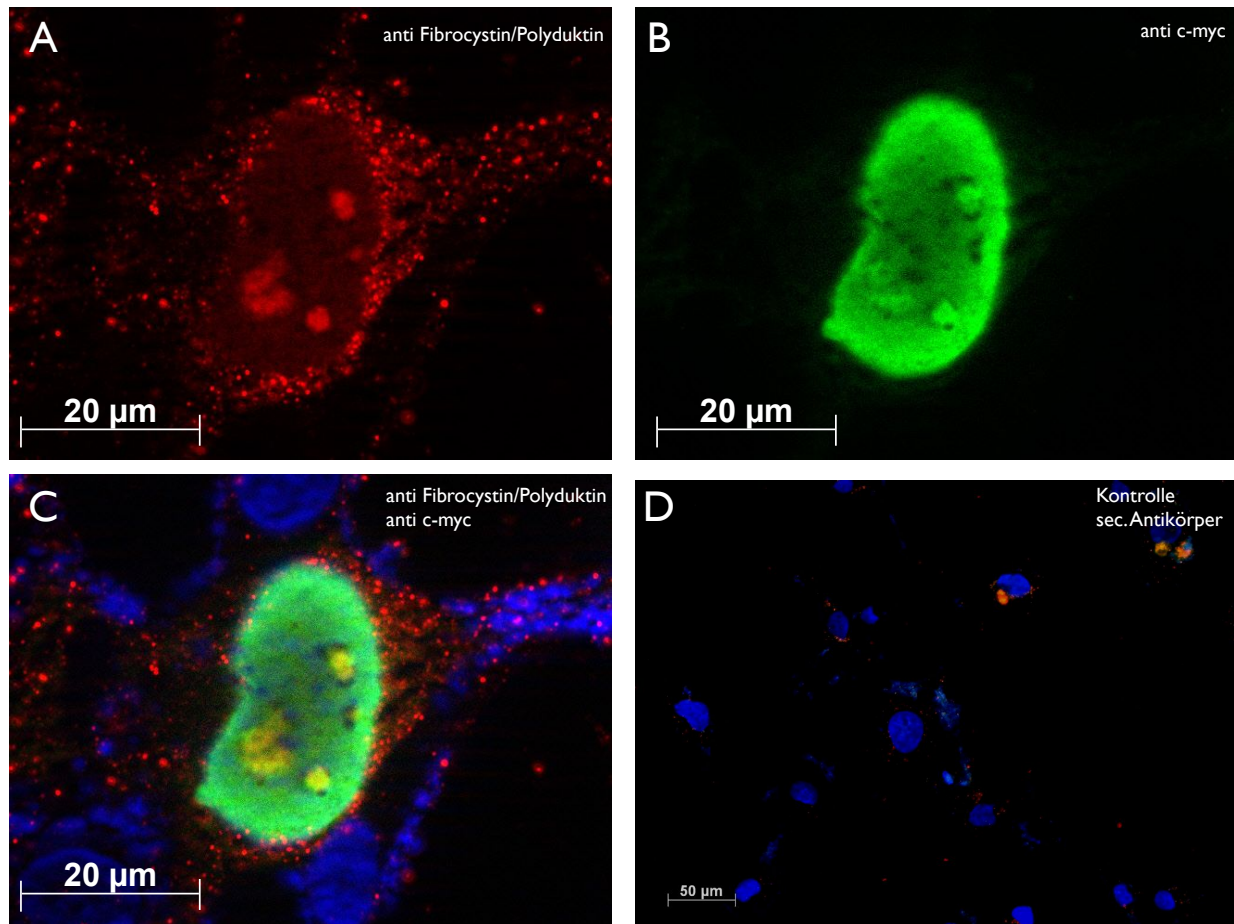
**Abbildung 3.22 Graphische Darstellung der erhöhten Proliferationsrate in den Gallengängen von *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen**

Der blaue Balken gibt die Zahl der mitotisch aktiven Cholangiozyten im Verhältnis zu den inaktiven Cholangiozyten in *pkhd1ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen an. In diesen Mäusen befinden sich ca. 54 % der Gallengangszellen in der Zellteilung. Im Vergleich dazu sind es in *pkhd1ex40 del/del*-Mäusen nur ca. 4 % der Cholangiozyten die proliferieren (roter Balken). Weder in WT noch in *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen konnten proliferierende Gallengangszellen beobachtet werden.

### 3.2 Kolokalisation von Polyduktin und C-Myc

Um zu überprüfen, ob es zu einer direkten Interaktion zwischen Polyduktin und c-myc kommt, wurden Immunfluoreszenzexperimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Cos7-Zellen mit der für den Polyduktin-C-Terminus kodierenden cDNS und der myc-cDNS kotransfiziert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Polyduktin und c-myc durchgeführt. Die digitale

Überlagerung der beiden Signale zeigte, dass es zu einer Kolokalisation der beiden Proteine in den Nukleoli des Zellkerns kommt (Abbildung 3.23).



**Abb.3.23: Immunfluoreszenzen von Cos7-Zellen transfiziert mit *pkhd1*-CT und *c-myc***  
 (A), (B) und (C) zeigen Apotom-Aufnahmen von Cos7-Zellen, die transfiziert mit *pkhd1*-CT und *c-myc*-cDNS transfiziert wurden. A zeigt das Signal für Polyduktin (rot), während B die Färbung von *c-myc* zeigt (grün). C zeigt eine digitale Überlagerung der beiden Signale. Primärantikörper: Goat anti Fibrocystin (SantaCruz) und Mouse anti *c-myc* (biomol), Sekundärantikörper: Alexa 488 anti mouse und Alexa 594 anti goat. (D) Als Kontrolle wurden Cos7-Zellen mit transfiziert und nur mit den sekundären Antikörpern behandelt. Der Größenbalken entspricht 20 µm bzw 50 µm. DAPI-Kernfärbung blau.

Sowohl für C-Myc als auch für Polyduktin ist eine Lokalisation in den Nukleoli bekannt (Arabi et al., 2002; Welcker et al., 2004, Hiesberger et al., 2006). In den Nukleoli findet nicht nur die Biogenese der Ribosomen statt, sondern viele hier lokalisierte Proteine sind, wie C-Myc, an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. So könnte die Lokalisation des Polyduktin C-Terminus einen ersten Hinweis auf seine Funktion geben.

---

## IV. Diskussion

### 1. Klonierung der murinen *pkhd1*cDNS

Um weitere Experimente zur Analyse der Funktion von Polyduktin und Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern zu ermöglichen, war es nötig die gesamte für das murine Polyduktin kodierende cDNS zu isolieren und in ein eukaryotisches Expressionsplasmid zu klonieren. Da die gesamte *pkhd1*cDNS 12,2 kb umfasst, war es, bedingt durch die Syntheseleistung der reversen Transkriptase und DNS-Polymerase, nicht möglich das Gesamttranskript zu amplifizieren. Aus diesem Grund wurden drei an singulären Restriktionsstellen überlappende Fragmente amplifiziert, die in einem weiteren Schritt ligiert wurden, so dass nun das Gesamttranskript in dem eukaryotischen Expressionsplasmid pCMX unter Kontrolle des CMV-Promotors vorliegt (Abbildung 3.1).

Die Sequenzanalyse von Strang und Gegenstrang und ein anschließender Sequenzvergleich mit der publizierten Sequenz ( Zhang et al., 2004) zeigte, dass durch die Amplifikation der cDNS durch die Polymerasekettenreaktion keine Mutationen in den kodierenden Bereich der *pkhd1*cDNS eingeführt wurden, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription oder zu einer Verschiebung des Leserahmens führten. Außerdem wurden keine Mutationen gefunden, die laut Strukturvorhersage funktionelle Domänen betreffen oder die Struktur des Proteins verändern könnten. Dies konnte auch durch eine *in vitro* Translation unter Verwendung von radioaktivem <sup>35</sup>S-Methionin gezeigt werden (Abbildung 3.2A). Die publizierte Sequenz der *pkhd1*cDNS beruht auf der Aneinanderreihung kleinerer cDNS-Segmente. Die Isolierung und Klonierung der vollständigen murinen *pkhd1*cDNS ist erstmals im Rahmen dieser Arbeit gelungen.

Um zu zeigen, dass es auch *in vivo* zur Translation von Polyduktin kommt, wurden NIH 3T3-Zellen mit der *pkhd1*cDNS transfiziert. In Proteinextrakten aus den transfizierten Zellen konnte, unter Verwendung eines Antikörpers gegen den C-Terminus von humanem Polyduktin, das Gesamtprotein, das eine Größe von 460 kDa hat, nachgewiesen werden. Da sich der Antikörper gegen den C-Terminus des Proteins richtet, konnte so gezeigt werden, dass es sich tatsächlich um das Gesamtprotein handelt (Abbildung 3.2B). Außerdem wurde nachgewiesen, dass der verwendete Antikörper, der zwar gegen das humane Polyduktin gerichtet ist, auch die murine Variante des Proteins erkennt, obwohl die C-Termini des humanen und murinen Polyduktins nicht sehr stark konserviert sind.

---

In einem weiteren *in vivo* Experiment konnte gezeigt werden, dass es zur regelrechten Expression der *pkhd1*cDNS kommt. Hierzu wurden Cos7-Zellen mit der cDNS transfiziert und anschließend Immunfluoreszenzen unter Verwendung des SantaCruz Antikörpers gegen den C-Terminus von humanem Polyduktin durchgeführt. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass es nicht nur zur Expression der cDNS kommt, sondern dass das entstandene Protein entsprechend einem TypI-Membranprotein an der Plasmamembran lokalisiert ist (Abbildung 3.3B-D). Außerdem konnte Polyduktin in vesikulären Strukturen im Zytoplasma der Zellen nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen vesikulären Strukturen um Artefakte handelt, die in der Färbung begründet sind, wurde eine zweite cDNS kloniert. Diese kodiert für ein Fusionsprotein aus Polyduktin und C-terminal lokalisiertem eGFP. Die eGFP-Domäne wurde C-terminal an Polyduktin fusioniert, um sicherzustellen, dass nur das Gesamtprotein in der Zelle detektiert werden kann. Für dieses Experiment wurden Cos7-Zellen mit der eGFP-Fusions-cDNS transfiziert. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis. Auch hier kann Polyduktin sowohl an der Plasmamembran, wenn auch in geringerem Maße, als auch in vesikulären Strukturen im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Färbung der Vesikel ist nicht auf die Fusion mit eGFP zurückzuführen, die zu einer Fehllokalisierung des Fusionsproteins führen könnte. Dies konnte durch die vorhergehenden Experimente gezeigt werden, in denen es auch zu einer Färbung von vesikulären Strukturen im Zytoplasma kam. Darüber hinaus konnte durch eine Transfektion von Cos7-Zellen mit einem eGFP-Expressionsplasmid gezeigt werden, dass die Färbung auch nicht auf einen alternativen Translationsstartpunkt zurückzuführen ist, der für die Translation von eGFP allein sorgt. Die mit eGFP transfizierten Cos7-Zellen zeigen eine gleichmäßige Färbung im Zytoplasma und Kern der Zellen (Abbildung 3.5 B).

Um zu zeigen, in welchen Kompartimenten der Zelle Polyduktin lokalisiert ist, wurden Cos7-Zellen mit dem *pkhd1*cDNS eGFP-Fusionskonstrukt transfiziert und die Lysosomen mit einem lysosomenspezifischen Farbstoff gefärbt. Die Überlagerung von Lysosomenfärbung und *pkhd1*cDNS eGFP-Signals zeigt, dass es sich bei den betreffenden Kompartimenten um Lysosomen handelt (Abbildung 3.6).

Bei Lysosomen handelt es sich um ubiquitäre hydrolasehaltige Organellen, die das primäre degradative System der Zelle darstellen. Sie beziehen ihre Substrate durch Phagozytose, Endozytose oder Autophagie. Dabei sind sie nicht nur der Endpunkt degradativer Prozesse in der Zelle, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in

verschiedenen physiologischen Prozessen wie Pathogenabwehr, Apoptose und verschiedenen Signalwegen (Saffig und Klumperman, 2009).

Die Degradation von Membranproteinen erfolgt ebenfalls innerhalb der Lysosomen. Das Signal für die Degradation wird durch das Anheften von Ubiquitin an das Membranprotein gegeben. Dies führt zur Endozytose des Proteins und dem Transport über frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen, wo es zur Degradation kommt. Dieser Mechanismus konnte für verschiedene Zelloberflächenrezeptoren wie EGFR (**e**pidermal **g**rowth **f**actor **r**eceptor), PDGFR (**p**latelet-**d**erived **g**rowth **f**actor **r**eceptor) und IL1-R (interleukin **1** receptor) gezeigt werden (Piper und Luzio, 2007). Da es sich bei Polyduktin ebenfalls um ein integrales Membranprotein handelt, ist anzunehmen, dass die Degradation dieses Proteins ebenfalls über den beschriebenen Weg erfolgt. Die Überexpression von Polyduktin in den Cos7-Zellen, die kein endogenes Polyduktin exprimieren, könnte somit für eine schnelle Endozytose und Degradation des Proteins und dessen Lokalisation in den Lysosomen sorgen.

Denkbar ist auch, dass es durch die Überexpression von Polyduktin zur Fehlfaltung oder Aggregation der Proteine im Zytoplasma kommt. Während die meisten fehlgefalteten löslichen Proteine über das Proteasom abgebaut werden, werden Proteinaggregate aufgrund ihrer Unlöslichkeit in den meisten Fällen durch Autophagie abgebaut. Die Degradation von Proteinen über Autophagie wird auch dann bevorzugt, wenn das Proteasom überlastet ist, darüber hinaus sind Proteinaggregate für das Proteasom häufig toxisch (Ding und Yin, 2008). Beide Möglichkeiten sind für den Fall der Überexpression von Polyduktin in Cos7-Zellen denkbar und würden zu einer Lokalisation von Polyduktin in den Lysosomen führen.

Im Vergleich mit der Antikörperfärbung von Polyduktin in den transfizierten Cos7-Zellen (Abbildung 3.4), kann bei der Transfektion mit dem *pkhd1*cDNS eGFP-Fusionsplasmid nur ein sehr schwaches Signal an der Plasmamembran der Zelle detektiert werden. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass es durch die Fusion mit eGFP zu einer vermehrten Aggregation des Fusionsproteins in der Zelle kommt, wie es für eGFP und verwandte Proteine bekannt ist (Katayama et al., 2008). Dies würde dazu führen, dass es kaum zu einem Transport des Fusionsproteins zur Membran kommt, sondern das Polyduktin eGFP Aggregate durch Autophagie vorher abgebaut würden.

Die Tatsache, dass das eGFP-Signal in den Lysosomen der Zellen relativ schwach ist, ist in dem niedrigen pH-Wert (< pH 5) innerhalb der Lysosomen begründet (Katayama et al., 2008).

Durch Sequenz-, *in vitro* Translations- und Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit isolierte und klonierte *pkhd1*cDNS für das Polyduktin-Gesamtprotein kodiert, ohne dass es zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation durch ein, durch die PCR-Reaktion, eingefügtes Stopcodon oder zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt.

Den Zellkulturexperimenten zur Expression der *pkhd1*cDNS und des Fusionskonstrukts aus *pkhd1*cDNS und eGFP lässt sich entnehmen, dass es bei einer Überexpression des Proteins in der Zelle zu einer fehlerhaften Lokalisation kommt, die vermutlich auf eine Aggregation des Proteins im Zytoplasma zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Experimente nicht die cDNS, die für das Gesamtprotein kodiert verwendet, sondern nur der Teil, der für die zytoplasmatische Domäne kodiert. Dies ist besonders für die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern von Polyduktin von großer Wichtigkeit, da eine Fehllokalisierung des Proteins zwangsläufig zur Isolation von falsch-positiven Interaktionspartnern führen würde.

Mit der gesamten cDNS als Grundlage können in Transfektionsexperimenten einzelne der vorhergesagten Domänen und funktionellen Motive gezielt exprimiert werden, um molekulare Mechanismen oder Interaktionen mit anderen Proteinen aufzudecken. Des Weiteren sind funktionelle Tests zur Zell-Zelladhäsion oder Zell-Matrixadhäsion bzw. Interaktion eine interessante Strategie, die zu neuen Erkenntnissen die Funktion von Polyduktin betreffend, führen kann.

## **2. TAP-Strategie zur Identifikation von Interaktionspartnern von Polyduktin**

Das in ARPKD-Patienten mutierte *PKHD1*-Gen kodiert für das Protein Polyduktin. Strukturanalysen ergaben, dass es sich vermutlich um ein Typ I-Transmembranprotein handelt (Nagasawa et al., 2002; Onuchic et al., 2002). Über die Funktion des Proteins ist bislang wenig bekannt. Durch die Identifikation von potentiellen Interaktionspartnern

---

könnte Aufschluss über die Funktion und Signalwege gewonnen werden, durch die Polyduktin Einfluss auf eine regelrechte Entwicklung von Niere und Leber nimmt.

Bislang konnte durch einen Hefe-zwei-Hybrid-Ansatz nur ein potentieller Interaktionspartner von Polyduktin identifiziert werden. Bei CAML handelt es sich um ein Protein, dass in die Regulation des intrazellulären Kalziumreservoirs involviert ist. Die Interaktion von CAML und Polyduktin konnte bis jetzt nur *in vitro* nachgewiesen werden (Nagano et al., 2005). Die Verifizierung dieser Interaktion *in vivo* war bis heute nicht möglich.

Da sich die Isolierung potentieller Interaktionspartner von Membranproteinen mittels der Hefe-Zwei-Hybrid-Technologie aufgrund der Lokalisation als problematisch erweist und darüber hinaus vermehrt falsch positive Interaktionen auftreten, wurde in dieser Arbeit die TAP-Technologie angewandt. Sie erlaubt die Identifikation von Interaktionspartnern unter nahezu nativen Expressionsbedingungen in Säugerzellen, in einer für die Identifikation durch Massenspektrometrie ausreichenden Menge (Rigaut et al., 1999).

Der zytoplasmatische C-Terminus von Polyduktin enthält laut Strukturvorhersagen zwei Phosphorylierungsstellen und transloziert nach  $Ca^{2+}$ - bzw. Proteinkinase C-abhängiger proteolytischer Spaltung in den Nukleus (Ward et al., 2002; Hiesberger et al., 2006; Kaimori et al., 2007). Aus diesem Grund wurde für die TAP-Strategie der 185 Aminosäuren umfassende C-Terminus des murinen Polyduktin eingesetzt.

Der experimentelle Ansatz führte zur Identifikation von Aktin,  $\beta$ -Tubulin und Calmodulin als potentielle Interaktionspartner von Polyduktin. Aufgrund der Tatsache, dass Calmodulin sich im Kontext der kalziumabhängigen Signaltransduktion als besonders interessanter Interaktionspartner darstellt und in der größten Menge isoliert werden konnte, wurde in dieser Arbeit nur die Interaktion von Polyduktin mit diesem Protein näher betrachtet. Die Interaktion des Polyduktin C-Terminus mit Calmodulin konnte durch eine Koimmunopräzipitation und Immunfluoreszenzversuche in Cos7-Zellen verifiziert werden.

Mehrere Studien zur Funktion und Lokalisation von Proteinen, die in polyzystischen Nierenerkrankungen mutiert sind, weisen darauf hin, dass diese Proteine in einem Komplex vorliegen, der eine maßgebliche Rolle bei der Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration spielt. So konnte 2006 gezeigt werden, dass Polyduktin in einem Komplex mit Polycystin-2 vorliegt und Einfluss auf dessen Kalziumkanalaktivität nimmt (Wu et al., 2006). Darüber hinaus kommt es in Zellen, die aus polyzystischen Nieren

---

gewonnen wurden, zu einer Verminderung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Yamaguchi et al. 2006). Dies führt zu einer cAMP-abhängigen Aktivierung des B-Raf/MEK/ERK Signalweges und somit zu einer unkontrollierten Proliferation der Epithelzellen der Nierentubuli. *In vitro* Experimente mit Zellen aus ARPKD- und ADPKD-Nieren zeigten, dass die Aktivierung des B-Raf/MEK/ERK Signalweges durch die Anhebung des intrazellulären Kalziumspiegels vollständig reversibel ist (Yamaguchi et al., 2006). Auch in den Cholangiozyten der Leber konnte ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Signalwege und der Hyperproliferation der Zellen hergestellt werden. In Cholangiozyten der PCK-Ratte, die eine Modell für die ARPKD darstellt, konnte gezeigt werden, dass es durch eine veränderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ - und cAMP-Konzentration zur Fehlregulation der ProteinkinaseC kommt. Dies führt zu einer Hyperproliferation der Cholangiozyten (Banales et al., 2009).

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Funktion der in polyzytischen Nierenerkrankungen involvierten Proteine, wie auch Polyduktin, eng mit der Regulation und Konzentration des intrazellulären Kalziumspiegels verknüpft ist. Dabei scheint die Hyperproliferation innerhalb der Epithelien der renalen Tubuli sowohl in ADPKD- als auch in ARPKD-Nieren auf eine Fehlregulation der Proliferationskontrolle durch das Absinken des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels zurückzuführen zu sein.

Die Identifikation von Calmodulin als potentieller Interaktionspartner von Polyduktin liefert einen weiteren Hinweis auf die Verknüpfung von Polyduktin mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalsystem. Auch die proteolytische Spaltung von Polyduktin wird durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle reguliert (Ward et al., 2002). Es ist also denkbar, dass der Polyduktin C-Terminus nach proteolytischer Spaltung mit Calmodulin kalziumabhängig interagiert. Diese Interaktion könnte dann zur Translokation des C-Terminus in den Zellkern führen, wo er durch Interaktion mit anderen Proteinen zur Regulation des Zellzyklus beitragen könnte.

$\text{Ca}^{2+}$  agiert in der Zelle durch die Bindung an  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierte Proteine als Botenmolekül. Normalerweise ist die Konzentration von Kalzium im Zytosol relativ niedrig. Kalziumsignale in der Zelle erfolgen durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration, die durch liganden- oder spannungsabhängige Ionenkanäle, sowie durch die Freisetzung aus intrazellulären Kalziumspeichern erreicht wird. Seine Signalwirkung in der Zelle erfüllt Kalzium durch die Bindung an kalziumregulierte Proteine (Permyakov und Kretsinger, 2009).



Calmodulin ist ein zytosolisches Protein von ca. 16 kDa, das ubiquitär in eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Es vermittelt viele zelluläre Signale, die aus dem räumlichen Anstieg der zytosolischen Konzentration des Botenmoleküls  $\text{Ca}^{2+}$  hervorgehen. Die Bindung von vier Kalziumionen an die EF-Hand-Motive des Proteins führt zu einer Konformationsänderung, die es ihm ermöglicht an andere Proteine zu binden und diese zu aktivieren (Lodish et al., 2007). Bei den Zielproteinen handelt es sich unter anderem um eine Kaskade von Proteinkinasen, die letztendlich zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch deren Phosphorylierung sorgt. Darüber hinaus kann es zu einer Aktivierung der Proteinkinase B kommen, was zu einer Inhibition von Apoptose führt (Ikura et al., 2002). Diese Erkenntnisse zeigen, dass kalziumabhängige Calmodulin-Signalwege eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Proliferation und Apoptose spielen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Calmodulin den Transport von bestimmten Proteinen, die ein NLS-Signal enthalten (**nuclear localization signal**) in den Nukleus vermittelt (Schweitzer und Hanover, 1996). Dieser Transportmechanismus scheint unabhängig von GTP, aber abhängig von Kalzium zu sein. Mitglieder der SOX-Proteinfamilie (**SRY (sex determining region Y)-box**) scheinen durch eine Kombination aus ran (**ras-related nuclear protein**) und Calmodulin vermitteltem Transport in den Zellkern zu gelangen (Hanover et al., 2009).

2006 gelang es Hiesberger et al. ein NLS-Signal innerhalb der C-terminalen Domäne von Polyduktin zu identifizieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es unter bestimmten Bedingungen zu einer proteolytischen Abspaltung des C-Terminus und einer Translokation in den Kern kommt. Dieser Prozess scheint von einer Erhöhung des Kalziumniveaus im Zytoplasma abhängig zu sein (Hiesberger et al., 2006).

Durch Immunfluoreszenzversuche (Abbildung 3.15) konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zu einer Kolo-kalisation des Polyduktin C-Terminus und Calmodulin im Zytoplasma und im Nukleus kommt. Es ist denkbar, dass es durch eine Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Niveaus im Zytoplasma zu einer proteolytischen Spaltung von Polyduktin kommt. Gleichzeitig könnte es zu einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Calmodulin kommen, was zu einer Aktivierung des Proteins führen würde. Calmodulin könnte in seiner aktivierten Form den Polyduktin C-Terminus bindet und für dessen Translokation in den Nukleus sorgt. Hier könnte der Polyduktin C-Terminus, im Komplex mit anderen Proteinen, wie z.B. C-Myc, an

---

der Regulation von Zielgenen beteiligt sein, die Einfluss auf Proliferation und Apoptose nehmen.

Immunfluoreszenzversuche (Abbildung 3.15) zeigten, dass Calmodulin und der Polyduktin C-Terminus nicht nur im Nukleus, sondern auch in der Nähe des Nukleus an den Centrosomen kolokalisieren.

Das Centrosom somatischer Zellen besteht aus einem Paar Centriolen, das von einer Matrix aus amorphem pericentriolärem Material (PCM) umgeben ist. Das PCM beinhaltet neben einer komplexen Mischung verschiedener Proteine auch den für den Aufbau der Mikrotubuli benötigten  $\gamma$ -Tubulinring (Moritz et al., 1995).

Neue „Tochtercentriolen“ bilden sich in der Regel in Assoziation mit ihren „Muttercentriolen“ während dem Übergang von der G1- zur S-Phase. Mutter- und Tochtercentriol bleiben bis zur Mitose verbunden, so dass jede neue Zelle ein Centriolenpaar bestehend aus Mutter- und Tochtercentriol erhält (Vorobjev und Chentsov, 1982). Vor der Mitose wandern die beiden Tochtercentriolen zu gegenüberliegenden Seiten der Zelle und bilden so die beiden Pole der Mitosespindel, indem das Centrosom als MTOC (mikrotubuli-organizing centre) fungiert, von dessen  $\gamma$ -Tubulinring ausgehend die Mikrotubuli durch die Aneinanderlagerung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sternförmig ins Zytoplasma wachsen (Alberts et al., 2008).

Darüber hinaus spielen Centriolen eine wichtige Rolle bei der Ziliogenese. Zilien sind membranumschlossene Anordnungen von neun Mikrotubulipaaren (9+0-Typ), die sich von der Zelloberfläche erstrecken. Sie können sowohl eine motile als auch eine sensorische Funktion übernehmen. Die Mikrotubulipaare gehen zylinderförmig von Centriolen aus, die nach der G1-Phase des Zellzyklus in Richtung Zelloberfläche migriert sind. Sie werden als Basalkörper bezeichnet, da sie sich an der Basis des Ziliums befinden und das Zilium über Transitionsfasern in der Zellmembran verankern (Marshall, 2007). Primäre Zilien finden sich sowohl auf den Epithelzellen der renalen Sammelrohre, als auch auf den Cholangiozyten der intrahepatischen Gallengänge.

Für Polyduktin konnte von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass es an den Basalkörpern der primären Zilien von renalen Epithelien lokalisiert ist (Zhang et al., 2003; Ward et al., 2003). Da die Centrosomen, wie auch die Basalkörper von primären Zilien, aus Centriolen hervorgehen und damit einen ähnlichen Aufbau aufweisen, ist eine Lokalisation von Polyduktin an den Centrosomen durchaus denkbar.

Neben Calmodulin konnte auch  $\beta$ -Tubulin durch die TAP-Aufreinigung als potentieller Interaktionspartner identifiziert werden. Dies unterstützt die These von einer Lokalisation des Polyduktin C-Terminus an den Basalkörpern der Zilien und den Centrosomen, die abhängig vom Zellzyklusstadium die Basis der Mitosespindeln bilden, da es sich bei  $\beta$ -Tubulin um einen Bestandteil der Mikrotubuli handelt. Allerdings müsste die Interaktion des Polyduktin C-Terminus mit  $\beta$ -Tubulin durch Koimmunopräzipitations- und Immunfluoreszenzversuche noch weiter verifiziert werden.

1983 gelang es *in vivo* zu zeigen, dass Calmodulin mit dem Spindelapparat von Zellen assoziiert ist, die sich in der Metaphase des Zellzyklus befinden (Zavortink et al 1983, Moiso et al., 2002). Hier scheint es eine wichtige Rolle bei der Überwindung von Kontrollpunkten des Zellzyklus zu spielen (Török et al., 1998). Da es in den Epithelzellen der distalen Tubuli und Sammelrohre der Niere von ARPKD-Patienten zu einer vermehrten Proliferation und damit zur Zystenbildung kommt, muss es in diesen Zellen zu Fehlern bei der Regulation des Zellzyklus kommen. Es ist also denkbar, dass Polyduktin durch seine Lokalisation an den Centrosomen wie Calmodulin auch, an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist.

Zellkulturexperimente mit Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus und die Untersuchung der damit verbundenen Lokalisation von Polyduktin, sowie der einhergehenden Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration, könnten weiteren Aufschluss über die Funktion von Polyduktin in diesem Signalsystem geben.

### **3. *Pkhd1*ex40 del/del Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc-Mäuse**

1992 konnte gezeigt werden, dass es in der polyzystischen Niere der C57BL/6J-cpk-Maus zu einer erhöhten Transkriptionsrate des Protoonkogens *c-myc* kommt (Harding et al., 1992). Die aus der erhöhten Transkription resultierende mRNA konnte in den Epithelien der zystischen Erweiterungen der Nierensammelrohre lokalisiert werden. Dies weist darauf hin, dass der auf eine gestörte Proliferation der Epithelzellen zurückzuführende Phänotyp der Mäuse, auf eine gestörte Regulation von *c-myc* zurückzuführen ist (Harding et al., 1992).

Die SBM-Maus ist ein Mausmodell für polyzystischen Nierenerkrankungen, in der der PKD-Phänotyp auf eine Überexpression des Protoonkogens *c-myc* zurückzuführen ist. Die

Nieren der Mäusen weisen das doppelte Nierenvolumen im Vergleich zu Wildtypmäusen auf und es kommt zu zystischen Erweiterungen der Nierentubuli, wovon besonders die Sammelrohre betroffen sind. Zystenwachstum und -größe korrelieren dabei mit der Überexpression von *c-myc* (Trudel et al., 1998).

Um den Zusammenhang zwischen C-Myc und Polyduktin näher zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit doppeltransgene Mäuse hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die beiden bereits beschriebenen Mauslinien *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc* (Jäger et al., 2004) und *Pkhd1ex40 del/del* (Moser et al., 2005) miteinander gekreuzt. *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäuse besitzen die humane *c-myc* cDNS unter der Kontrolle des Rosa26-Promotors. Die daraus resultierende Überexpression von *c-myc* führt jedoch zu keiner messbaren Veränderung des Phänotyps der Maus. Zur Erstellung der *Pkhd1ex40 del/del*-Maus wurde Exon 40 innerhalb des murinen *pkhd1*-Lokus durch Insertion einer Selektionskassette zerstört. Dies führt jedoch nicht zu einer vollständigen Zerstörung des Leserahmens des *pkhd1*-Gens, sondern durch das Überspringen des zerstörten Exons entsteht eine verkürzte Variante von Polyduktin. Die Mäuse zeigen keinen Nierenphänotyp, jedoch entsprechen die Veränderungen der Leber, den pathologischen Veränderungen, die in den Lebern von ARPKD-Patienten beobachtet werden. Es kommt zu einer Vermehrung der Gallengänge innerhalb eines periportalen Feldes, sowie zu einer kongenitalen hepatischen Fibrose innerhalb der Periportalfelder. Die krankhaften Veränderungen der Leber sind auf eine Entwicklungsstörung der embryonalen Duktalplatte während der Organogenese der Leber zurückzuführen (Moser et al., 2005).

Die aus der Kreuzung der beiden Mauslinien hervorgehenden doppeltransgenen Mäuse zeigen im Vergleich zu WT-, *Pkhd1ex40 del/del*- und *Rosa26 $\Delta$ neo myc/myc*-Mäusen eine um 50 % erhöhte Proliferationsrate der Cholangiozyten, die die intrahepatischen Gallengänge auskleiden (Abbildung 3.22). Daraus resultiert eine im Vergleich zu *Pkhd1ex40 del/del*-Mäusen stärkere Erweiterung der intrahepatischen Gallengänge.

Da es nur dann zu einer Erhöhung der Proliferationsrate der Cholangiozyten kommt, wenn eine Polyduktin-Defizienz und eine C-Myc-Überexpression vorliegen, muss dieser Entwicklung ein beiden Proteinen gemeinsamer Mechanismus zur Regulation der Proliferation zugrunde liegen. Eine Kolo-kalisation beider Proteine könnte einen Hinweis darauf liefern, ob es zu einer physischen Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommt.

---

Immunfluoreszenzuntersuchungen unter Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen C-Myc und Polyduktin zeigten, dass es zu einer Kollokalisierung von beiden Proteinen in den Nukleoli des Zellkerns kommt (Abbildung 3.23).

In den Nukleoli findet die Prozessierung der rRNS, sowie der Zusammenbau der Ribosomen statt. Im Gegensatz zu anderen Zellorganellen ist der Nukleolus nicht von einer Membran umgeben, sondern besteht aus einem Aggregat verschiedener Makromoleküle. Dazu gehören die rRNS-Gene, Vorläufer rRNS, reife rRNS, rRNS-prozessierende Enzyme, snoRNPs (**s**mall **n**ucleolar **R**NA-protein complexes), Untereinheiten von ribosomalen Proteinen und fertige Ribosomen (Alberts et al., 2002). Während des Zellzyklus findet eine ständige dynamische Veränderung der Komposition der Proteinbestandteile der Nukleoli statt, was eine Verwicklung in die Regulation des Zellzyklus vermuten lässt. So finden z.B. posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie Phosphorylierung, die zur Aktivierung von Proteinen führt und Sumoylierung, die zur Degradation von Proteinen führt (SUMO: **S**mall **U**biquitin-like **M**odifier), statt. Durch das Zusammenspiel von Aktivierung durch Phosphorylierung und Degradation durch Sumoylierung kommt es somit zu einer innerhalb des Nukleolus vermittelten Regulation des Zellzyklus (Boisvert et al., 2007).

Die Expression des Protoonkogens *c-myc* ist in vielen Krebsarten aufgrund von Mutationen in *c-myc* regulierenden Genen verändert. Ca. 15 % aller Gene werden von C-Myc reguliert (Gearhart et al., 2007). Eine Überexpression von *c-myc* geht in den meisten Fällen Hand in Hand mit einem späten Stadium und einer schlechten Prognose der Krebserkrankung. In Abhängigkeit von zellulärem Kontext und Expressionsniveau kann C-Myc entweder zur Expression von Genen führen, die für Zellwachstum und Proliferation oder für Apoptose verantwortlich sind. Um eine Zelle in eine Tumorzelle zu transformieren bedarf es jedoch der Deregulation weiterer Onkogene oder einer Fehlregulation von Apoptosemechanismen. C-Myc hat innerhalb der Zelle eine relativ geringe Halbwertszeit. Die schnelle Degradation des Protoonkogens erfolgt entweder durch das Proteasom oder innerhalb des Nukleolus (Arabi et al., 2002). Eine Überexpression von *c-myc* oder die Hemmung des Proteasoms führen zu einer Akkumulation von C-Myc im Nukleolus, wo es vermittelt durch Tumorsuppressorproteine zur Sumoylierung und folglich zur Degradation des Proteins kommt (Arabi et al., 2002; Welcker et al., 2004).

---

2006 konnten Hiesberger et al. zeigen, dass es nach einer Aktivierung von ProteinkinaseC und Freisetzung von intrazellulärem Kalzium zu einer proteolytischen Abspaltung des C-Terminus von Polyduktin kommt. Nach der proteolytischen Spaltung kommt es zu einer Translokation des C-Terminus in den Nukleus. Zellkulturexperimente unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten humanen Polyduktin C-Terminus zeigten, dass es zu einer Lokalisation in den Nukleoli kommt.

Die Experimente zur Lokalisation von C-Myc und der zytoplasmatischen Domäne von Polyduktin, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, zeigen, dass jedes Protein für sich in den Nukleoli lokalisiert ist (Abbildung 3.23). Die Möglichkeit zur Koloalisation und damit einer direkten physischen Interaktion der beiden Proteine ist somit gegeben. Denkbar wäre, dass Polyduktin innerhalb der Zelle eine Rolle als Tumorsuppressor übernimmt, indem es an der Degradation von C-Myc innerhalb der Nukleoli beteiligt ist und folglich zu einer Hemmung der Proliferation führt.

Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass es während der Organogenese der Leber zu einer strengen Regulation der *myc/max/mad* Transkriptionsmaschinerie kommt. Sie reguliert das Expressionsmuster von Proteinen, die für Wachstum, Proliferation, Metabolismus und Differenzierung der Hepatozyten während der Organogenese der Leber verantwortlich sind. Während das Expressionsniveau von *c-myc* in adulter und fetaler Leber gleich ist, kommt es in den beiden Entwicklungsstadien zu einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisation des Proteins. In den fetalen Hepatozyten ist C-Myc im gesamten Nukleus, in adulten Hepatozyten nur im Nukleolus nachweisbar. Das Expressionsniveau von *max* scheint bei diesem Prozess einen wichtigen Einfluss auf die Lokalisation von C-Myc zu haben (Sanders und Gruppuso, 2005).

In den Cholangiozyten, wo es im Gegensatz zu den Hepatozyten zu einer Expression von Polyduktin kommt, wäre es folglich denkbar, dass es nach der Translokation der zytoplasmatischen Domäne von Polyduktin in den Zellkern, zu einer Interaktion mit den *myc/max/mad* Signalwegen kommt, die zu einer Lokalisation von C-Myc in den Nukleosomen und folglich zur Degradation von C-Myc führt.

In ARPKD-Patienten würde es durch die Polyduktin-Defizienz so zu einer Fehlregulation von C-Myc durch eine verminderte Degradation des Proteins kommen. Besonders bei der Bildung der embryonalen Duktalplatte, während der Entwicklung der intrahepatischen Gallengänge und der Rückbildung von überzähligen Gallengangvorläufern, ist eine

---

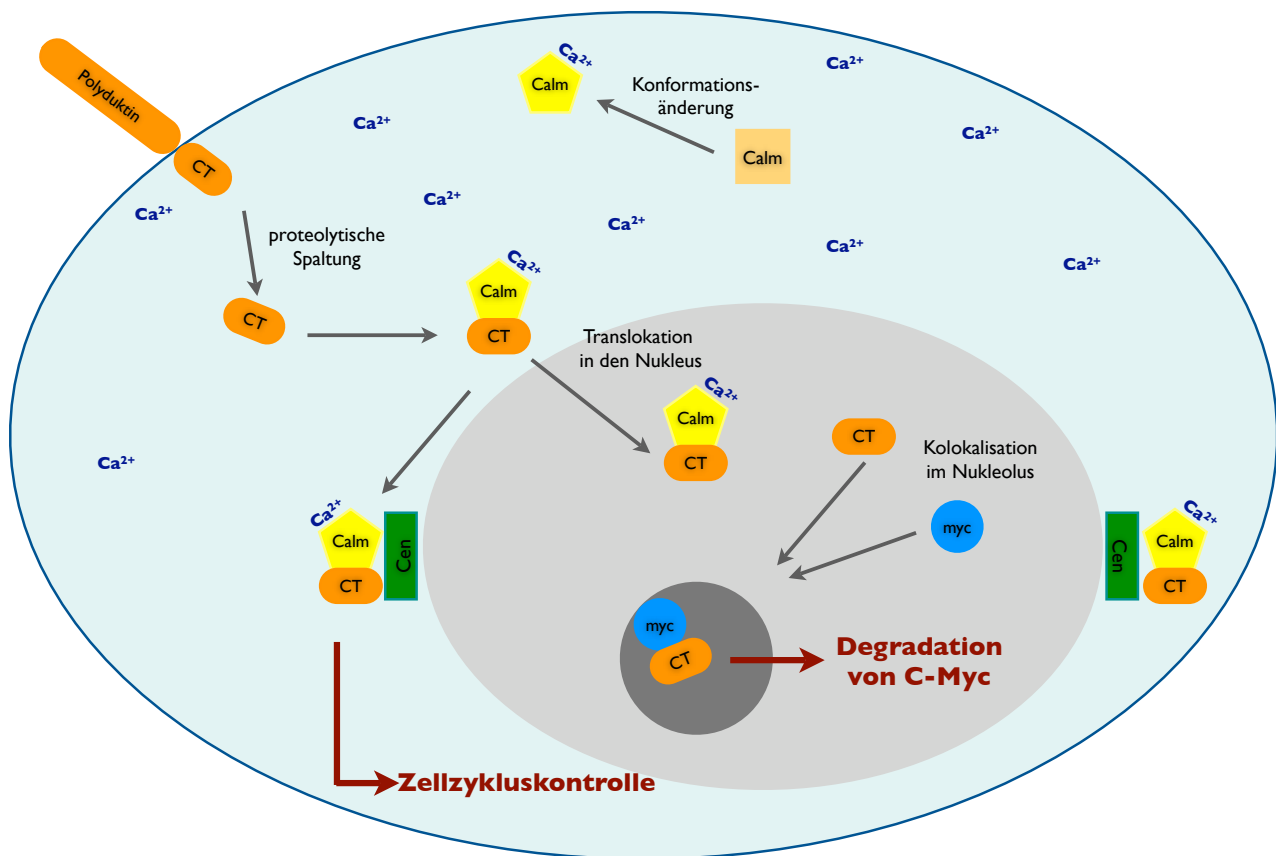
genaue Abstimmung zwischen Proliferation und Apoptose unerlässlich (Roskams und Desment, 2008). Eine Fehlregulation der Degradation von C-Myc hervorgerufen durch eine Polyduktin-Defizienz, könnte zu der massiven Fehlbildung der embryonalen Duktalplatte und der periportal Fibrose der Leber von ARPKD-Patienten führen.

Abbildung 4.1 fasst alle Hypothesen zu Lokalisation und Funktion von Polyduktin in der Zelle schematisch zusammen. Zunächst kommt es zu einer von der intrazellulären Kalziumkonzentration abhängigen proteolytischen Abspaltung des Polyduktin C-Terminus. Gleichzeitig erfährt Calmodulin durch die Bindung von vier Kalziumionen eine Konformationsänderung, die es ihm erlaubt an den abgespaltenen C-Terminus zu binden. Die Bindung an Calmodulin führt zum einen zur Lokalisation des C-Terminus an den Centrosomen und zum anderen zu einer Translokation beider Proteine in den Kern.

Für Calmodulin konnte bereits gezeigt werden, dass es an den Centrosomen lokalisiert ist und hier eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus übernimmt. Auch für Polyduktin ist eine Lokalisation an den Centrosomen denkbar, da sie ähnlich aufgebaut sind, wie die Basalkörper der primären Zilien, an denen Polyduktin lokalisiert ist. Es könnte hier ebenfalls an der Kontrolle der Proliferation beteiligt sein, da die nicht funktionelle Form des Proteins in ARPKD-Patienten zu einer unkontrollierten Proliferation in Niere und Leber führt.

Innerhalb des Zellkerns in den Nukleoli kommt es zu einer physischen Interaktion zwischen dem C-Myc und dem Polyduktin C-Terminus. Die Nukleolus ist nicht nur der Ort, an dem die Biogenese der Ribosomen stattfindet, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellproliferation. Es ist denkbar, dass die Kolo-kalisation mit dem Polyduktin C-Terminus eine Sumoylierung von C-Myc vermittelt und so die Degradation des Proteins herbei geführt wird.

Die Lokalisation des Polyduktin C-Terminus an den Centrosomen, sowie die Interaktion mit C-Myc in den Nukleoli weisen unter Betrachtung der krankhaften Veränderungen von Niere und Leber von ARPKD-Patienten auf eine Rolle von Polyduktin als Tumorsuppressor hin.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung der kalziumabhängigen Lokalisation und Interaktion von Polyduktin mit Calmodulin und C-Myc**

Durch proteolytische Spaltung wird der C-Terminus (CT, orange) von Polyduktin (orange) ins Zytoplasma freigesetzt. Hier bindet er an Calmodulin (Calm, gelb), dass durch die Bindung von 4 Kalziumionen seine Konformation geändert hat. Im Komplex mit Calmodulin lokalisiert der Polyduktin-CT an den Centrosomen (Cen, grün), wo es vermutlich eine Rolle bei der Kontrolle des Zellzyklus spielt. Außerdem transloziert der C-Terminus gebunden an Calmodulin in den Nucleus (grau). Hier kommt es zu einer Interaktion mit C-Myc (blau) im Nucleolus (dunkelgrau), wo es an der Degradation von C-Myc und somit an der Proliferationskontrolle beteiligt sein könnte.



## V. Literatur

- Akhan O, Karaosmanoğlu AD, Ergen B. Imaging findings in congenital hepatic fibrosis *European Journal of Radiology* 61 (2007) 18–24
- Arabi A, Rustum C, Hallberg E, Wright AP. Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116 (Pt 9):1707-17.
- Banales JM, Masyuk TV, Gradilone SA, Masyuk AI, Medina JF, LaRusso NF. The cAMP effectors Epac and protein kinase a (PKA) are involved in the hepatic cystogenesis of an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hepatology.* 2009 Jan;49(1):160-74.
- Bergmann C, Senderek J, Küpper F, Schneider F, Dornia C, Windelen E, Eggermann T, Rudnik-Schöneborn S, Kirfel J, Furu L, Onuchic LF, Rossetti S, Harris PC, Somlo S, Guay-Woodford L, Germino GG, Moser M, Büttner R, Zerres K PKHD1 mutations in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hum Mutat.* 2004 May;23(5): 453-63
- Bergmann C, Senderek J, Windelen E, Küpper F, Middeldorf I, Schneider F, Dornia C, Rudnik-Schöneborn S, Konrad M, Schmitt CP, Seeman T, Neuhaus TJ, Vester U, Kirfel J, Büttner R, Zerres K; APN (Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Nephrologie). Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney International, Vol. 67 (2005), pp. 829–848*
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979 Nov 24;7(6):1513-23.
- Blackwood EM, Eisenman RN. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science.* 1991 Mar 8;251(4998): 1211-7.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jul;8(7):574-85.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Peter Walter and Julian Lewis. Molecular Biology of the Cell. *Taylor & Francis* 2008
- Cappellen D, Schlange T, Bauer M, Maurer F, Hynes NE. Novel c-MYC target genes mediate differential effects on cell proliferation and migration. *EMBO Rep.* 2007 Jan;8(1): 70-6.
- Chauvet V, Tian X, Husson H, Grimm DH, Wang T, Hiesberger T, Igarashi P, Bennett AM, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Somlo S, Caplan MJ. Mechanical stimuli induce cleavage and nuclear translocation of the polycystin-1 C terminus *J Clin Invest.* 2004 Nov;114 (10):1433-4

- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
- Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy.* 2008 Feb 16;4(2):141-50
- Donaldson JC, Dempsey PJ, Reddy S, Bouton AH, Coffey RJ, Hanks SK. Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):168-78
- Donaldson JC, Dise RS, Ritchie MD, Hanks SK. Nephrocystin-conserved domains involved in targeting to epithelial cell-cell junctions, interaction with filamins, and establishing cell polarity. *J. Biol. Chem., Vol. 277, Issue 32, 29028-29035, August 9, 2002*
- Finch AJ, Soucek L, Junttila MR, Swigart LB, Evan GI. Acute overexpression of Myc in intestinal epithelium recapitulates some but not all the changes elicited by Wnt/beta-catenin pathway activation. *Mol Cell Biol.* 2009 Oct;29(19):5306-15.
- Foley KP, Leonard MW, Engel JD. Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 1993 Nov;9(11):380-5.
- Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK. Pluripotency redux--advances in stem-cell research. *N Engl J Med.* 2007 Oct 11;357(15):1469-72.
- Graham FL, van der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology.* 1973 Aug;54(2):536-9.
- Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot AP, Herrin J, Holleman R, Irons DA, Primack W, Thomson PD, Waldo FB, Lunt PW, and Zerres K. The Severe Perinatal Form of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease Maps to Chromosome 6p2 1. I -p I 2: Implications for Genetic Counseling *Am. J. Hum. Genet.* 56:1101-1107, 1995
- Hanover JA, Love DC, Prinz WA. Calmodulin-driven nuclear entry: trigger for sex determination and terminal differentiation. *J Biol Chem.* 2009 May 8;284(19):12593-7
- Harding MA, Gattone VH 2nd, Grantham JJ, Calvet JP. Localization of overexpressed c-myc mRNA in polycystic kidneys of the cpk mouse. *Kidney Int.* 1992 Feb;41(2):317-25.
- Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med.* 2009;60:321-37.
- Hart TC, Gorry MC, Hart PS, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, Shirts B, Xu L, Zhu H, Barmada MM, Bleyer AJ. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet.* 2002 Dec;39(12):882-92.
- Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, und Monty Krieger von Palgrave Macmillan. *Molecular Cell Biology. Palgrave Macmillan 6. Auflage.*

- Hateboer N, v Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggarr-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D. Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2 *Lancet*. 1999 Jan 9;353(9147):103-7
- Hiesberger T, Gourley E, Erickson A, Koulen P, Ward CJ, Masyuk TV, Larusso NF, Harris PC, Igarashi P. Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca<sup>2+</sup> and activation of protein kinase C. *J Biol Chem*. 2006 Nov 10;281(45):34357-64.
- Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E. Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy *J Am Soc Nephrol* 20: 23-35, 2009
- Hildebrandt F. and Otto. Molecular genetics of nephronophthisis and medullary cystic kidney disease *J Am Soc Nephrol*. 2000 Sep;11(9):1753-61
- Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2002 Feb;109(4):533-40.
- Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millán JL, Gamble V, Harris PC. The polycystic kidney disease 1 (*PKD1*) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains *Nat Genet*. 1995 Jun;10(2):151-6
- Ikura M, Osawa M, Ames JB. The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays*. 2002 Jul;24(7):625-36.
- Jäger R, Maurer J, Jacob A, Schorle H. Cell type-specific conditional regulation of the c-myc proto-oncogene by combining Cre/loxP recombination and tamoxifen-mediated activation. *Genesis*. 2004 Mar;38(3):145-50.
- Kaimori JY, Nagasawa Y, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Deng J, Imai E, Onuchic LF, Guay-Woodford LM, Germino GG. Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia. *Hum Mol Genet*. 2007 Apr 15;16(8):942-56
- Kim I, Fu Y, Hui K, Moeckel G, Mai W, Li C, Liang D, Zhao P, Ma J, Chen XZ, George AL Jr, Coffey RJ, Feng ZP, Wu G. Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Mar;19(3):455-68
- Kiser RL, Wolf MT, Martin JL, Zalewski I, Attanasio M, Hildebrandt F, Klemmer P. Medullary cystic kidney disease type 1 in a large Native-American kindred. *Am J Kidney Dis*. 2004 Oct;44(4):611-7.
- Koulen P, Cai Y, Geng L, Maeda Y, Nishimura S, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S. Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel *Nat Cell Biol*. 2002 Mar;4(3):191-7
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.* 1995 May 25;23(10):1686-90.

LOKEN AC, HANSSEN O, HALVORSEN S, JOLSTER NJ. Hereditary renal dysplasia and blindness. *Acta Paediatr.* 1961 Mar;50:177-84.

Marshall WF. What is the function of centrioles? *J Cell Biochem.* 2007 Mar 1;100(4):916-22.

Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, Punyashthiti R, Ritman EL, Torres VE, Harris PC, LaRusso NF. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology.* 2003 Nov;125(5):1303-10.

Menezes LF, Cai Y, Nagasawa Y, Silva AM, Watkins ML, Da Silva AM, Somlo S, Guay-Woodford LM, Germino GG, Onuchic LF. Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney Int.* 2004 Oct;66(4):1345-55.

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. PKD2, a Gene for Polycystic Kidney Disease That Encodes an Integral Membrane Protein *Science.* 1996 May 31;272(5266):1339-42

Moiso N, Erent M, Whyte S, Martin S, Bayley PM. Calmodulin-containing substructures of the centrosomal matrix released by microtubule perturbation. *J Cell Sci.* 2002 Jun 1;115(Pt 11):2367-79.

Moritz M, Braunfeld MB, Sedat JW, Alberts B, Agard DA. Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature.* 1995 Dec 7;378(6557):638-40.

Moser M, Matthiesen S, Kirfel J, Schorle H, Bergmann C, Senderek J, Rudnik-Schöneborn S, Zerres K, Büttner R. A mouse model for cystic biliary dysgenesis in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Hepatology.* 2005 May;41(5):1113-21.

Nagano J, Kitamura K, Hujer KM, Ward CJ, Bram RJ, Hopfer U, Tomita K, Huang C, Miller RT. Fibrocystin interacts with CAML, a protein involved in Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 16;338(2):880-9.

Nagasawa Y, Matthiesen S, Onuchic LF, Hou X, Bergmann C, Esquivel E, Senderek J, Ren Z, Zeltner R, Furu L, Avner E, Moser M, Somlo S, Guay-Woodford L, Büttner R, Zerres K, Germino GG Identification and characterization of Pkhd1, the mouse orthologue of the human ARPKD gene. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Sep;13(9):2246-58

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):129-37

Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent Escherichia coli cells. *Nucleic Acids Res.* 1990 Oct 25;18(20):6169.

Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, Bergmann C, Senderek J, Esquivel E, Zeltner R, Rudnik-Schöneborn S, Mrug M, Sweeney W, Avner ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S, Germino GG. PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeat. *Am J Hum Genet.* 2002 May;70(5):1305-17

OSATHANONDH V, POTTER EL. PATHOGENESIS OF POLYCYSTIC KIDNEYS. HISTORICAL SURVEY. *Arch Pathol.* 1964 May;77:459-65.

Parisi MA, Bennett CL, Eckert ML, Dobyns WB, Gleeson JG, Shaw DW, McDonald R, Eddy A, Chance PF, Glass IA. The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *American Journal of Human Genetics*, July 2004, 75:82-91

Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer.* 2002 Oct;2(10):764-76.

Permyakov EA, Kretsinger RH. Cell signaling, beyond cytosolic calcium in eukaryotes. *J Inorg Biochem.* 2009 Jan;103(1):77-86

Piper RC, Luzio JP. Ubiquitin-dependent sorting of integral membrane proteins for degradation in lysosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Aug;19(4):459-65

Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* 1999 Oct;17(10):1030-2

Roskams T, Desmet V. Embryology of Extra- and Intrahepatic Bile Ducts, the Ductal Plate *The Anatomical Record* 291:628-635 (2008)

Roy S, Dillon MJ, Trompeter RS, Barratt T. Autosomal recessive polycystic kidney disease: long-term outcome of neonatal survivors *Pediatr Nephrol* (1997) 11: 302 – 306

Saftig P, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Sep;10(9):623-35

Salomon R, Saunier S, Niaudet P. Nephronophthisis *Pediatr Nephrol.* 2008 Jul 8.

Salomon R, Saunier S, Niaudet P. Nephronophthisis. *Pediatr Nephrol.* 2009 Dec;24(12):2333-44

- Sanders JA, Gruppuso PA. Coordinated regulation of c-Myc and Max in rat liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Jan;290(1):G145-55
- Sanzen T, Harada K, Yasoshima M, Kawamura Y, Ishibashi M, Nakanuma Y. Polycystic kidney rat is a novel animal model of Caroli's disease associated with congenital hepatic fibrosis. *Am J Pathol.* 2001 May;158(5):1605-12
- Sharp AM, Messiaen LM, Page G, Antignac C, Gubler MC, Onuchic LF, Somlo S, Germino GG, Guay-Woodford LM. Comprehensive genomic analysis of PKHD1 mutations in ARPKD cohorts. *J Med Genet* 2005;42:336–349
- Sweitzer TD, Hanover JA. Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 10;93(25):14574-9.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium. Polycystic Kidney Disease: The Complete Structure of the *PKD1* Gene and its Protein *Cell.* 1995 Apr 21;81(2):289-9
- Török K, Wilding M, Groigno L, Patel R, Whitaker M. Imaging the spatial dynamics of calmodulin activation during mitosis. *Curr Biol.* 1998 Jun 4;8(12):692-9.
- Vorobjev IA, Chentsov YuS. Centrioles in the cell cycle. I. Epithelial cells. *J Cell Biol.* 1982 Jun;93(3):938-49.
- Wang S, Luo Y, Wilson PD, Witman GB, Zhou J. The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Mar;15(3):592-602.
- Wang S, Zhang J, Nauli SM, Li X, Starremans PG, Luo Y, Roberts KA, Zhou J. Fibrocystin/polyductin, found in the same protein complex with polycystin-2, regulates calcium responses in kidney epithelia. *Mol Cell Biol.* 2007 Apr;27(8):3241-52.
- Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet.* 2002 Mar;30(3):259-69
- Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet.* 2003 Oct 15;12(20):2703-10
- Weinberg Rober A. *The Biology of Cancer* 2007
- Welcker M, Orian A, Grim JE, Eisenman RN, Clurman BE. A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol.* 2004 Oct 26;14(20):1852-7.
- Wilson PD, Goilav B. Cystic Disease of the Kidney *Annu Rev Pathol.* 2007;2:341-68
- Wilson PD. Polycystic Kidney Disease *N Engl J Med.* 2004 Jan 8;350(2):151-64

Wu Y, Dai XQ, Li Q, Chen CX, Mai W, Hussain Z, Long W, Montalbetti N, Li G, Glynn R, Wang S, Cantiello HF, Wu G, Chen XZ. Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet.* 2006 Nov 15;15(22):3280-92

Yamaguchi T, Hempson SJ, Reif GA, Hedge AM, Wallace DP. Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jan;17(1):178-87

Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Oct;13(10):2508-16

Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, Soriano P. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Apr 15;94(8):3789-94.

Zavortink M, Welsh MJ, McIntosh JR. The distribution of calmodulin in living mitotic cells. *Exp Cell Res.* 1983 Dec;149(2):375-85.

Zerres K, Mücher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schöneborn S, Heikkilä P, Rapola J, Salonen R, Germino GG, Onuchic L, Somlo S, Avner ED, Harman LA, Stockwin JM, Guay-Woodford LM. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology *Am J Med Genet.* 1998 Mar 5;76(2):137-4

Zerres K. Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease *Clin Investig (1992)* 70:794-801

Zhang MZ, Mai W, Li C, Cho SY, Hao C, Moeckel G, Zhao R, Kim I, Wang J, Xiong H, Wang H, Sato Y, Wu Y, Nakanuma Y, Lilova M, Pei Y, Harris RC, Li S, Coffey RJ, Sun L, Wu D, Chen XZ, Breyer MD, Zhao ZJ, McKanna JA, Wu G. PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 24;101(8):2311-6

## VI. Anhang

### 1. Sequenz der *pkhd1* cDNS im Vergleich zu Sequenzdaten aus der Ensembl-Datenbank

Übereinstimmung 99.811 %

Oben: Sequenz der klonierten *pkhd1* cDNS

Unten: Sequenzdaten aus der Ensembl-Datenbank

```

1  ATGATGCTTGCCTGGCTGGTCTCTCTGCTGAGTATGGAAGTACTACTGTT 50
   |
1  ATGATGCTTGCCTGGCTGGTCTCTCTGCTGAGTATGGAAGTACTACTGTT 50

51  AGCAAAGCCTTACTCGAGTTTCCAGATTGAACCCGCAGAAGGTAGCCTTG 100
   |
51  AGCAAAGCCTTACTCGAGTTTCCAGATTGAACCCGCAGAAGGTAGCCTTG 100

101 CAGGGGGAACATGGATCACAGTTGTATTTGACGGTTTGGATAGAAGTATT 150
    |
101 CAGGGGGAACATGGATCACAGTTGTATTTGACGGTTTGGATAGAAGTATT 150

151 CTTTACCCCAACAATGGCTCTCAGCTGCAGATAGACCTGGTGAGTGTGGC 200
    |
151 CTTTACCCCAACAATGGCTCTCAGCTGCAGATAGACCTGGTGAGTGTGGC 200

201 AATACCTACCTTGAGGATCCCCTGTGACGTCTCTCCGGCCTTCGTGGATT 250
    |
201 AATACCTACCTTGAGGATCCCCTGTGACGTCTCTCCGGCCTTCGTGGATT 250

251 TGCCTGTGGTGACATGCCAGACGAGGTCTCTTCCATCAGAAGCAGATGCA 300
    |
251 TGCCTGTGGTGACATGCCAGACGAGGTCTCTTCCATCAGAAGCAGATGCA 300

301 GGGCCATACTCCCTGGAAATGCGCTCTGGGGAGCAAGTGCTAGGCACTCC 350
    |
301 GGGCCATACTCCCTGGAAATACGCTCTGGGGAGCAAGTGCTAGGCACTCC 350

351 ATGTCCTGGATCACTAGATAGCTGTACTTTCAAGTTTTCCAAGGATCAGA 400
    |
351 ATGTCCTGGATCACTAGATAGCTGTACTTTCAAGTTTTCCAAGGATCAGA 400

401 CACCTGTTTTATATCAAGTTTACCCAGCAAGTGGAGTTCCAGGAGAAGTA 450
    |
401 CACCTGTTTTATATCAAGTTTACCCAGCAAGTGGAGTTCCAGGAGAAGTA 450

451 GTGTCCGTGTACGGCCGGGTCATCACTACCTGGCTGGAGACCTTCGATCC 500
    |
451 GTGTCCGTGTACGGCCGGGTCATCACTACCTGGCTGGAGACCTTCGATCC 500

501 TGATGTGGACTACATAGAGAGCCCATTTGATCCTAGAAGCTAGAGAAGACA 550
    |
501 TGATGTGGACTACATAGAGAGCCCATTTGATCCTAGAAGCTAGAGAAGACA 550

```



551 AATGGCTTACTCCCTGTTCCCTTATAAACAGGCAGACAGGAAGCTGTTTT 600  
|||||  
551 AATGGCTTACTCCCTGTTCCCTTATAAACAGGCAGACAGGAAGCTGTTTT 600  
601 CCCATCCAGGAGGAGCATGGCCTTGGGAATGTGCAGTGTTCGTGTGGAAGG 650  
|||||  
601 CCCATCCAGGAGGAGCATGGCCTTGGGAATGTGCAGTGTTCGTGTGGAAGG 650  
651 CGATTATATTGGTTCTCAGAATGTTAGTTTTTTCAGTATTTAACAAGGGGA 700  
|||||  
651 CGATTATATTGGTTCTCAGAATGTTAGTTTTTTCAGTATTTAACAAGGGGA 700  
701 GGTCGATGGTGCATAAGGAAGCCTGGCTCATCAGTGCTAAACAGGAACTG 750  
|||||  
701 GGTCGATGGTGCATAAGGAAGCCTGGCTCATCAGTGCTAAACAGGAACTG 750  
751 TTCCTGTACCAGACATACCCAGAAATCTTATCCGTGTTTCCAAAAGTTGG 800  
|||||  
751 TTCCTGTACCAGACATACCCAGAAATCTTATCCGTGTTTCCAAAAGTTGG 800  
801 GAGCCTTGGGGGAAGAACGGACATCATCATTACGGGAGATTTCTTTGACC 850  
|||||  
801 GAGCCTTGGGGGAAGAACGGACATCATCATTACGGGAGATTTCTTTGACC 850  
851 CTTCTGCCCCGGGTTACCATTGCAGGCATCCCATGTGATATTAGATATGTG 900  
|||||  
851 CTTCTGCCCCGGGTTACCATTGCAGGCATCCCATGTGATATTAGATATGTG 900  
901 TCTCCAGGGAGATTGAGTGCAC TACCAGGGCTCCAGGAAATGAAGCAAG 950  
|||||  
901 TCTCCAGGAAAGATTGAGTGCAC TACCAGGGCTCCAGGAAATGAAGCAAG 950  
951 GCTCACTGCTCCTCAGGCAGACAATCGAGGACTCCGTTTTGAAGTTGGAG 1000  
|||||  
951 GCTCACTGCTCCTCAGGCAGGCAATCGAGGACTCCGTTTTGAAGTTGGAG 1000  
1001 ATGCTACTAAGGATGTGGAGCTGACTGAAGCCACCCCAGGGTACAGGTGG 1050  
|||||  
1001 ATGCTACTAAGGATGTGGAGCTGACTGAAGCCACCCCAGGGTACAGGTGG 1050  
1051 CAGATAGTTCCTAATGCCAGTTCCTCATCTGGCTTTTGGTCAAAGGAAGG 1100  
|||||  
1051 CAGATAGTTCCTAATGCCAGTTCCTCATCTGGCTTTTGGTCAAAGGAAGG 1100  
1101 GAGACTTTTCAGAGCACGGCTCAGTGGGTTCTTCGTGGCGCCACAGACAA 1150  
|||||  
1101 GAGACTTTTCAGAGCACGGCTCAGTGGGTTCTTCGTGGCGCCACAGACAA 1150  
1151 ACAATTACACATTCTGGATCCAGGCAGACAGCCAAGCTTCTTCGTGTTTC 1200  
|||||  
1151 ACAATTACACATTCTGGATCCAGGCAGACAGCCAAGCTTCTTCGTGTTTC 1200  
1201 AGTTCTTCAGAGGAGCCAAGGACCAAGGTAGAAGTGGCCTCTGTTGGGGT 1250  
|||||  
1201 AGTTCTTCAGAGGAGCCAAGGACCAAGGTAGAAGTGGCCTCTGTTGGGGT 1250  
1251 TGGCACTGCTGACTGGTTTGACTCTTGGGAGCAGATCGGGAATGAAGGGA 1300  
|||||  
1251 TGGCACTGCTGACTGGTTTGACTCTTGGGAGCAGATCGGGAATGAAGGGA 1300

---

1301 GCTGGCACCAGAAGACAACCAAGCTAGAACTGCAGGGCGGAGCCAAGTAC 1350  
|||||  
1301 GCTGGCACCAGAAGACAACCAAGCTAGAACTGCAGGGCGGAGCCAAGTAC 1350  
1351 TACTTGGAAGCAGAGCAACATGGGATAGCTCCCAGCAGAGGGATGAGAAT 1400  
|||||  
1351 TACTTGGAAGCAGAGCAACATGGGATAGCTCCCAGCAGAGGGATGAGAAT 1400  
1401 TGGTGTCCAGATCCACAACACCTGGTTGAATCCGGATGTGGTCAACACTT 1450  
|||||  
1401 TGGTGTCCAGATCCACAACACCTGGTTGAATCCAGATGTGGTCAACACTT 1450  
1451 ACCTTCTGGAGAAACACCAGATCCGAGCCCGAGCCAGAGACTTCCAGAA 1500  
|||||  
1451 ACCTTCTGGAGAAACACCAGATCCGAGCCCGAGCCAGAGACTTCCAGAA 1500  
1501 ATACAGGTGTTGCATGTGTTCAGGTAAAGGAACTTTTTCCTTACTTGGGG 1550  
|||||  
1501 ATACAGGTGTTGCATGTGTTCAGGTAAAGGAACTTTTTCCTTACTTGGGG 1550  
1551 CAATGTCTCCAGCCAACCAGTTCCTGCAAATGCCACAGCCCAACAGATCC 1600  
|||||  
1551 CAATGTCTCCAGCCAACCAGTTCCTGCAAATGCCACAGCCCAACAGATCC 1600  
1601 AAACCACCATTGAAGAGTTGCTTGTGGTGAAATGCAATCTGGCACCGTTT 1650  
|||||  
1601 AAACCACCATTGAAGAGTTGCTTGTGGTGAAATGCAATCTGGCACCGTTT 1650  
1651 TCGGCCCGTGTTCTTCTCCGGCTTGGATTTGAGCAAGGTTTAGAAGGCTC 1700  
|||||  
1651 TCGGCCCGTGTTCTTCTCCGGCTTGGATTTGAGCAAGGTTTAGAAGGCTC 1700  
1701 CAGGTCTGATGGGGTCTCACCAGTTCAACTGAACCCTTCTGTGGCAGAT 1750  
|||||  
1701 CAGGTCTGATGGGGTCTCACCAGTTCAACTGAACCCTTCTGTGGCAGAT 1750  
1751 TCAGCCTTGGTCAACTTGGACATCTTATCCTAATTCCAGAGGCTGCCGAC 1800  
|||||  
1751 TCAGCCTTGGTCAACTTGGACATCTTATCCTAATTCCAGAGGCTGCCGAC 1800  
1801 AAGGGCTATCAGCCGGATCGATACCCGTATCTGTGTCTTGCATACAGAGG 1850  
|||||  
1801 AAGGGCTATCAGCCGGATCGATACCCGTATCTGTGTCTTGCATACAGAGG 1850  
1851 CCATATGAACAAGACCCTGGACATGACTGTTTCTTCCCTATTTGGCTTCC 1900  
|||||  
1851 CCATATGAACAAGACCCTGGACATGACTGTTTCTTCCCTATTTGGCTTCC 1900  
1901 AAAACATCATGAAGAATATCACCTGTGACTGGAGTCTTACCAATCCCCAC 1950  
|||||  
1901 AAAACATCATGAAGAATATCACCTGTGACTGGAGTCTTACCAATCCCCAC 1950  
1951 CCTGAGAGCTGGCAGTTCACCTTGATTAACCTCTGGGACACATGTCTATG 2000  
|||||  
1951 CCTGAGAGCTGGCAGTTCACCTTGATTAACCTCTGGGACACATGTCTATG 2000  
2001 TCACTCTGAGGATCTCCAGTCTTCTCTGGCAAACACCCCATTGCTGGTTC 2050  
|||||  
2001 TCACTCTGAGGATCTCCAGTCTTCTCTGGCAAACACCCCATTGCTGGTTC 2050  
2051 ATCGGATTGACATCCGCCCCGTGGTTCCGGAGGCAGGCCTGCTCTATGTG 2100  
|||||

```
2051 ATCGGATTGACATCCGCCCGTGGTTCCGGAGGCAGGCCTGCTCTATGTG 2100
      .           .           .           .           .
2101 GATGAAATTATTCTTGCAGATACCAACGTAACAGTTTCTCAAGCTGATTC 2150
      |           |           |           |           |
2101 GATGAAATTATTCTTGCAGATACCAACGTAACAGTTTCTCAAGCTGATTC 2150
      .           .           .           .           .
2151 TGGAAGAGCCTGCCAGGTGGGAATGTGGTGGAGTCAGTATCGGTGGTGG 2200
      |           |           |           |           |
2151 TGGAAGAGCCTGCCAGGTGGGAATGTGGTGGAGTCAGTATCGGTGGTGG 2200
      .           .           .           .           .
2201 GAGTCCCTCCAGTCTACAGCATAAGCTCCTGGTTGGCAGGATGTGGCTCA 2250
      |           |           |           |           |
2201 GAGTCCCTCCAGTCTACAGCATAAGCTCCTGGTTGGCAGGATGTGGCTCA 2250
      .           .           .           .           .
2251 GAGCTCCCTCTCATCACTGCATGCTCTGTGTCCACGGAGGGAACAGGAGA 2300
      |           |           |           |           |
2251 GAGCTCCCTCTCATCACTGCATGCTCTGTGTCCACGGAGGGAACAGGAGA 2300
      .           .           .           .           .
2301 TGGATCTGAATTGATTGAGGTGACAGCTCAAAGACTCCAGAGGACAAGCC 2350
      |           |           |           |           |
2301 TGGATCTGAATTGATTGAGGTGACAGCTCAAAGACTCCAGAGGACAAGCC 2350
      .           .           .           .           .
2351 CACCTTTGGGAGGACACTTCTTCCTTTACCTCTCTGACACAGTGATAACT 2400
      |           |           |           |           |
2351 CACCTTTGGGAGGACACTTCTTCCTTTACCTCTCTGACACAGTGATAACT 2400
      .           .           .           .           .
2401 GATGTTCCGGTGCGCATGTCTGCCCCGACAGCTGCATAAGCTACTGCAGGA 2450
      |           |           |           |           |
2401 GATGTTCCGGTGCGCATGTCTGCCCCGACAGCTGCATAAGCTACTGCAGGA 2450
      .           .           .           .           .
2451 CAGTGCTGATGAGTCCACATCTGGATATCTCAATGCCGGTGACTTCACTG 2500
      |           |           |           |           |
2451 CAGTGCTGATGAGTCCACATCTGGATATCTCAATGCCGGTGACTTCACTG 2500
      .           .           .           .           .
2501 TGACAGAGGATCTGAATTCCTGCTATGAACATGTGTGGACTCTTTCTTGG 2550
      |           |           |           |           |
2501 TGACAGAGGATCTGAATTCCTGCTATGAACATGTGTGGACTCTTTCTTGG 2550
      .           .           .           .           .
2551 ACCACTCAGACTGGGGATTTGCCCAATTTTATCAGGGTCTCTGATCAAAA 2600
      |           |           |           |           |
2551 ACCACTCAGACTGGGGATTTGCCCAATTTTATCAGGGTCTCTGATCAAAA 2600
      .           .           .           .           .
2601 TCTTACCGGGGTGAATCCCACGTAACTGCTCGCGTGGTATATGATGGTG 2650
      |           |           |           |           |
2601 TCTTACCGGGGTGAATCCCACGTAACTGCTCGCGTGGTATATGATGGTG 2650
      .           .           .           .           .
2651 GAGTTTTCCCTTGACCATCTTTGGAGACATGTTGGCTACTGCCAACCAG 2700
      |           |           |           |           |
2651 GAGTTTTCCCTTGACCATCTTTGGAGACATGTTGGCTACTGCCAACCAG 2700
      .           .           .           .           .
2701 CAAACTCAGGTGGCTGTACAGGTGAATGACATAACCAGCCTATTGTTT CAGG 2750
      |           |           |           |           |
2701 CAAACTCAGGTGGCTGTACAGGTGAATGACATAACCAGCCTATTGTTT CAGG 2750
      .           .           .           .           .
2751 CTCCCGTTCTTTCCAATACCAGCAAGAGTCAACTCCCAGTGTGGATCATG 2800
      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
2751 CTCTGTCTCTTTCCAATACCAGCAAGAGTCAACTCCCAGTGTGGATCATG 2800
      .           .           .           .           .
2801 TGTGGTACTCCCTTGAAGCGATGTCAACTTGCTGGTTCATTTTACTGGA 2850
      |           |           |           |           |
2801 TGTGGTACTCCCTTGAAGCGATGTCAACTTGCTGGTTCATTTTACTGGA 2850
```





4351 GCATCACTGGCTCTAAACATCACAGTTCTGGTCAATGGGCTGACCAGCAA 4400  
|||||  
4351 GCATCACTGGCTCTAAACATCACAGTTCTGGTCAATGGGCTGACCAGCAA 4400

4401 GTGTAAGGGGAACGTACACTCTTCATAGAGGAAGCAGCAACTCCTAATG 4450  
|||||  
4401 GTGTAAGGGGAACGTACACTCTTCATAGAGGAAGCAGCAACTCCTAATG 4450

4451 TGGATGCTTTGACTATAAGCATCAGTGGGTCTCTAACCATGGTGCTGATG 4500  
|||||  
4451 TGGATGCTTTGACTATAAGCATCAGTGGGTCTCTAACCATGGTGCTGATG 4500

4501 AGAGGCCGGAGGTTAGCTACCACTGCTGATGAGCCAATAGCATTGTGGA 4550  
|||||  
4501 AGAGGCCGGAGGTTAGCTACCACTGCTGATGAGCCAATAGCATTGTGGA 4550

4551 TGATCAACTTCCCTGCCATAACAACGTTCTTCAATACCAGCCATGTGGCAT 4600  
|||||  
4551 TGATCAACTTCCCTGCCATAACAACGTTCTTCAATACCAGCCATGTGGCAT 4600

4601 GCCAGATAAGAGATTTGGCCCCAGGCTTCCACTATCTGTCAGCTGTTCAT 4650  
|||||  
4601 GCCAGATAAGAGATTTGGCCCCAGGCTTCCACTATCTGTCAGCTGTTCAT 4650

4651 ACAAGTGCTGGATATGCTTGCCTCAATAGTGTCTTAGAACTTCTTCAT 4700  
|||||  
4651 ACAAGTGCTGGATATGCTTGCCTCAATAGTGTCTTAGAACTTCTTCAT 4700

4701 CGTGCCTCAGGTGCTTGATTATTTTCCTAAGGACTTTAGCATCCATGGTG 4750  
|||||  
4701 CGTGCCTCAGGTGCTTGATTATTTTCCTAAGGACTTTAGCATCCATGGTG 4750

4751 GAAGTCTCTTGATGATAAAAAGGCACAGCCCTGCGAGGATGGAAAGCTACA 4800  
|||||  
4751 GAAGTCTCTTGATGATAAAAAGGCACAGCCCTGCGAGGATGGAAAGCTACA 4800

4801 GTTGTCTATGTTGGCCGGCAGGCTTGTCTAACAGTGAACATCAGCTCTGA 4850  
|||||  
4801 GTTGTCTATGTTGGCCGGCAGGCTTGTCTAACAGTGAACATCAGCTCTGA 4850

4851 CTTCATCCAGTGCATTGTCCCTGCAGGAAATGGCTCTGCTGCTCTGGAAA 4900  
|||||  
4851 CTTCATCCAGTGCATTGTCCCTGCAGGAAATGGCTCTGCTGCTCTGGAAA 4900

4901 TTGATGTGGATGGAGTTTTATACCACATAGGACTTGTTGATTACAGCAGC 4950  
|||||  
4901 TTGATGTGGATGGAGTTTTATACCACATAGGACTTGTTGATTACAGCAGC 4950

4951 ATCTTCACCCAGAATTGCTTTCTGTTTCACGGAGCCAAGACATCTTAAC 5000  
|||||  
4951 ATCTTCACCCAGAATTGCTTTCTGTTTCACGGAGCCAAGACATCTTAAC 5000

5001 CTTTACAGTGGCCCGGATCTCAGGGGCTGCAAATGTTGACATTTTTATTG 5050  
|||||  
5001 CTTTACAGTGGCCCGGATCTCAGGGGCTGCAAATGTTGACATTTTTATTG 5050

5051 GGACATCACCGTGTCTAGGTGTTGCTGGCAACCGTACAGTTCTCCAGTGC 5100  
|||||  
5051 GGACATCACCGTGTCTAGGTGTTGCTGGCAACCGTACAGTTCTCCAGTGC 5100

5101 ATGGTCCCTCTGCTTCCTGCTGGGGAGTATCTTGTACAGGTTATGATCA 5150  
|||||  
5101 ATGGTCCCTCTGCTTCCTGCTGGGGAGTATCTTGTACAGGTTATGATCA 5150

5151 CAGCCGAGGGTGGGCCTCATCCACTCTCATTCTTGTGCTGAGAGCCACTG 5200  
|||||  
5151 CAGCCGAGGGTGGGCCTCATCCACTCTCATTCTTGTGCTGAGAGCCACTG 5200

5201 TGACCTCAGTGACCAAGAACTATGGTTGCCTGGGTGGAAGGCTTTTGCAT 5250  
|||||  
5201 TGACCTCAGTGACCAAGAACTATGGTTGCCTGGGTGGAAGGCTTTTGCAT 5250

5251 GTGCTCGGCGCAGGATTTTCTCCAGGGAACATCTCAGCTGCCGTATGTGG 5300  
|||||  
5251 GTGCTCGGCGCAGGATTTTCTCCAGGGAACATCTCAGCTGCCGTATGTGG 5300

5301 TGCTCCATGCCAAGTCTTGGCTAATGCGACAGTGTCTGCCTTCAGCTGCT 5350  
|||||  
5301 TGCTCCATGCCAAGTCTTGGCTAATGCGACAGTGTCTGCCTTCAGCTGCT 5350

5351 TGGTTCGCCCCTGGATGTGTCCCTTGGCTTTCCTATGTGACCTGAGGCAT 5400  
|||||  
5351 TGGTTCGCCCCTGGATGTGTCCCTTGGCTTTCCTATGTGACCTGAGGCAT 5400

5401 GCAGAAGACAGCTGTAAAGTCAGGAGCTCCACCTACTTGCAATGTGATTT 5450  
|||||  
5401 GCAGAAGACAGCTGTAAAGTCAGGAGCTCCACCTACTTGCAATGTGATTT 5450

5451 GACTGTCTCCATGGGGACAGAGAGACTGCCTGGATCCTGGCCTTATGTCT 5500  
|||||  
5451 GACTGTCTCCATGGGGACAGAGAGACTGCCTGGATCCTGGCCTTATGTCT 5500

5501 ACCTTTGTGAAGAGAGTTCCCTGTGCCTCTTCGAACCAGATCACTGGACA 5550  
|||||  
5501 ACCTTTGTGAAGAGAGTTCCCTGTGCCTCTTCGAACCAGATCACTGGACA 5550

5551 GAGTCAGTCTTTCCATCGTTCTCAGGCCTCTTCCTCAGCCCTAAAGTGGA 5600  
|||||  
5551 GAGTCAGTCTTTCCATCGTTCTCAGGCCTCTTCCTCAGCCCTAAAGTGGA 5600

5601 AAAAGATGAAGTTCTCATCTATAATAGCTCCTGTAACATTACCATGGAAA 5650  
|||  
5601 AAGAGATGAAGTTCTCATCTATAATAGCTCCTGTAACATTACCATGGAAA 5650

5651 CTGAGGCAGAGATGGAGTGTGAGATGCCTAATCAGCCAATTACCGCCAAG 5700  
|||||  
5651 CTGAGGCAGAGATGGAGTGTGAGATGCCTAATCAGCCAATTACCGCCAAG 5700

5701 ATTACTGAAATACAGAAAAGCTGGGGCCAGAACACTCAGGGCAACTTTTC 5750  
|||||  
5701 ATTACTGAAATACAGAAAAGCTGGGGCCAGAACACTCAGGGCAACTTTTC 5750

5751 CCTTCCAATTCTGCCGAAGGTGGTCCAGGCCTCACAGTTGGTTTCCTCAA 5800  
|||||  
5751 CCTTCCAATTCTGCCGAAGGTGGTCCAGGCCTCACAGTTGGTTTCCTCAA 5800

5801 AGAGTGCCACACGATGGCGACAGTGTACAGTGGAGACCGGTACCTGCT 5850  
|||||  
5801 AGAGTGCCACACGATGGCGACAGTGTACAGTGGAGACCGGTACCTGCT 5850

5851 ACTGCTTGATGCGAACACTAGCTTCCTGAACTCCCTGCACATTAAGGTG 5900  
|||||  
5851 ACTGCTTGATGCGAACACTAGCTTCCTGAACTCCCTGCACATTAAGGTG 5900  
5901 GCAAGCTGATCTTCATGGATCCAGGACCCATTGAGCTCAGAGCCCCTCC 5950  
|||||  
5901 GCAAGCTGATCTTCATGGATCCAGGACCCATTGAGCTCAGAGCCCCTCC 5950  
5951 ATCCTTATTACAGATGGTGGAGAGCTCCATATTGGATCTGGGGAAAAGCC 6000  
|||||  
5951 ATCCTTATTACAGATGGTGGAGAGCTCCATATTGGATCTGAGGAAAAGCC 6000  
6001 TTTCCAAGGCAAAGCTCGGATCAAATCTATGGAAGTGTCCATTCCACTC 6050  
|||||  
6001 TTTCCAAGGCAAAGCTCGGATCAAATCTATGGAAGTGTCCATTCCACTC 6050  
6051 CCTTCTTTCCCTATGGAGTCAAGTTCCTAGCTGTGAGGAATGGAATCCTT 6100  
|||||  
6051 CCTTCTTTCCCTATGGAGTCAAGTTCCTAGCTGTGAGGAATGGAATCCTT 6100  
6101 TCCCTGCATGGTTCAGTTCAGAGGTTACTGTCACCTATCTTCAAGCAGC 6150  
|||||  
6101 TCCCTGCATGGTTCAGTTCAGAGGTTACTGTCACCTATCTTCAAGCAGC 6150  
6151 TGCACATGCAGGAGACAAAGTGTGACTCTGGGGGAAGCTGTGGACTGGA 6200  
|||||  
6151 TGCACATGCAGGAGACAAAGTGTGACTCTGGGGGAAGCTGTGGACTGGA 6200  
6201 AGCCTGGGGATGAGGCTGTCATTACCAGTGGGATGACTGTAGCAGGAGCT 6250  
|||||  
6201 AGCCTGGGGATGAGGCTGTCATTACCAGTGGGATGACTGTAGCAGGAGCT 6250  
6251 GAAGCAACAGAAGTTGTTGTTGTAGAACTATCCACAATGCAGACCTCCA 6300  
|||||  
6251 GAAGCAACAGAAGTTGTTGTTGTAGAACTGTCCACAATGCAGACCTCCA 6300  
6301 TCTCAGGAACCCCCTGAGATATTCCTATAATTTTCAGAGAGAACTGGGTAG 1350  
|||||  
6301 TCTCAGGAACCCCCTGAGATATTCCTATGATTTTCAGAGAGAACTGGGTAG 6350  
6351 CTGGAGAGAACTCTATTTTGAAGCCAACAGTTGCTCTCCTCAGCAGGAAC 1400  
|||||  
6351 CTGGAGAGAACTCTATTTTGAAGCCAACAGTTGCTCTCCTCAGCAGGAAC 6400  
6401 ATTATCATCCAAGGAACTTCACACTTGAGAGGGTAAAGCTTCTCAATTC 1450  
|||||  
6401 ATTATCATCCAAGGAACTTCACACTTGAGAGGGTAAAGCTTCTCAATTC 6450  
6451 ATGCCAGGAGGCCAACACTGCTAAAGGTAACCTGAAGCACTGTTTGTATT 6500  
|||||  
6451 ATGCCAGGAGGCCAACACTGCTAAAGGTAACCTGAAGCACTGTTTGTATT 6500  
6501 CTAAGAGTGAGAAGATGCTGGGAGCCAGGGATCTGGGGGCCAGAGTCATC 6550  
|||||  
6501 CTAAGAGTGAGAAGATGCTGGGAGCCAGGGATCTGGGGGCCAGAGTCATC 6550  
6551 ATTCAGTCCTTCCCAGAGGAACCCAGCTTCGTCAAGCTGAAGGGAGTGCA 5600  
|||||  
6551 ATTCAGTCCTTCCCAGAGGAACCCAGCTTCGTCAAGCTGAAGGGAGTGCA 6600  
6601 GTTCAGAGACCTGGGACAGGCCTTCCATAAGCACCTGAGCTCACTCGCAC 6650  
|||||



6601 GTTCAGAGACCTGGGACAGGCCTTCCATAAGCACCTGAGCTCACTCGCAC 6650  
6651 TGGTGGGAGCTATGAGAGGCTCTTATATCCAAAGCTGTTTCAGTGTGGAAC 6700  
|||||  
6651 TGGTGGGAGCTATGAGAGGCTCTTATATCCAAAGCTGTTTCAGTGTGGAAC 6700  
6701 TCCTTCAGCAGAGGCCTTAGCATGCACAGGACCTGGGGTCTGAAGGTGGA 6750  
|||||  
6701 TCCTTCAGCAGAGGCCTTAGCATGCACAGGACCTGGGGTCTGAAGGTGGA 6750  
6751 CAGCAATGTATTCTATAAGATTGTAGGGCATGCCCTGCTGCTGGGGTCTCT 6800  
|||||  
6751 CAGCAATGTATTCTATAAGATTGTAGGGCATGCCCTGCTGCTGGGGTCTCT 6800  
6801 ACCTGGACGGAAGGTTTAGCACTAGTGAGACTGTTACTGGAAGAAAAAAT 6850  
|||||  
6801 ACCTGGACGGAAGGTTTAGCACTAGTGAGACTGTTACTGGAAGAAAAAAT 6850  
6851 GGTGGTGGGAACAGGGAAGTACAATAAGAAACAATGTGATCATCAGTGT 6900  
|||||  
6851 GGTGGTGGGAACAGGGAAGTACAATAAGAAACAATGTGATCATCAGTGT 6900  
6901 TTCTGCAGCTGAGGGACTGTCCGGTCTGAAATGTTGGCACCAGCTGGCA 6950  
|||||  
6901 TTCTGCAGCTGAGGGACTGTCCGGTCTGAAATGTTGGCACCAGCTGGCA 6950  
6951 TCTACACTTTCAGTCCCACCAATGTGATGGAGGGCAACAGAGTGTGTGCA 7000  
|||||  
6951 TCTACACTTTCAGTCCCACCAATGTGATGGAGGGCAACAGAGTGTGTGCA 7000  
7001 GCTGGCTATGGATATGTCTTCCACCTTGTGACCAGCCAAACATTACAAGC 7050  
|||||  
7001 GCTGGCTATGGATATGTCTTCCACCTTGTGACCAGCCAAACATTACAAGC 7050  
7051 TCCACTCCTCTCATTCAATTGGAATACTGCTCATTCTTGTACAAGATATG 7100  
|||||  
7051 TCCACTCCTCTCATTCAATTGGAATACTGCTCATTCTTGTACAAGATATG 7100  
7101 GTCTCCTTGTATATCCTAAATTTCAACCACCTTGAATAATGACACTGGC 7150  
|||||  
7101 GTCTCCTTGTATATCCTAAATTTCAACCACCTTGAATAATGACACTGGC 7150  
7151 TTCACTCTGTTCCAAAACCTTCATGGTTTGGGGAAGTGCTGGTGGTGCCCA 7200  
|||||  
7151 TTCACTCTGTTCCAAAACCTTCATGGTTTGGGGAAGTGCTGGTGGTGCCCA 7200  
7201 GATTTTTAGAAAGTAACAATCTACACCTGAAAAACTTCCAAGTTTATGCAT 7250  
|||||  
7201 GATTTTTAGAAAGTAACAATCTACACCTGAAAAACTTCCAAGTTTATGCAT 7250  
7251 GCAGAGATTTTGGAAATTGACATTTTGGAAAGTGATGCGAACACTTTGATT 7300  
|||||  
7251 GCAGAGATTTTGGAAATTGACATTTTGGAAAGTGATGCGAACACTTTGATT 7300  
7301 ACCGACAGCTTTTTACTTGGTCATTTACCCACAAGGGAAGTCTATGTAT 7350  
|||||  
7301 ACCGACAGCTTTTTACTTGGTCATTTACCCACAAGGGAAGTCTATGTAT 7350  
7351 GTCAGCTGGGATCAAAACTCCCCAAAGATGGGAACTGATCATTTCGAACA 7400  
|||||  
7351 GTCAGCTGGGATCAAAACTCCCCAAAGATGGGAACTGACCATTTCGAACA 7400

7401 CAACTTTTGTAAATTTTGATGGCAACTGTGTGGCCATCAGAACCTGTTCT 7450  
|||||  
7401 CAACTTTTGTAAATTTTGATGGCAACTGTGTGGCCATCAGAACCTGTTCT 7450  
7451 GGCTGTTTCCAAGGACAGGGTGGCTATACTGTGAAGACCAGGCAATTGAA 5100  
|||||  
7451 GGCTGTTTCCAAGGACAGGGTGGCTATACTGTGAAGACCAGGCAATTGAA 7500  
7501 GTTTGTAAACTCTTCAAATTTAGTAGCATTTCATTTCCATTCCTCATGCAGCAG 7550  
|||||  
7501 GTTTGTAAACTCTTCAAATTTAGTAGCATTTCATTTCCATTCCTCATGCAGCAG 7550  
7551 TTCTGGAAGACTTAGACGGGTCCCTGTCTGGGAAAAATGGGTCTCATGTT 7600  
|||||  
7551 TTCTGGAAGACTTAGACGGGTCCCTGTCTGGGAAAAATGGGTCTCATGTT 7600  
7601 CTTGCATCTATGGAAACCCTCTCAGACACATGCTTGACCAATGCAAGCTT 7650  
|||||  
7601 CTTGCATCTATGGAAACCCTCTCAGACACATGCTTGACCAATGCAAGCTT 7650  
7651 CAGTCAGATTGTCCCTGGCAGCGTCTGTGGCGAAGCTGTTCTCTTCCATC 7700  
|||||  
7651 CAGTCAGATTGTCCCTGGCAGCGTCTGTGGCGAAGCTGTTCTCTTCCATC 7700  
7701 GTATGTCTATTGCTCTAGCCAATAGCCTTGATGTTCCCTAAGAATTTAACC 7750  
|||||  
7701 GTATGTCTATTGCTCTAGCCAATAGCCTTGATGTTCCCTAAGAATTTAACC 7750  
7751 ATTACTGACATCAGTAATAAGACAATCACTGTCAATTATGTGGAAGACAC 7800  
|||||  
7751 ATTACTGACATCAGTAATAAGACAATCACTGTCAATTATGTGGAAGACAC 7800  
7801 CCTGTCTAACTACTACGGCTGGATGGCTCTGCTCTTGGATCAAGAGACCT 7850  
|||||  
7801 CCTGTCTAACTACTACGGCTGGATGGCTCTGCTCTTGGATCAAGAGACCT 7850  
7851 ACTCGCTGCAGTTTGAGAGCCCTTGGATGAACAGATCTCTGCAGTACTCA 7900  
|||||  
7851 ACTCGCTGCAGTTTGAGAGCCCTTGGATGAACAGATCTCTGCAGTACTCA 7900  
7901 GCAACGTTTGACAGCTTTGCTCCTGGAAATTACCTCCTGATAATGCACAG 7950  
|||||  
7901 GCAACGTTTGACAGCTTTGCTCCTGGAAATTACCTCCTGATAATGCACAG 7950  
7951 GGACCTACCACCTTATCCTGACATCCTCCTCAGATGTGGGAGTCAGGTGG 8000  
|||||  
7951 GGACCTACCACCTTATCCTGACATCCTCCTCAGATGTGGGAGTCAGGTGG 8000  
8001 GCCATTCACCTTCCATTTTCATCCTTTGCCTAGTCAAGACAGAGCCTGTGAT 8050  
|||||  
8001 GCCATTCACCTTCCATTTTCATCCTTTGCCTAGTCAAGACAGAGCCTGTGAT 8050  
8051 TGGTTCCTTCAATAGGCAATTGAGGCAGCTCACCTACCTGGTTTCAGGTGA 8100  
|||||  
8051 TGGTTCCTTCAATAGGCAATTGAGGCAGCTCACCTACCTGGTTTCAGGTGA 8100  
8101 AGGTCAAGTTAAGGTATTTCTCCAAGTGAAGCCTGGTGTACCTCCAAGTG 8150  
|||||  
8101 AGGTCAAGTTAAGGTATTTCTCCAAGTGAAGCCTGGTGTACCTCCAAGTG 8150

8151 TTTCAGCTTCTACATCAGTACCTGAATCAGCTTCAAGATGGTCTCTTCCT 8200  
|||||  
8151 TTTCAGCTTCTACATCAGTACCTGAATCAGCTTCAAGATGGTCTCTTCCT 8200

8201 GAAACATGGCAAGATGTTGAAAAAGGCTGGGGAGGATACAACCACACCAT 8250  
|||||  
8201 GAAACATGGCAAGATGTTGAAAAAGGCTGGGGAGGATACAACCACACCAT 8250

8251 CCCAGGACCCGGTGATGATGTCTTGATTTTACCCAACAAGACTGTTCTTG 8300  
|||||  
8251 CCCAGGACCCGGTGATGATGTCTTGATTTTACCCAACAAGACTGTTCTTG 8300

8301 TGGATACTGATCTCCCAGTGCTTCGATGCCTCTATGTGATGGGTACCTTA 8350  
|||||  
8301 TGGATACTGATCTCCCAGTGCTTCGATGCCTCTATGTGATGGGTACCTTA 8350

8351 GAATTCCTGTGGACAGAAGCAACGTTCTGAGTGTGGCATGCTTACTCAT 8400  
|||||  
8351 GAATTCCTGTGGACAGAAGCAACGTTCTGAGTGTGGCATGCTTACTCAT 8400

8401 TGCAGGAGGGGAGCTGAAAGTAGGCACCTTGGAAAACCCCTTAGAAAAGG 8450  
|||||  
8401 TGCAGGAGGGGAGCTGAAAGTAGGCACCTTGGAAAACCCCTTAGAAAAGG 8450

8451 ACCAAAGACTTCTGATATTCCTTAGAGCCTCAGAAGAAGTCGTCTGTGAC 8500  
|||||  
8451 ACCAAAGACTTCTGATATTCCTTAGAGCCTCAGAAGAAGTCGTCTGTGAC 8500

8501 TATTTTGAAGGAATTCATGTTGACCCAGGAACAATTGGAGTTTATGGGAA 8550  
|||||  
8501 TATTTTGAAGGAATTCATGTTGACCCAGGAACAATTGGAGTTTATGGGAA 8550

8551 ACTTCGCCTTACAGTGCTTATCCTAAGAAATCCTGGGTACACCTTGGAG 9600  
|||||  
8551 ACTTCGCCTTACAGTGCTTATCCTAAGAAATCCTGGGTACACCTTGGAG 8600

8601 CTGACATTGCACCGGGAAATGAGAGGATTATTGTACACAATGCAGTGGAT 8650  
|||||  
8601 CTGACATTGCACCGGGAAATGAGAGGATTATTGTACACAATGCAGTGGAT 8650

8651 TGGCAGCCTCATGACACAATTGTCCTCAGCTCTTCTTCTTATGAGGCTCA 8700  
|||||  
8651 TGGCAGCCTCATGACACAATTGTCCTCAGCTCTTCTTCTTATGAGGCTCA 8700

8701 TGAGGCAGAGGTCCTCACTGTGAAGGAAGTCAAGGGCCATCACATCAGGA 8750  
|||||  
8701 TGAGGCAGAGGTCCTCACTGTGAAGGAAGTCAAGGGCCATCACATCAGGA 8750

8751 TCTATGAACGTCTAAAGCACAGGCACATTGGAAGTACCCACACCATGGAG 8800  
|||||  
8751 TCTATGAACGTCTAAAGCACAGGCACATTGGAAGTACCCACACCATGGAG 8800

8801 GATGGTCAACAGGTTTCATTTGGCTGCTGAGGTTGGGCTGTTGACCAGAAA 8850  
|||||  
8801 GATGGTCAACAGGTTTCATTTGGCTGCTGAGGTTGGGCTGTTGACCAGAAA 8850

8851 CATTAGAATTCAGCCTGACTCATCCTGTAGAGGGAGACTCCTTGTGGGGT 8900  
|||||  
8851 CATTAGAATTCAGCCTGACTCATCCTGTAGAGGGAGACTCCTTGTGGGGT 8900

```

8901 CCTTCAGGAAGTCTAGCGGAGAAGACTTTTCTGGTGTTCCTTCAACTTCTC 8950
      |
8901 CCTTCAGGAAGTCTAGCGGAGAAGACTTTTCTGGTGTTCCTTCAACTTCTC 8950
8951 AATGTAGAAAATTCAGAACATGGGGTTGCCATTGTATTCATCTATTGAATT 9000
      |
8951 AATGTAGAAAATTCAGAACATGGGGTTGCCATTGTATTCATCTATTGAATT 9000
9001 CACTGGTGTATCAGCTGGATCCTGGGTAATATCTTCTACTGTGCATCAAA 9050
      |
9001 CACTGGTGTATCAGCTGGATCCTGGGTAATATCTTCTACTGTGCATCAAA 9050
9051 GTTGCAGTGTGGGCATCCATGCATCTTCCAGCCATGGCGTGATTTTAACT 9100
      |
9051 GTTGCAGTGTGGGCATCCATGCATCTTCCAGCCATGGCGTGATTTTAACT 9100
9101 GATAATGTAGTGTGGCACAAATGGCCATGGCCATCGATGTGGAGGGTCA 9150
      |
9101 GATAATGTAGTGTGGCACAAATGGCCATGGCCATCGATGTGGAGGGTCA 9150
9151 GAACTATTCTCTCACCAATAACCTTGTCACTTCTGACAATGCAGTCAGCAA 9200
      |
9151 GAACTATTCTCTCACCAATAACCTTGTCACTTCTGACAATGCAGTCAGCAA 9200
9201 ACTCATCTCCTTGGGTGGCAGGAATCAAAGTGAAGTATGCAGAGGACATC 9250
      |
9201 ACTCATCTCCTTGGGTGGCAGGAATCAAAGTGAAGTATGCAGAGGACATC 9250
9251 ATTCTCCATGGCAATGTGGTGGCAGGATCTGAGAGACTTGGCTTTTCATGT 9300
      |
9251 ATTCTCCATGGCAATGTGGTGGCAGGATCTGAGAGACTTGGCTTTTCATGT 9300
9301 CGGTGGTTCATGGGTGCTCCTCTGAAGTGCTTTGGTCTGATAATGTGGTCC 9350
      |
9301 CGGTGGTTCATGGGTGCTCCTCTGAAGTGCTTTGGTCTGATAATGTGGTCC 9350
9351 ACTCAAGCCTCCATGGCCTTACCTCTACAAGAAACATGAATCCAATAAC 9400
      |
9351 ACTCAAGCCTCCATGGCCTTACCTCTACAAGAAACATGAATCCAATAAC 9400
9401 TGTACTGGTGTCTCTGGATTTATGGCTTTTAAGAACTTTGACTATGGTGC 9450
      |
9401 TGTACTGGTGTCTCTGGATTTATGGCTTTTAAGAACTTTGACTATGGTGC 9450
9451 CATGGTTCAGACAGAGAATAGTGTGGACATACAGAATATCACTCTGGTAG 9500
      |
9451 CATGGTTCAGACAGAGAATAGTGTGGACATACAGAATATCACTCTGGTAG 9500
9501 ACAATACTGTGGTCTTTTGGCTATCACATATGTATCTTCTGCTCTCCTG 9550
      |
9501 ACAATACTGTGGTCTTTTGGCTATCACATATGTATCTTCTGCTCTCCTG 9550
9551 AGCTCTGTCAGTACTGTACAGATTACACTTAGGAATTCAGTCATTGTGGC 9600
      |
9551 AGCTCTGTCAGTACTGTACAGATTACACTTAGGAATTCAGTCATTGTGGC 9600
9601 CACTAGCTCCTCTTTTGGTACTGCATCCACGACAGAAAGGCTCCTCAGTCAG 9650
      |
9601 CACTAGCTCCTCTTTTGGTACTGCATCCACGACAGAAAGGCTCCTCAGTCAG 9650

```



10401 CAGAGCAAACCTCTCCATTCCCTGCGTTTTCTTCTATTGGGAAACCAAAGA 10450  
|||||  
10401 CAGAGCAAACCTCTCCATTCCCTGCGTTTTCTTCTATTGGGAAACCAAAGA 10450

10451 GCCTCCAAGCTCATCTTGGCTGTATTCTACAATGAGATTCCAGAGCCCTCA 10500  
|||||  
10451 GCCTCCAAGCTCATCTTGGCTGTATTCTACAATGAGATTCCAGAGCCCTCA 10500

10501 TGTTTTCTTAGACAAGAGCTTTATTCCACCTACTCCATTAGAGTCAGCAT 10550  
|||||  
10501 TGTTTTCTTAGACAAGAGCTTTATTCCACCTACTCCATTAGAGTCAGCAT 10550

10551 TTTCATTGTTGGCTGAGCCCTCTGGTGCCAACTATTTTGACATCATGAAT 10600  
|||||  
10551 TTTCATTGTTGGCTGAGCCCTCTGGTGCCAACTATTTTGACATCATGAAT 10600

10601 AACCTCTTGATGTTGTCCCTGCAAGGAGAGGAGCCTGTTGAAATACATTC 10650  
|||||  
10601 AACCTCTTGATGTTGTCCCTGCAAGGAGAGGAGCCTGTTGAAATACATTC 10650

10651 AAGTGTTCATTCATTTGGCTTTGACTGTGACATTTTCAGTCCTAGAAA 10700  
|||||  
10651 AAGTGTTCATTCATTTGGCTTTGACTGTGACATTTTCAGTCCTAGAAA 10700

10701 AGGGCTGGGAGAGAGCAATGCTTGAAAGCCTAAGTGACTTCTTTCAGATT 10750  
|||||  
10701 AGGGCTGGGAGAGAGCAATGCTTGAAAGCCTAAGTGACTTCTTTCAGATT 10750

10751 GACCCAAACCAAATCAGACTCACTCTTGAGATGCCTGGCAACAAAGAGAC 10800  
|||||  
10751 GACCCAAACCAAATCAGACTCACTCTTGAGATGCCTGGCAACAAAGAGAC 10800

10801 CTTAGAGGCCATTGCAAACAGTGAAAGAAAACGAAAGCGCAATTGCCCAT 10850  
|||||  
10801 CTTAGAGGCCATTGCAAACAGTGAAAGAAAACGAAAGCGCAATTGCCCAT 10850

10851 CTGTAACCTTGTTGGTGGCCCTTCTATCAGATATGGTCAACGTAGACCTCTC 10900  
|||||  
10851 CTGTAACCTTGTTGGTGGCCCTTCTATCAGATATGGTCAACGTAGACCTCTC 10900

10901 ATGGCAGAAAATGACATCACTTAAGATCACACCAGCAACAACCTTGAAAC 10950  
|||||  
10901 ATGGCAGAAAATGACATCACTTAAGATCACACCAGCAACAACCTTGAAAC 10950

10951 TTTCTCAAAGGTGATTGTCATTGAAGTTGGTGACCTGCCAAACATAAGGA 11000  
|||||  
10951 TTTCTCAAAGGTGATTGTCATTGAAGTTGGTGACCTGCCAAACATAAGGA 11000

11001 ACAGTGAACCCATTAGTCCTTACCAAGTAACAGATTACAGAGATTGGTG 10050  
|||||  
11001 ACAGTGAACCCATTAGTCCTTACCAAGTAACAGATTACAGAGATTGGTG 11050

11051 AACCAGGTTATCACTGCTCAACAGACTGGAGCTCTAGAAAATGTCCTAGG 11100  
|||||  
11051 AACCAGGTTATCACTGCTCAACAGACTGGAGCTCTAGAAAATGTCCTAGG 11100

11101 TATGACTGTTGGGGCCCTACTAGTGACTCAGTCCAAGGGAGTCACAGGAT 11150  
|||||  
11101 TATGACTGTTGGGGCCCTACTAGTGACTCAGTCCAAGGGAGTCACAGGAT 11150

---

11151 ATAGAAATGCAAGTAGTTTAATAACTGGGAACCTGATATACACCCGGCCC 11200  
|||||

11151 ATAGAAATGCAAGTAGTTTAATAACTGGGAACCTGATATACACCCGGCCC 11200

11201 TCAGAGCTTTCCATCCTGGTGCAGCCTTCTGATGGAGAAGTGGGAATAGA 11250  
|||||

11201 TCAGAGCTTTCCATCCTGGTGCAGCCTTCTGATGGAGAAGTGGGAATAGA 11250

11251 ATTGCCAGTTCAGCCACGGCTTGTCTTCTGGATGAGAAGAATGAGAGAG 11300  
|||||

11251 ATTGCCAGTTCAGCCACGGCTTGTCTTCTGGATGAGAAGAATGAGAGAG 11300

11301 TAGAGTCTTTGGGTCTCCCCTCAGAACCCTGGATTATTTTCTCTCTA 11350  
|||||

11301 TAGAGTCTTTGGGTCTCCCCTCAGAACCCTGGATTATTTTCTCTCTA 11350

11351 GAGGGAGCATCTGAATCAGTGCCTTAAAGGGTGTACCCTGGCAGAAACACG 11400  
|||||

11351 GAGGGAGCATCTGAATCAGTGCCTTAAAGGGTGTACCCTGGCAGAAACACG 11400

11401 GGATGGCTATGTGACCTTTTCTAGATTGGCTGTCTTGATCTCTGGGTCAA 11450  
|||||

11401 GGATGGCTATGTGACCTTTTCTAGATTGGCTGTCTTGATCTCTGGGTCAA 11450

11451 ACTGGCACTTGTTTTTACTGTTATATCCCCTCCAGGTAATAATTTTACA 11500  
|||||

11451 ACTGGCACTTGTTTTTACTGTTATATCCCCTCCAGGTAATAATTTTACA 11500

11501 GCTCGATCAAGGGCCTTCGTTGTCTTGCCTGTGGCTAGCAAGGAGAGATC 11550  
|||||

11501 GCTCGATCAAGGACCTTCGTTGTCTTGCCTGTGGCTAGCAAGGAGAGATC 11550

11551 AACTATCATCTTGACCTTGTCCCTGTGCTCAGTGGCATCATGGGTGGCTC 11600  
|||||

11551 AACTATCATCTTGACCTTGTCCCTGTGCTCAGTGGCATCATGGGTGGCTC 11600

11601 TGAGCTGTCTCGTTTGCTGCTGGTTAAGAAAAGCAAAACCAGAAAATA 11650  
|||||

11601 TGAGCTGTCTCGTTTGCTGCTGGTTAAGAAAAGCAAAACCAGAAAATA 11650

11651 AAACCAGAAGACATATCTGAATCCCAGGCTAAGGAACAAAAGAAGAATAC 11700  
|||||

11651 AAACCAGAAGACATATCTGAATCCCAGGCTAAGGAACAAAAGAAGAATAC 11700

11701 CCATAATTCCTCCAAACCCAGAGGACTACAAGCAAAGACAGCAAAAGAGA 11750  
|||||

11701 CCATAATTCCTCCAAACCCAGAGGACTACAAGCAAAGACAGCAAAAGAGA 11750

11751 ACACTTTGATGGGAGAAGATATGAGAATGAAGGTCATGCAGGGAATGCAG 11800  
|||||

11751 ACACTTTGATGGGAGAAGATATGAGAATGAAGGTCATGCAGGGAATGCAG 11800

11801 AGCCAGTTTCCCAACACTCAATGGATGGAGTGTCCAAAAGGAAAGTTAG 11850  
|||||

11801 AGCCAGTTTCCCAACACTCAATGGATGGAGTGTCCAAAAGGAAAGTTAG 11850

11851 CCGCCTTGCTGTTACAGAGGAAAGAACAACACTACACCTGCCCAAAGATTC 11900  
|||||

11851 CCGCCTTGCTGTTACAGAGGAAAGAACAACACTACACCTGCCCAAAGATTC 11900

---

```

11901 CCAGAATCACCTGTGTTCCAGGATCTCTTGCTCAGCAGCTGACACTGCAG 11950
      |
11901 CCAGAATCACCTGTGTTCCAGGATCTCTTGCTCAGCAGCTGACACTGCAG 11950
      |
11951 GAGCCTGGGAACTGGCAGGAGGCCCAACAGCAGTTGCTCAGATAACCAGCT 12000
      |
11951 GAGCCTGGGAACTGGCAGGAGGCCCAACAGCAGTTGCTCAGATAACCAGCT 12000
      |
12001 GGCAGGCCGCAATCAGCTGCTCCTGTTACGCCCAGACCTCAGGCAAGAGA 12050
      |
12001 GGCAGGCCGCAATCAGCTGCTCCTGTTACGCCCAGACCTCAGGCAAGAGA 12050
      |
12051 GGAAACAGGGTCAGGAGCCTAGCCAGCTGGACAAAGGGAGTGACTGCACT 12100
      |
12051 GGAAACAGGGTCAGGAGCCTAGCCAGCTGGACAAAGGGAGTGACTGCACT 12100
      |
12101 GGACTGTCTCAAGAGAAGGCCACTTGCATTCCCACTGAGACTTTCAGCCT 12150
      |
12101 GGACTGTCTCAAGAGAAGGCCACTTGCATTCCCACTGAGACTTTCAGCCT 12150
      |
12051 CCATACTGCTCCACCAGAAACCATCCAGTAA 12180
      |
12151 CCATACTGCTCCACCAGAAACCATCCAGTAA 12180

```

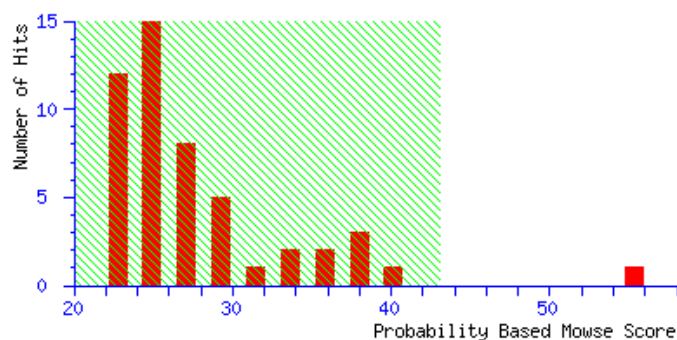


## 2. Ergebnisse der Massenspektrometrie

### 2.1 Calmodulin

#### **MASCOT** Mascot Search Results

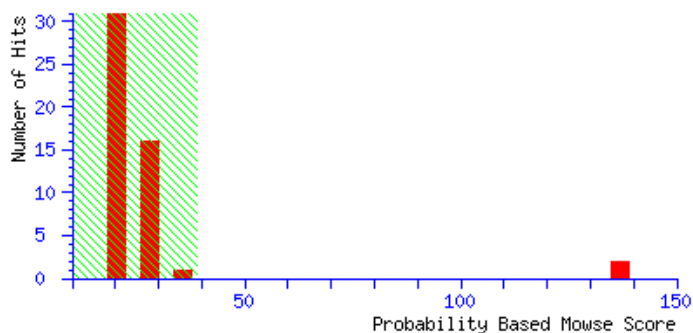
User :  
 Email :  
 Search title : Auto submitted by BioTools  
 Database : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)  
 Taxonomy : Mammalia (mammals) (49828 sequences)  
 Timestamp : 16 Nov 2009 at 08:52:56 GMT  
 Protein hits : [CALM\\_BOVIN](#) Calmodulin (CaM) - Bos taurus (Bovine)  
[PGT1\\_MOUSE](#) Geranylgeranyl transferase type-1 subunit beta (EC 2.5.1.59) (Geranylgeranyl transferase type-1 subunit beta)  
[TAOK1\\_HUMAN](#) Serine/threonine-protein kinase TAO1 (EC 2.7.11.1) (Thousand and one amino acid protein 1) (TAOK1)  
[KIF2A\\_BOVIN](#) Kinesin-like protein KIF2A - Bos taurus (Bovine)  
[ZIMP7\\_HUMAN](#) PIAS-like protein Zimp7 - Homo sapiens (Human)  
[EPHB6\\_HUMAN](#) Ephrin type-B receptor 6 precursor (Tyrosine-protein kinase-defective receptor EPH-6) (HEP-6)  
[DNS2B\\_MOUSE](#) Deoxyribonuclease-2-beta precursor (EC 3.1.22.1) (Deoxyribonuclease II beta) (DNase II beta)  
[BRCA2\\_MOUSE](#) Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog (Fanconi anemia group D1 protein homolog)  
[FMN2\\_HUMAN](#) Formin-2 - Homo sapiens (Human)  
[TTL5\\_HUMAN](#) Tubulin--tyrosine ligase-like protein 5 (SRC1 and TIF2-associated modulatory protein) - Homo sapiens (Human)



### 2.2 $\beta$ - Tubulin

#### **MASCOT** Mascot Search Results

User :  
 Email :  
 Search title : Auto submitted by BioTools  
 Database : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)  
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (15720 sequences)  
 Timestamp : 11 Nov 2009 at 15:07:05 GMT  
 Protein hits : [TBB2A\\_HUMAN](#) Tubulin beta-2A chain - Homo sapiens (Human)  
[TBB2C\\_HUMAN](#) Tubulin beta-2C chain (Tubulin beta-2 chain) - Homo sapiens (Human)  
[EDD1\\_HUMAN](#) Ubiquitin-protein ligase EDD1 (EC 6.3.2.-) (Hyperplastic discs protein homolog) (hHYD) (Prog)  
[IF4G3\\_HUMAN](#) Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 3 (eIF-4-gamma 3) (eIF-4G 3) (eIF4G 3) (eIF-4G)  
[APOL5\\_HUMAN](#) Apolipoprotein-L5 (Apolipoprotein L-V) (ApoL-V) - Homo sapiens (Human)  
[TBCD5\\_HUMAN](#) TBC1 domain family member 5 - Homo sapiens (Human)  
[ABLIM1\\_HUMAN](#) Actin-binding LIM protein 1 (Actin-binding LIM protein family member 1) (abLIM-1) (Actin-binding LIM protein)  
[CPIN1\\_HUMAN](#) Anamorsin (Cytokine-induced apoptosis inhibitor 1) (CUA001) - Homo sapiens (Human)  
[CCD62\\_HUMAN](#) Coiled-coil domain-containing protein 60 (Aaa-protein) (Protein TSP-NY) - Homo sapiens (Human)  
[PCLO\\_HUMAN](#) Protein piccolo (Aczonin) - Homo sapiens (Human)



## 2.3 Aktin

### *{MATRIX}* Mascot Search Results

User :  
 Email :  
 Search title : Auto submitted by BioTools  
 Database : SwissProt 51.6 (257964 sequences; 93947433 residues)  
 Taxonomy : Homo sapiens (human) (15720 sequences)  
 Timestamp : 11 Nov 2009 at 15:09:08 GMT  
 Protein hits : [ACTC\\_HUMAN](#) Actin, alpha cardiac muscle 1 (Alpha-cardiac actin) - Homo sapiens (Human)  
               : [ACTB\\_HUMAN](#) Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) - Homo sapiens (Human)  
               : [TITIN\\_HUMAN](#) Titin (EC 2.7.11.1) (Connectin) (Rhabdomyosarcoma antigen MU-RMS-40.14) - Homo sapiens (Human)  
               : [UBP53\\_HUMAN](#) Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53 (Inactive ubiquitin-specific peptidase 53)  
               : [PRDM4\\_HUMAN](#) PR domain zinc finger protein 4 (PR domain-containing protein 4) - Homo sapiens (Human)  
               : [MUC16\\_HUMAN](#) Mucin-16 (Ovarian carcinoma antigen CA125) (Ovarian cancer related tumor marker CA125) (CA-1:  
               : [ZN295\\_HUMAN](#) Zinc finger protein 295 (Zinc finger and BTB domain-containing protein 21) - Homo sapiens (H  
               : [PLEC1\\_HUMAN](#) Plectin-1 (PLTN) (PCN) (Hemidesmosomal protein 1) (HD1) - Homo sapiens (Human)  
               : [ANPRC\\_HUMAN](#) Atrial natriuretic peptide clearance receptor precursor (ANP-C) (ANPRC) (NPR-C) (Atrial natri:  
               : [IF4G2\\_HUMAN](#) Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2 (eIF-4-gamma 2) (eIF-4G 2) (eIF4G 2) (p97

