

**Untersuchungen zur Expression der murinen Gene Pkd1 und
Pkd2, den orthologen Genen der Autosomal Dominanten
Polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld

vorgelegt von Karl Hackmann

aus Dresden

geb. am 20.10.1969 in Vechta

April 2005

In dankbarer Erinnerung an meine Mutter.

1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE AUTOSOMAL DOMINANTE POLYZYSTISCHE NIERENKRANKHEIT (ADPKD)	1
1.1.2 Die ADPKD in der Niere	2
1.1.3 Extrarenale Komplikationen der ADPKD	4
1.2 DAS PKD1- GEN	6
1.2.1 Polycystin-1	8
1.3 DAS PKD2- GEN	15
1.3.1 Polycystin-2	15
1.4 ADPKD UND PRIMÄRE CILIEN	19
1.5 POLYCYSTIN- VERWANDTE PROTEINE	20
1.6 TIERMODELLE POLYZYSTISCHER NIERENERKRANKUNGEN	23
1.6.1 Mutagenese des murinen Pkd1- Gens	23
1.6.2 Mutagenese des murinen Pkd2- Gens	24
1.6.3 Tiermodelle mit unbekannter genetischer Ursache	24
1.6.4 Tiermodelle der Autosomal Rezessiven Polyzystischen Nierenkrankheit (ARPKD)	25
ZIELE DIESER ARBEIT	26
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 BEZUGSFIRMEN	27
2.2 GERÄTE	28
2.3 KULTIVIERUNG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> -KULTUREN	29
2.3.1 Das LacZ-Gen als Selektionsmarker	30
2.3.2 Das ccd-Gen in pZErO als Selektionsmarker	31
2.3.3 Verwendete <i>Escherichia coli</i> Bakterienstämme	31
2.3.4 Gefrierkulturen von <i>E. coli</i>	32
2.3.5 Elektrokompente Zellen	32
2.3.6 Transformation von DNA in Bakterien	33
2.3.6.1 Elektroporation	33
2.3.6.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	33
2.3.7 „ET-Cloning“	34
2.3.8 Elektrokompente Zellen für das „ET-Cloning“	35
2.3.9 Plasmidvektoren	35
2.4 DNA ISOLIERUNG	36
2.4.1 Plasmidpräparation (Miniprep)	36
2.4.2 Plasmidpräparationen mit Ionenaustauschersäulen	37
2.4.3 DNA Isolierung aus Gewebeproben/ Phenol-Chloroform-Fällung	37
2.4.4 DNA-Fällung mit Ethanol	37
2.4.5 DNA-Fällung mit Isopropanol	38
2.5 RNA-ISOLIERUNG AUS GEWEBEPROBEN UND ZELLKULTUREN	38
2.5.1 RNA Isolierung mit TRIzol® Reagent	38
2.5.2 RNA-Isolierung mit RNeasy Kit (Qiagen)	39
2.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN VON NUKLEINSÄUREN	39
2.7 GELELEKTROPHORESE VON DNA FRAGMENTEN	39
2.7.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.8 SOUTHERN TRANSFER (SOUTHERN BLOT)	41
2.9 DNA-DNA-HYBRIDISIERUNG	41
2.9.1 Radioaktive DNA-Sonden	41
2.9.2 Nicht-radioaktive DNA-Sonden	42
2.9.3 Radioaktive Hybridisierung	42
2.9.4 Nichtradioaktive Hybridisierung	42
2.10 ENZYMATISCHE BEHANDLUNG VON NUKLEINSÄUREN	44
2.10.1 DNA-Restriktion	44
2.10.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden	44
2.10.3 Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Enzym	44
2.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten	45
2.10.5 Klonierung von PCR-Produkten	45
2.11 POLYMERASE-KETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	45

2.11.1 Standard PCR-Reaktionen.....	46
2.11.2 Spezielle PCR-Reaktionen.....	46
2.12 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA	48
2.13 DNA-SEQUENZIERUNG	48
2.13.1 ALF-DNA-Sequencer	48
2.13.2 ABI PRISM® 310 und ABI PRISM ®3700	49
2.14 QUANTITATIVE PCR.....	50
2.15 ZELLKULTUR	52
2.15.1 Einfrieren der Zellen.....	53
2.15.2 Auftauen der Zellen.....	54
2.15.3 Isolierung translatierter RNA aus membrangebundenen Polysomen	54
2.15.4 Transfektionen	54
2.15.5 Immunofluoreszenz von HeLa-Zellen.....	55
2.15.6 Immunopräzipitation der Polycystine (nach Hanaoka et al., 2000).....	55
2.16 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	56
2.17 PROTEINTRANSFER AUF MEMBRANEN (WESTERN BLOT)	58
2.18 TIERHALTUNG	58
2.19 ERZEUGUNG TRANSGENER MÄUSE	59
2.19.1 Nachweis des Transgens	59
2.19.2 LacZ-Färbung von Embryonen	59
2.20 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN EMBRYOSEKTIONEN VON MÄUSEN.....	60
3 ERGEBNISSE (TEIL 1)	62
ERZEUGUNG VON TRANSGENEN PKD1 MAUSLINIEN.....	62
3.1 IMMUNHISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MAUSEMBRYONEN	62
3.2 SCREENING EINER MURINEN, GENOMISCHEN DNA-BANK AUF PKD 1-FRAGMENTE	65
3.2.1 SUBKLONIERUNG UND PARTIELLE SEQUENZIERUNG DES BACS 423D1	65
3.3 KONSTRUKTION EINES GENOMISCHEN PKD1-FRAGMENTS MIT MARKERGEN	67
3.3.1 Erzeugung des Pkd1-Transgen-Konstruktes durch homologe Rekombination in E. coli mittels „ET-Cloning“	69
3.4 TEST DER TRANSGENEN KONSTRUKTE IM ZELLKULTUREXPERIMENT	72
3.5 ANALYSE DER TRANSGENEN MÄUSE.....	72
3.5.1 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens.....	73
3.5.2 Expression des Pkd1-Transgens in Mäusen.....	74
3.5.3 Methylierung des Pkd1-Transgens.....	74
4 ERGEBNISSE (TEIL 2)	76
SPLEIßVARIANTEN DER HUMANEN PKD2-UND DES MURINEN PKD2-GENS.....	76
4.1 ALTERNATIVE TRANSKRIPTE DES HUMANEN PKD2-UND DES MURINEN PKD2-GENS	76
4.1.1 Amplifikation des codierenden Bereichs des PKD2/ Pkd2-Gens.....	76
4.1.2 Spleißvarianten des murinen und humanen PDK2/ Pkd2	77
4.1.3 PKD2Δ6 und Pkd2Δ6	78
4.1.4 PKD2Δ7 und Pkd2Δ7	79
4.1.5 PKD2Δ9 und Pkd2Δ9	80
4.1.6 PKD2 Δ12-13 und Pkd2Δ12-13.....	80
4.2 CHARAKTERISIERUNG DER PKD2/ PKD2Δ7 SPLEIßVARIANTEN	81
4.2.1 Nachweis der PKD2Δ7-Spleißvariante in membrangebundenen Polysomen	81
4.2.2 Die Pkd2Δ7-Spleißvariante in verschiedenen Geweben	82
4.2.3 Quantitative Charakterisierung der Pkd2-und Pkd2Δ7-Transkripte	83
4.2.4 Quantifizierung der Pkd2-und Pkd2Δ7-Expression am Embryonaltag 16,5	84
4.2.5 Quantifizierung der Pkd2-und Pkd2Δ7-Expression in neugeborenen Mäusen.....	86
4.2.6 Quantifizierung der Pkd2-und Pkd2Δ7-Expression in adulten Mäusen	87
4.3 ZELLKULTUREXPERIMENTE MIT PKD2, PKD2Δ7	89
4.3.1 Fusionsproteine in „Living-Color“-Vektoren.....	89
4.3.2 Antikörper gegen Polycystin-2 und Polycystin-2Δ7.....	91
4.3.3 (Co-) Immunopräzipitationsexperimente	92
4.4 COMPUTERGESTÜTZTE ANALYSE DER PKD2/ PKD2Δ7-VARIANTEN	94
5 DISKUSSION (TEIL 1)	97

5.1 REPORTERGENE UNTER DER PROMOTORKONTROLLE VON PKD1/ EXPRESSION VON POLYCYSTIN-1 IN MÄUSEN	97
6 DISKUSSION (TEIL 2)	102
6.1 ALTERNATIVE SPLEIBFORMEN DER PKD2/PKD2-TRANSKRIPTE	102
6.2 KRITISCHE BETRACHTUNG DER ZELLKULTUREXPERIMENTE	108
6.3 SPLEIBFORMEN DER POLYCYSTIN-ÄHNLICHEN GENE UND DER NMD-STOFFWECHSELWEG	109
6.4 FUNKTIONELLE RELEVANZ VON PKD2 Δ 7/PKD2 Δ 7 UND PKD2 Δ 12-13/PKD2 Δ 12-13	110
7 LITERATURVERZEICHNIS	113
8 ANHANG	138
8.1 ERMITTELTE SEQUENZ UM DAS EXON 1 DES MURINEN PKD1-GENS	138
8.1.1 <i>Analyse des sequenzierten Abschnitts mit dem Repeatmasker</i>	140
8.2 VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	144
9 ZUSAMMENFASSUNG.....	152
10 DANKSAGUNGEN	154

1 Einleitung

1.1 Die Autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit (ADPKD)

Die Autosomal Dominante Polyzystische Nierenkrankheit (ADPKD) ist eine der häufigsten monogenetischen, hereditären Erkrankungen des Menschen, die unbehandelt zum Tode führen. Die Prävalenz der Krankheit liegt bei mindestens 1: 1000 und ist verantwortlich für 8- 10% aller Fälle völligen Nierenversagens (Gabow, 1993). Ursächlich für die Erkrankung sind Mutationen in mindestens drei Genen (Daoust et al., 1994; de Almeida et al., 1995; Bogdanova et al., 1995). PKD1 und PKD2 sind die zwei bisher bekannten Gene, die in über 99% der Fälle von ADPKD mutiert sind. Obwohl der Name anderes implizieren könnte, handelt es sich bei der ADPKD um eine systemische Erkrankung, die neben der Niere auch die Leber, das Herz, den Gastrointestinaltrakt sowie das Gehirn und verschiedene andere Organe betreffen kann. Die hohe Komplexität der Erkrankung spiegelt sich u. a. in den vielen, zum Teil sehr widersprüchlichen Beobachtungen und experimentellen Erkenntnissen wider.

Obwohl die Krankheit „autosomal dominant“ heißt, handelt es sich auf zellulärer Ebene zunächst um einen rezessiven Mechanismus. Voraussetzung ist eine Keimbahnmutation in einem der PKD1 bzw. PKD2- Allele. Es muss jedoch eine zweite somatische Mutation („second hit“) folgen (Germino, 1997), um beispielsweise eine Zystenbildung zu initiieren. Dieses Ereignis, Verlust der Heterozygotie (LOH, Loss Of Heterozygosity), tritt offenbar immer ein (Qian et al., 1996). Wie gezeigt wurde, kann auch die auslösende somatische Mutation auf dem jeweils anderen Gen liegen, sprich PKD1 mit einer Keimbahnmutation und PKD2 mit einer somatischen Mutation bzw. umgekehrt (Koptides et al., 1999; Watnick et al., 2000). In diesem Fall spricht man von Transheterozygotie. Keimbahnmutationen in beiden Allelen eines PKD- Gens sind perinatal letal, wie Experimente mit Mäusen gezeigt haben.

1.1.2 Die ADPKD in der Niere

Namensgebend für die Erkrankung ist die langsam voranschreitende Vergrößerung flüssigkeitsgefüllter Zysten in beiden Nieren, die bei 45% der Patienten zum völligen Nierenversagen bis zum 60. Lebensjahr führt (Gabow et al., 1992). Die Nieren können dabei auf ein Vielfaches ihres ursprünglichen Gewichts und Volumens anwachsen. Obwohl 20% der Patienten eine erhöhte hyperplastische bzw. neoplastische Proliferation im Nierengewebe zeigen, entwickeln sich relativ selten maligne Tumore (Gregoire et al., 1987).

Eine erste Auffälligkeit der Erkrankung ist ein qualitativer Verlust bei der Konzentrationerhöhung des Urins, wobei chronische Niereninsuffizienz in einem Alter von 2- 80 Jahren auftreten kann, u.a. abhängig von der Art des genetischen Defekts (Hateboer et al., 1999 und 2000). Obwohl es sich um eine vererbte Erkrankung handelt, ist der Verlauf individuell. Das Auftreten finalen Nierenversagens, einem Hauptmerkmal der ADPKD, kann innerhalb einer Familie um 15 bis 30 Jahre variieren (Zerres und Rudnik-Scoenborn, 1995).

Weitere ADPKD- Symptome der Niere sind gestörte endokrine Funktionen, die sich in erhöhter Renin- und Erythropoetin- Ausschüttung bemerkbar machen. Daraus leitet sich ein anderer wesentlicher Faktor für den Krankheitsverlauf ab: arterieller Bluthochdruck. Dieser wird möglicherweise durch die Aktivierung des Renin-Angiotensin- Systems (RAS, s.u.) aufgrund des erhöhten Reninspiegels hervorgerufen (Bell et al., 1988). Angiotensin II könnte zudem zur Zystenbildung beitragen, da es sich wie ein Wachstumsfaktor auf die epithelialen Zellen der proximalen Tubuli der Niere auswirkt (Wolf und Neilson, 1993).

Die Entstehung flüssigkeitsgefüllter Nierenzysten ist auf das Zusammenspiel verschiedener Faktoren zurückzuführen. Primäre Zellkulturen aus Zystengewebe zeigen erhöhte Zellteilungsraten (Wilson et al., 1992). Antigene, die Hyperproliferation

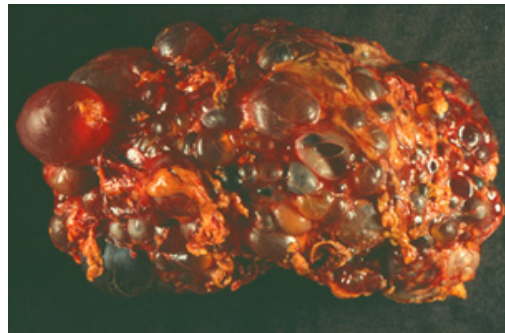


Abb. 1: Polyzystische Niere

einer 48 Jahre alten Frau. Während eine normale Niere nur etwa 150 g wiegt, kann eine polyzystische Niere ein Gewicht von über 4 kg erreichen (freundlichst überlassen von N. Gassler)

<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Anatomie/Witzgall/Forschung>.

undifferenzierten Gewebes anzeigen, konnten in diesem Gewebe ebenfalls nachgewiesen werden (Klingel et al., 1992; Nadasty et al., 1995). Stimulierung von Mäusen mit Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Transformierenden Wachstumsfaktor α (TGF α) und Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF) führen zu vergrößerten Nieren und zur Ausbildung von Zysten (Ogborn et al., 1996; Nauta et al., 1995). In diesen Experimenten konnte zudem gezeigt werden, dass biliäre Epithelien aus an ADPKD erkrankten Mäusen hypersensitiv auf EGF, Hydrokortison und Insulin reagieren. Erhöhte Zellproliferation wird als ein wesentlicher Faktor der Zystenbildung angesehen. Zusätzlich kommt es im Bereich der proliferierenden Zellen zur Apoptose angrenzenden tubulären Epithels (Woo, 1995; Winyard et al., 1996; Lanoix et al., 1996).

Wahrscheinlich beruht die Flüssigkeitsansammlung in den Zysten u. a. auf einer veränderten Polarität des die Zysten umgebenden Epithels. Ein Cl⁻-Transporter (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), der anstatt basolateraler Lokalisation in ADPKD- Geweben apikal zu finden ist (Sullivan et al., 1998), sekretiert, stimuliert durch intrazelluläres cAMP, Chlorid- Ionen in das Lumen der Tubuli. Basolateral gelagerte Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter und Kaliumkanälen gleichen den Verlust wieder aus, was einen Nettoausstrom an Cl⁻ zur Folge hat. Das so erhöhte, negative transepitheliale Potential hat, wie angenommen wird, einen passiven Nachstrom an Na⁺ durch die Zellzwischenräume zur Folge. Jedoch wird diese Annahme kontrovers diskutiert (s.u., Na⁺-K⁺-ATPase). Diesem fehlgerichteten Ionentransport bzw. -fluss folgt ein Flüssigkeitsstrom (Sullivan et al., 1998). Zudem wurde gezeigt, dass ADPKD- Epithelien der distalen und proximalen Tubuli eine stark verringerte Fähigkeit haben, Wasser und gelöste Stoffe zu absorbieren, was insgesamt eine Erklärung für die o. g. verminderte Harn- Konzentrationsfähigkeit bietet. Hinsichtlich der Lokalisation einer Na⁺-K⁺-ATPase gibt es verschiedene Ansichten. Während ein Befund ist, dass sie nur auf der apikalen Seite zystischer Epithelien lokalisiert ist und aktiv Na⁺ in das Lumen der Tubuli pumpt (Wilson et al., 1991), finden andere die Ionenpumpe nur auf der basolateralen Seite (Brill et al., 1996).

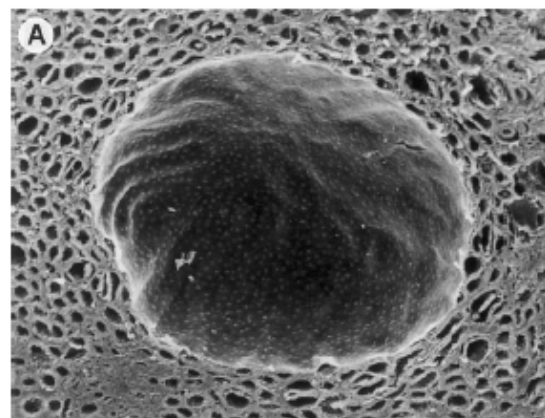


Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nierenzystenquerschnitts eines ADPKD Patienten (Sullivan et al., 1998)

Apikal fehlpositionierte Epidermale Wachstumsfaktor (EGF)- Rezeptoren sowie die Sekretion von EGF in das Lumen zystischen Epithels begünstigen die Zellproliferation (Wilson, 1997). Das proliferierende Gewebe bildet zunächst Zysten, die in Richtung der Tubuli geöffnet sind, so dass die Microzysten zunächst mit nicht reabsorbiertem Filtrat der Glomeruli gefüllt sind. Ab einer Größe von ca. 200µm Durchmesser schließt die Zyste die Öffnung zu den Tubuli und es kommt zur Flüssigkeitsansammlung durch die oben beschriebene veränderte Polarität (Grantham and Wallace 2002). Eine andere in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung ist, dass EGF die Amilorid- sensitive Natrium-Absorption der Nierentubuli inhibiert (Shen und Cotton, 2002).

Weitere grundlegende Auffälligkeiten im Nierengewebe von ADPKD Patienten sind verdickte Basalmembranen des epithelialen Gewebes. Schon vor der Bildung von Zysten konnten diese in Biopsiematerial junger ADPKD- Träger gezeigt werden (Cowley et al., 1993; Zeier et al., 1992). Der Grund dafür liegt in einer verstärkten Fibrinogenese, ausgelöst durch erhöhte Expression von $\alpha 1$ - Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin (Klingel et al., 1993; Calvet et al., 1993). Andere Störungen der extrazellulären Matrix konnte in einem Modell der polyzystischen Nierenkrankheit in Ratten entdeckt werden, die sich in Form von veränderten Proteoglykanen äußerte (Ehara et al., 1994). Zudem wurde entdeckt, dass eine herabgesetzte Syntheserate und verspätete Prozessierung von Glykoproteinen den Einbau dieser Proteine in die extrazelluläre Matrix in ADPKD Gewebe stören (Carone et al., 1993). Diese Veränderungen der extrazellulären Matrix werden als ein wesentlicher Faktor der Zystenbildung angesehen.

1.1.3 Extrarenale Komplikationen der ADPKD

Neben den beschriebenen Störungen in der Niere treten auch massive nicht renale Störungen auf, die lebensbedrohlich sein können. Generell unterscheidet man hier zwischen zystischen und nicht- zystischen Manifestationen.

Von Zysten betroffen sind beispielsweise die biliären Tubuli der Leber. Diese treten häufig bei Frauen mit früher Niereninsuffizienz auf, obwohl der Verlauf der ADPKD bei Frauen in der Regel milder ist als bei Männern (Gabow et al., 1992; Gretz et al., 1989). Allgemein treten Leberzysten im Vergleich zu Nierenzysten relativ spät auf, sind aber in 75% der Patienten über 60 zu finden und besonders häufig in Patienten mit Nierentransplantaten (Harris et al., 1996). Zysten werden des Weiteren in Pankreas,

Ovarien und der Milz gefunden. Zu dieser Gruppe gehören auch zerebrale, arterielle Aneurismen, die mit 4% Prävalenz in ADPKD Patienten häufiger auftreten als im dem mit 1% betroffenen Rest der Bevölkerung (Chapman et al., 1992) und zu akuten Hirnblutungen führen können.

Nicht- zystische Begleiterscheinungen sind Herzklappendefekte, hier hauptsächlich Insuffizienz der Mitralklappe und Aortenklappe, sowie gastrointestinale Divertikel. Wie bei fast allen Erkrankungen der Niere spielt arterieller Bluthochdruck im Zusammenhang mit Niereninsuffizienz und Nierenversagen eine sehr wichtige Rolle. Bislang wurde davon ausgegangen, dass es durch Wachstum und Ausdehnung der Zysten zur Ischämie in kleinen Blutgefäßen des Nierengewebes kommt. Ischämie renalen Gewebes löst die Aktivierung des juxtaglomerulären Apparates aus und führt so zur Erhöhung der Reninausschüttung, wodurch es schließlich zur Bildung von Angiotensin II kommt, was Vasokonstriktion und Erhöhung der Na⁺-Konzentration des Blutes nach sich zieht. In ADPKD Patienten wurden erhöhte Reninspiegel festgestellt (Bell et al., 1988). Die häufig eingesetzten Inhibitoren des Angiotensin- konvertierenden Enzyms (ACE) haben in ADPKD Patienten jedoch keine positiven Auswirkungen (Maschio et al., 1996).

Neuere Untersuchungen legen nahe, dass nicht das Renin- Angiotensin- System (RAS) für den Bluthochdruck in diesen Patienten verantwortlich ist (Ramunni et al., 2004). Es wurde in ADPKD- Patienten mit Bluthochdruck im Vergleich zu normalen Blutdruck- Patienten ein erhöhter Spiegel an Endothelin (ET-1) gefunden. Es wird angenommen, dass ET-1 durch proliferierende Epithelzellen der Tubuli sekretiert wird (Giusti et al.,1995) ET-1 führt wie Angiotensin-II zur Vasokonstriktion, wobei in ADPKD- Patienten die Vasodilatation gestört ist, was möglicherweise auf eine reduzierte Stickoxid- Synthese (NOS) zurückführbar ist (Wang et al., 2000; Al Nimri et al, 2003). Stickoxid wirkt erweiternd auf Blutgefäße.

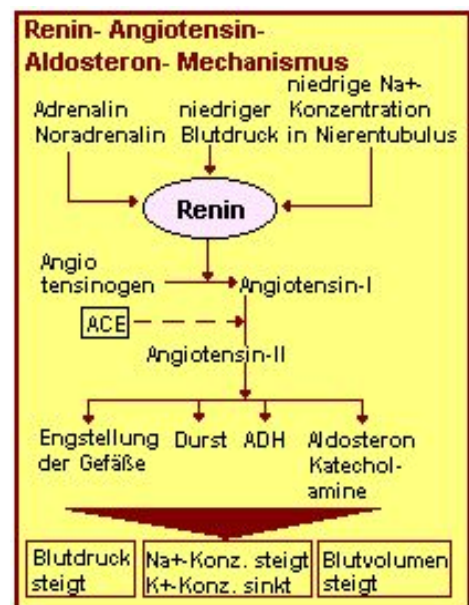


Abb.3: Das Renin- Angiotensin- System (RAS)
<http://www.medizininfo.de/urologie/anatomie/blutdruckregulation.shtml>

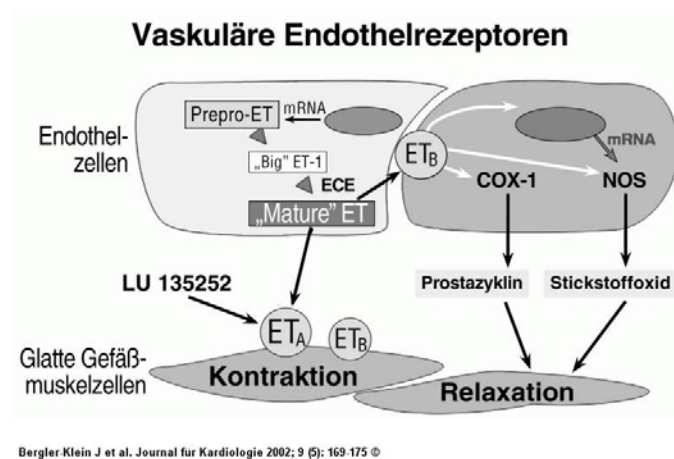


Abb.4: Endothelinrezeptoren und Wirkung eines selektiven ET-A-Antagonisten

Endotheliale ET-B-rezeptorabhängige Vasodilatation via NO und Prostazyklin sowie Clearance von ET bleiben erhalten. Der ET-B-Rezeptor besitzt eine duale Funktion und bewirkt an der glatten Muskelzelle auch eine Vasokonstriktion
<http://www.kup.at/journals/abbildungen/1060.html>

1.2 Das PKD1- Gen

Bei ca. 85% der ADPKD- Patienten sind krankheitsauslösende Mutationen im PKD1- Gen zu finden. Das Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosom 16 (Position 16p13.3) zu finden und erstreckt sich dort über ca. 54 kb mit einem GC- Gehalt von 62,4% (The American PKD1 Consortium, 1995). In unmittelbarer Nähe befindet sich das TSC2- Gen, wobei die beiden Enden der Gene nebeneinander liegen und TSC2 in telomerischer Richtung, PKD1 in zentromerischer Richtung zu finden ist. PKD1 befindet sich auf einem duplizierten Segment mit mehreren Wiederholungen des Gens (16p13.1) bis auf dessen letzten 3,5 kb (Harris et al., 1994). In dieser Region befinden sich mindestens vier zu PKD1 homologe Gene, von denen drei identifiziert wurden: HG-a, HG-B und HG-C (The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994). Das Transkript von PKD1 ist ca. 14,1 kb lang und Transkripte von mindestens drei homologen Genen mit 21 kb (HG-A), 17 kb (HG-B) und 8,5 kb (HG-C) treten zudem auf. Obwohl die Transkripte der homologen Gene polyadenyliert sind, handelt es sich um Pseudogene mit vielen vorzeitigen Stoppcodons, die nicht translatiert werden (Bogdanova et al., 2001). In nachfolgender Arbeit wurde gezeigt, dass die Pseudogene sich ausschließlich auf den Menschen beschränken und schon in Primaten nicht mehr zu entdecken sind (Bogdanova et al, 2002a)

Insgesamt findet man im PKD1- Gen 46 Exons, wobei eine alternative Spleißform entdeckt wurde, bei der das Exon 17 deletiert ist. Diese Variante wird allerdings als die Hauptform angesehen, da in einem Transkript mit Exon 17 eine vorzeitige Translationstermination am Codon 743 erfolgen würde (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Hughes et al., 1995). Ähnlich trunkierte Proteine findet man in ADPKD- Patienten (Bogdanova et al., 2002b)

Homologe Gene zum PKD1 sind in vielen Spezies entdeckt worden, angefangen von Mammalia über Teleosten (*Fugu rubripes*, Sandfort et al., 1997) bis hin zu den Nematoden (*Caenorhabditis elegans*, LOV-1, Barr und Sternberg, 1998). Das homologe Gen der Maus Pkd1 liegt Auf Chromosom 17 in einem Bereich der Syntenie zum humanen Chromosom 16. Genau wie im humanen Genom liegen Pkd1 und Tsc2 auch hier direkt nebeneinander (Germino, <http://www.hosppract.com/genetics/9703gen.htm>)

Die Nukleotid- und die resultierende Aminosäuresequenz sind zu 79% identisch (Löhning et al., 1996). Interessanterweise sind spontane Mutationen im Pkd1- Gen, die zur ADPKD führen, in Mäusen nicht bekannt. Man vermutet, dass zwei Polypyrimidintrakte in den Introns 21 und 22 von PKD1, die im murinen Genom nicht vorhanden sind, ursächlich sein könnten (Piontek und Germino, 1999). Während der RNA- Synthese könnte es in diesem Bereich zur Ausbildung von Triplehelices kommen, die die Transkription blockieren und so eine Schädigung der DNA auslösen. Mutationen würden dann wegen der häufigen Reparatur dieses DNA- Stranges durch die Fehlerrate der Reparatursmechanismus ausgelöst (Wang et al., 1996).

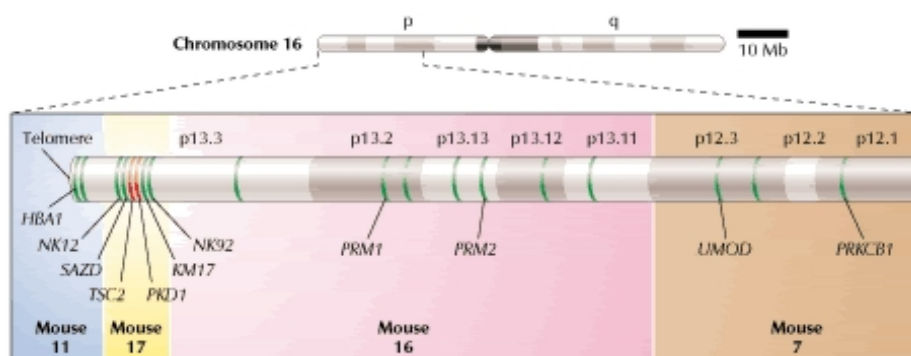


Abb. 5: Das humane Chromosom 16 im Vergleich zu syntenischen Bereichen der murinen Chromosomen

<http://www.hosppract.com/genetics/9703gen.htm>

1.2.1 Polycystin-1

Das PKD1- Genprodukt Polycystin-1 besteht aus 4302 Aminosäuren (AS) mit einem Molekulargewicht von ca. 460 kDa. Neben dieser Form findet man eine glykosilierte mit einem Molekulargewicht von über 520 kDa (Van Adelsberg et al., 1997). Der sehr große extrazelluläre Teil weist viele verschiedene Domänen auf, über deren Funktion wenig bekannt ist. Als erstes Element findet man ein 23 AS langes, hydrophobes Signal-Peptid, gefolgt von einer cystein-reichen Wiederholung, deren Motiv sich in Exon 4 wiederholt und die beiden leucinreichen Wiederholungen (LRR, *leucine rich repeat*), codiert von Exon 2 und 3, flankiert. Ein LRR

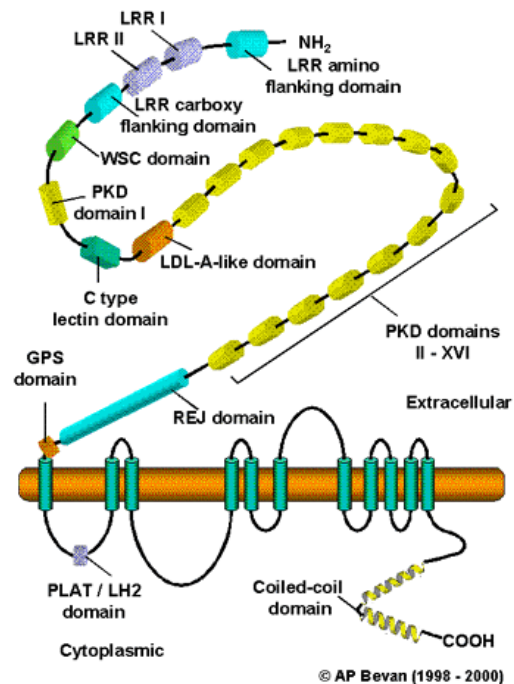


Abb. 6: Schematische Darstellung des humanen Polycystin-1
<http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd1/pkd1.htm>

besteht aus einer (bisher gefundenen) maximalen 24 AS langen Consensussequenz, die Leucin oder aliphatische Reste an den Positionen 2, 5, 7, 12, 16, 21 und 24 aufweist (Kobe und Deisenhofer, 1994). B-Typ- LRRs, wie die in Polycystin-1, weisen an Position 10 ein Asparaginrest auf und sind von Cystein- reichen Wiederholungen flankiert (Kobe und Kajava 2001). Es wird angenommen, dass diese Motive Protein- Protein interagierende bzw. -erkennende Funktion haben. Ein GST- LRR Fusionsprotein aus Polycystin-1 zeigte Bindungen mit Proteinen der extrazellulären Matrix, Kollagen Typ 1, Laminin und Fibronectin (Malhas et al., 2002). Zudem interagieren die LRRs mit Annexin A5 wie kürzlich gezeigt wurde (Markoff et al., nicht veröffentlichte Ergebnisse). In über der Hälfte der bisher bekannten Signal- Transduktionswege sind u.a. Proteine mit LRRs involviert (Kobe und Kajava 2001).

Die nächsten Motive, die man in Polycystin-1 findet, sind eine putative WSC- und eine PKD- Domäne (s. u.), die von Exon 5 codiert werden. Die WSC Domäne bekam ihren Namen von den Zellwand- Integritäts und Stresskomponenten- Proteinen 1-4 aus *Saccharomyces cerevisiae* (*cell wall integrity and stress component proteins 1-4*), die an der Hitzeschock- Antwort beteiligt sind und die Regulation der Stress- induzierten C1- mitogen- aktivierte Proteinkinase Kaskade beeinflussen (Lodder et al., 1999). Aufgrund

der Ähnlichkeit der WSC- Domäne mit einem hypothetischen Sulfotransferase Protein und einer β -1,3- Exoglucanase aus *Trichoderma harzianum*, vermutet man Kohlenhydrat-bindende Eigenschaften (Cohen- Kupiec et al., 1999; Ponting et al., 1999).

Exon 6 und 7 codierenden für einen Bereich, der große Homologie zu C-Typ Lektinen besitzt, die Kalzium- abhängig an Carboxylreste in Kohlenhydraten binden. Sie haben eine Länge von 115- 130 AS und sind durch eine Sequenz charakterisiert, die 14 nicht variable und 18 hoch konservierte Reste enthält (Drickamer und Taylor, 1993). C-Typ Lektine sind an Zellsignalwegen und Exozytose- Vorgängen beteiligt (Gabijs 1997). GST- Fusionsproteine mit dieser Domäne aus Polzystin-1 zeigten bei *in vitro* Versuchen verschiedene kalziumabhängige Bindungen mit Kohlenhydraten und Proteinen der extrazellulären Matrix, insbesondere mit Kollagenen des Typs I und IV (Weston et al., 2001).

In der abgeleiteten Sequenz von Exon 10 findet man Homologien zu einer LDL-A- Domäne (low density lipoprotein A). Diesen ca. 40 AS langen und cystein-reichen Abschnitt findet man häufig im extrazellulären Teil von Proteinen. Wegen ihrer großen Hydrophobizität spielen sie eine ligandenbindende Rolle in LDL- Rezeptoren und dazu ähnlichen Proteinen (Krieger und Herz, 1994).

15 Wiederholungen der so genannten PKD- Domäne, eine jeweils ca. 80- 90 AS lange Sequenz, werden von den Exons 11- 15 codiert, eine weitere findet man in Exon 5 (s.o.). Diese Wiederholungen machen fast 30% des gesamten Proteins aus (Bycroft et al., 1999). Zunächst wurde angenommen, dass diese Motive zur Superfamilie der Immunoglobuline (Ig) gehören, was auf einer Ig- ähnlichen Vorhersage der Proteinfaltung basierte (Hughes et al., 1995). Diese konnte kristallographisch zwar als antiparalleles β - Falblatt bestätigt werden, allerdings wird die PKD- Domäne heute als eigenständige Familie angesehen, nicht zuletzt wegen der relativ geringen Sequenzähnlichkeit zu Immunoglobulinen und der abweichenden räumlichen Struktur (Bycroft et al., 1999). PKD- Domänen sind in homophilen kalzium-unabhängigen Interaktionen mit anderen PKD- Domänen involviert. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei Blockierung mit Antikörpern die Zell- Zell- Interaktionen in MDCK Zellen zerstört werden, was einen Hinweis darauf gibt, dass Polycystin-1 in Zell-Zell Kontakten von Nierenepithelzellen involviert ist (Ibraghimov-Breskrovnaya et al., 2000). Außer in Polycystin-1 wurden einzelne PKD- Domänen noch in Proteinen der Zelloberfläche (Pmel17, MPP und NMB) von Melanozyten, sowie in drei Kollagenasen, einer Protease und einem Oberflächenprotein von Prokaryonten gefunden (Bycroft et al., 1999).

Die sich anschließende REJ-Domäne bekam ihren Namen wegen der großen Ähnlichkeit zum „Egg Jelly“- Rezeptor des Seeigels (suREJ, sea urchin receptor for egg jelly) und wird von den Exons 15- 27 codiert (Moy et al., 1996). suREJ ist in die Acrosom Reaktion involviert und bewirkt einen Kalzium-Einstrom in die Zelle, weshalb man für die Funktion der REJ- Domäne in Polycystin-1 ähnliches vermutet.

Das letzte bisher identifizierte extrazelluläre Motiv ist die so genannte GPS-Domäne (G protein- coupled receptor proteolytic site). Diese Domäne ist aus Oberflächenrezeptoren der LNB-TM7 Familie bekannt (Stacy et al., 2000), weshalb man hier eine Bedeutung für eine Rezeptor- Aktivierung vermutet. Für Polycystin-1 wird an der Position Leu³⁰⁴⁸- Thr³⁰⁴⁹ die putative Spaltstelle vorhergesagt (Mengerink et al., 2002). Die Abspaltung des N-terminalen Teils erfolgt direkt nach der *in vivo* Synthese und scheint für die vollständige biologische Aktivität essentiell zu sein (Qian et al., 2002). Zudem wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass die GPS- Domäne allein nicht ausreichend ist, um eine proteolytische Spaltung herbeizuführen. Diese findet nur bei Vorhandensein der REJ-Domäne statt, wobei aber nicht alle Polycystin-1 Moleküle in dieser Form prozessiert werden. Der freigesetzte N-terminale Teil bleibt aber in der Regel mit den membrangebundenen restlichen 1255 AS über nicht- kovalente Bindungen assoziiert, nur ein kleiner Teil wird freigesetzt. Es wird spekuliert, dass die Abspaltung einerseits für eine effiziente Signal-Transduktion nach Ligandenbindung benötigt wird und andererseits zur Bildung einer neuen Liganden-bindenden Tasche führen könnte (Qian et al., 2002).

Der Bereich zwischen Aminosäure 3075 und 4104 beherbergt mehrere hydrophobe Abschnitte, woraus insgesamt 11 Transmembrandomänen vorhergesagt wurden (Sandford et al., 1997). Neuere Untersuchungen zeigen, dass es zwar insgesamt elf Transmembrandomänen gibt, jedoch von den vorhergesagten Domänen drei fälschlicherweise als transmembran interpretiert wurden, dafür aber drei andere Bereiche als transmembran identifiziert (Nims et al., 2003). Im ersten vorhergesagten intrazellulären Loop ist eine PLAT- Domäne (polycystin/ lipoxygenase/ alpha toxin), auch als LH 2 Domäne bezeichnet, lokalisiert. Dieser Bereich ist hochkonserviert und ebenfalls in den zu PKD1 homologen Genen aus *Fugu rubripes* und *Caenorhabditis elegans* zu finden. Die dreidimensionale Struktur ist bekannt aus einer humanen Pankreas Lipase, einer 15-Lipoxygenase aus Kaninchen und dem Alpha Toxin aus *Clostridium perfringens* (<http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd1/pkd1.htm>). Der reine Sequenzvergleich in SWISS- PROT zeigt Ähnlichkeiten mit Lipoxygenasen, Triacylglycerin- Lipasen und Lipoprotein- Lipasen aus Mammalia. Allgemein wird angenommen, dass die PLAT-

Domäne in Protein- Protein bzw. Protein- Fettsäure Wechselwirkungen involviert ist. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, interagiert die PLAT Domäne des LOV-1 Genproduktes, dem PKD1 homologen Gen aus *Caenorhabditis elegans*, mit ATP-2, einer Untereinheit einer ATPase. Dieser Proteinkomplex wurde zusammen mit PKD2 auch in Cilien gefunden, woraus sich möglicherweise eine weitere neue Funktion bei der Signal-Transduktion der Polycystine (in Nematoden) ergibt, da ATPasen normalerweise in Mitochondrien lokalisiert sind (Hu und Barr, 2005).

Im cytosolischen C-Terminus, den letzten 199 AS von Polycystin-1, konnte neben zwei putativen Phosphorylierungsstellen eine „coiled-coil“- Domäne (AS 4214- 4248) identifiziert werden, die verantwortlich für das Zusammenwirken mit einer ähnlichen Domäne in Polycystin- 2 ist (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997). Der Abschnitt von AS 4077- 4188 konnte bei Fusion mit Zelloberflächenproteinen in *Xenopus* Oozyten einen einwärts gerichteten, unspezifischen Kationenkanal erzeugen, der auch für Ca^{2+} -Ionen permeabel ist (Vandorpe et al., 2001). Chauvet et al.(2004) fanden ein Nucleus-Lokalisationssignal, das von 21 AS (Position 4134- 4154) gebildet wird und hoch konserviert auch in der murinen Sequenz vorhanden ist. Es wurde gezeigt, dass durch mechanische Stimulation der C-Terminus an einer nicht bestimmten Stelle gespalten wird und in den Nucleus wandert. Ob die oben beschriebene Abspaltung der N-terminalen extrazellulären Domäne am GPS Motiv dabei als Prärequisit erforderlich ist, wird derzeit diskutiert (Guay-Woodford, 2004). Polycystin-2 nimmt Einfluss auf die Lokalisation des C-terminalen Fragments und hat so eine putative regulatorische Funktion. Andere Arbeiten hatten zuvor berichtet, dass bei Fusion des C-terminalen cytoplasmatischen Teils von Polycystin-1 an CD16-CD7 der AP-1 Signalweg aktiviert wird, jedoch wurde hier die nukleäre Lokalisation des Polycystin-1- Fragments nicht untersucht (Arnould et al., 1998). Chauvet et al. konnten keine Aktivierung des AP-1 Signalwegs feststellen, führen diesen Befund aber möglicherweise auf die Benutzung unterschiedlicher Zellsysteme zurück. Die C-terminale zytosolische Domäne nimmt auch Einfluss auf verschiedene andere intrazelluläre Signalwege, wie z. B. den Wnt-Signalweg. Dabei wirkt das Fragment offenbar stabilisierend auf β -Catenin, inhibierend auf die Glykogen-Synthase Kinase-3 β und aktivierend auf die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF (Kim et al., 1999). Andere Untersuchungen deuten darauf hin, dass Polycystin-1 mit Glykoprotein- Signalwegen interagiert. Glykoproteinen wird eine wichtige Rolle bei der Zystenentstehung, Flüssigkeitssekretion, Zellproliferation, -Polarität und- Differenzierung zugeschrieben (Grantham, 2001). Der C-Terminus kann direkt an RGS7, einem kurzlebigen Regulator in

Glykoprotein Signalwegen, sowie an Glykoprotein- Heterotrimere binden (Parnell et al., 1998; Kim et al., 1999), wobei letztere aktiviert werden und es dadurch zu einer G-Protein-abhängigen Aktivierung der c- Jun N-terminalen Kinase und des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt (Parnell et al., 2002). Die Expression von Polycystin-1 aktiviert den JAK-STAT- Signalweg, wobei p21^{waf1} heraufreguliert wird und so durch die Inaktivierung der cyclin- abhängigen Kinase Cdk2 einen Arrest des Zellzyklus in der G0/G1- Phase bewirkt (s. Abb. 7). Für diesen Prozess wird Polycystin-2 als essentieller Co-Faktor benötigt (Bhunia et al., 2002). In dieses Bild passt auch die Beobachtung von Boletta et al. (2000), dass eine Expression von humanem Polycystin-1 in MDCK-Zellen deren Proliferation und Zystenbildung verhindert und zudem noch einen Schutz gegen Apoptose gewährt. In einem anderen RGS- unabhängigen Signalweg aktiviert Polycystin-1 als $G\alpha_i$ - bzw. $G\alpha_o$ - Glykoprotein- assoziierter Rezeptor (aber nicht $G\alpha_q$) die Freisetzung der $G\beta\gamma$ - Untereinheiten, um so modulierend auf Ionenkanäle einzuwirken (Delmas et al., 2002). Dieser ansonsten konstitutiven Aktivierung kann Polzystin-2 entgegenwirken.

Diese Modelle liefern potentielle Erklärung für die Entstehung von Zysten. Überexpression von Polycystin-1 in transgenen Mäusen führt zur Nierenzysten, meist glomerulären Ursprungs, Zysten in der Leber zu Proliferation von Gallenkanälen (Pritchard et al., 2000). Durch die Überexpression von Polycystin-1 (oder der defekten Expression von PKD2) kann Polzystin-2 seine Rolle als Antagonist bzw. Co- Faktor verschiedener Signalwege nicht (vollständig) erfüllen, was den beobachteten Phänotyp zur Folge haben könnte. Auch in manchen ADPKD- Patienten wurde eine Überexpression von Polycystin-1 beobachtet (Grantham and Calvet, 2001; Geng et al., 1996)

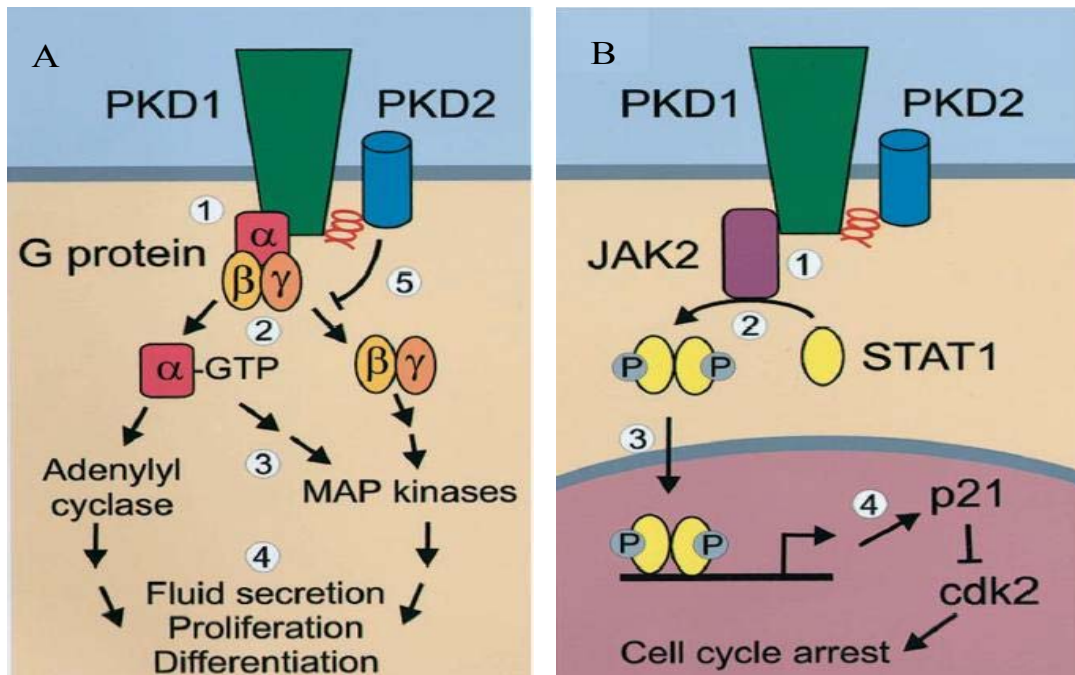


Abb. 7: Beteiligung der Polycystine an verschiedenen Signaltransduktionswegen

A: Regulierung von Glykoprotein- Signalwegen durch Polycystine

Polycystin-1 bindet und aktiviert heterotrimerische G- Proteine konstitutiv (1). Die Aktivierung von G α und die Freisetzung von G $\beta\gamma$ Untereinheiten (2) beeinflussen die Aktivität der Adenylat- Cyclase und die von MAP Kinasen und anderen Effektoren(3), die wiederum Flüssigkeitssekretion, Proliferation, Zellpolarität und Differenzierung der Zelle regulieren. Die Interaktion von Polycystin-1 mit Polycystin-2 über die Coiled- Coil Domäne inaktiviert diesen G-Protein- Signalweg.

B: Regulierung des JAK- STAT- Signalweges durch Polycystine

Die Aktivierung von Polycystin-1 führt durch eine Polycystin-2 abhängigen Reaktionen zur Aktivierung der JAK2- Kinase (1), die ihrerseits STAT1 phosphoryliert und aktiviert (2). Homodimere von STAT1 binden an den p21^{waf1} Genpromotor, wodurch das Gen heraufreguliert wird und Cdk2 inhibiert, was zum Arrest des Zellzyklus in der G0/G1- Phase führt. (Igarashi und Somlo, 2002)

Für die Ursache der veränderten extrazellulären Matrix in ADPKD Patienten (s. o.) gibt es einige Hinweise. Normalerweise ist Polycystin-1 mit den Zelladhäsionsmolekülen E- Cadherin, α -, β - und γ - Catenin assoziiert, wie in Immunopräzipitationsstudien gezeigt werden konnte (Huan und Van Adelsberg, 1999; Roitbak et al., 2004). Weist das PKD1- Gen Mutationen auf, die eine funktionelle Expression verhindern, so findet man E- Cadherin in intrazellulären Kompartimenten, zusammen mit andere Proteinen, die an basolateralen Transportfunktionen der Epithelien beteiligt sind, wodurch es zu Störungen im Protein und Lipidstoffwechsel dieser Zellen kommt. Zudem ist möglicherweise durch die Abwesenheit von Polycystin-1 ein wichtiger Kommunikationsweg verloren gegangen, der weitere Veränderungen u. a. der extrazellulären Matrix, nach sich ziehen kann.

Expressionsstudien zu Polycystin-1 zeigen zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Ward et al.(1996) konnten die PKD1 mRNA in allen untersuchten humanen Geweben nachweisen: Thymus, Duodenum, Herz, Mandeln, Milz, Nebenniere, Lunge, Testis, Gehirn und Niere. Bei Untersuchungen mit Antikörpern auf Gewebeschnitten konnte Polycystin-1 in tubulären Epithelien adulter, fötaler und polyzystischer Nieren nachgewiesen werden. Obwohl der grobe Überblick ähnlich ist, kommt es im Detail zu Unterschieden. Einige Arbeiten kommen zu der Erkenntnis, dass das Protein in den distalen und proximalen Tubuli zu finden ist, aber kaum in den Sammelröhren (Weston et al., 1997), wogegen andere dort eine exklusive Lokalisation sehen (Palsson et al., 1996; Wilson, 1997). Glomeruläre Expression ausserhalb der Bowmannschen Kapsel ist nach Meinung einiger Autoren nicht vorhanden, wogegen andere signifikante Färbungen glomerulärer Epithelien zeigen (Palsson et al., 1996; Peters et al., 1996; Weston et al., 1997). Renale Gefäße und Endothelien waren in den meisten Fällen negativ, aber nicht in allen (Ibraghimov- Beskrovnaya et al., 1997; Peters et al., 1996). Die zelluläre Lokalisation wurde kürzlich erneut untersucht mit dem Ergebnis, dass Polycystin-1 unter Abwesenheit von Polycystin-2, durch Pkd2 Nullallele, in der Zellmembran wie auch dem ER zu finden ist. Wird aber Polycystin-2 ebenfalls (transient) exprimiert, findet man eine exklusive Lokalisation im ER (Grimm et al., 2003). Polycystin-1 war bis dato als ein Protein der Zellmembran angesehen worden (Ibraghimov- Beskrovnaya et al., 1997; Aguiari et al., 1998).

Eine Arbeit kommt zu dem Schluss, dass ein immunologischer Nachweis von Polycystin-1 auf Gewebeschnitten nicht möglich ist (Nauta et al., 2000). Von 25 Antiseren war eins in der Lage, nur das zur Immunisierung eingesetzte Antigen (AS 3078- 4302) zu erkennen, ohne Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen/ Fragmenten zu zeigen. Die Expression des Antigens in COS- Zellen konnte mit den Antikörpern eindeutig nachgewiesen werden. Gewebeschnitte von fötalen, adulten und polyzystischen Nieren zeigten ein Färbungsmuster, das dem von früheren Beobachtungen entsprach. Allerdings wurden ähnliche Ergebnisse mit dem Preimmunserum erzielt, dass keine Affinität zum Antigen aufweist. Die spezielle Reinigung des Serums mit dem Antigen brachte Überraschendes. Die ungebundene Fraktion der Antikörper führte wieder zum bekannten Färbemuster in den Nieren, die Affinitätsgereinigten Antikörper dagegen gaben kein Signal auf den Gewebeschnitten.

1.3 Das PKD2- Gen

Das zweite bekannte und an der ADPKD beteiligte Gen ist das PKD2, welches bei ca. 14% der Patienten krankheitsursächliche Mutationen aufweist. Es erstreckt sich auf Chromosom 4 (q13-23) über ca. 68 kb und besteht aus 15 Exons. Das ca. 5,4 kb große Transkript codiert für 968 AS mit einem Molekulargewicht von 110 kDa (Mochizuki et al., 1996).

Das murine Pkd2- Gen liegt auf dem Chromosom 5 proximal zum Marker D5Mit175. Dieser Bereich weist Syntenie mit dem Bereich des humanen Chromosoms 4 auf, auf dem sich das humane PKD2 befindet. In beiden Genomen findet man in der Nähe die Gene für Osteopontin (Spp1), das Dentin Matrix Protein (DMP) und Ptpn 13 (protein tyrosine phosphatase, nonreceptor, type 13). Pkd2 liegt wie im Menschen als Einzelkopie vor (Wu et al., 1997). Es erstreckt sich über mindestens 35 kb und besteht aus 15 Exons (Hayashi et al., 1997 Pennekamp et al., 1998), aus denen ein ca. 5,1 kb langes Transkript gebildet wird. Das daraus resultierende Protein besteht aus 966 Aminosäuren, die zu 91% identisch und 98% ähnlich (konservierte Austausch) mit denen des humanen Polycystin-2 sind.

1.3.1 Polycystin-2

Für Polycystin-2 wurden sechs Transmembrandomänen vorhergesagt, wobei N- und C-Terminus intrazellulär gelagert sind (Mochizuki et al., 1996; Hayashi et al., 1997). Im ersten extrazellulären Bogen befindet sich eine konservierte PKD- Domäne (Leu³¹⁴-Arg³²⁵), der bisher keine Funktion zugeschrieben wurde (<http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd2/pkd2.htm>). Weiterhin sind für diesen Bogen N- Glykosilierungsstellen vorhergesagt. Dem extrazellulären Bogen zwischen Transmembrandomäne 5 und 6 wird eine potentielle Funktion in der Porenbildung für Kanalaktivitäten zugesprochen (Tsiokas et al., 1999). Am C-terminalen cytosolischen Ende befinden sich eine Kalzium- bindende „EF- Hand“ Domäne (Glu⁷⁵⁴- Asp⁷⁸¹), eine „coiled coil“ Domäne (Qian et al., 1997; Tsiokas et al., 1997) und daran anschließend ein „ER-retention signal“(Glu⁷⁸⁷- Ser⁸²⁰), das für die Lokalisierung von Polycystin-2 im Endoplasmatischen Reticulum (ER) verantwortlich ist (Cai et al., 1999). Außerdem gibt es für den cytosolischen C-Terminus Vorhersagen für potentielle Phosphorylierungsstellen der Protein Kinase C, der GMP-abhängigen Kinase und der Casein Kinase II (NetPhos 2.0 Server, Blom et al., 1999)

Die Transmembrandomänen von Polycystin-2 weisen zu 50% Homologie zu den letzten sechs Transmembrandomänen in Polycystin-1 auf. Eine große Homologie wurde am C-terminus von Polycystin-2 zum Kalzium-Kanal α_{1E-1} gefunden, der zur Familie der spannungsaktivierten Ca^{2+} - Na^{+} -Kanälen gehört (Williams et al., 1992) sowie Ähnlichkeiten mit der Familie der TRP-Kanäle (Tsiokas et al., 1999; Montell, 2001).

Abhängig von den gewählten Zelllinien, die für die Expression von Polycystin-2 verwendet werden, findet

man eine unterschiedliche Lokalisation, nämlich entweder an das ER assoziiert oder in der Zellmembran. In beiden Positionen wurde eine eigenständige Kanalaktivität gefunden. Koulen et al (2002) fanden in einer porcinen Nierenzelllinie (LLC-PK₁) das Protein im ER mit Kanalaktivität für divalente Kationen. In anderen Arbeiten dagegen wurde endogenes Polycystin-2 in der Zellmembran von caninen MDCK, murinen IMCD Zellen (Luo et al., 2003) und *Xenopus* Oozyten (Vassilev et al., 2001) gefunden, wo es einen Kalzium-permeablen Kanal bildet. Heterolog exprimiertes Polycystin-2 wurde in diesen Experimenten allerdings hauptsächlich im ER gefunden, jedoch auch in der Zellmembran.

Polycystin-2 kann über die eigene coiled-coil-Domäne mit der von Polycystin-1 interagieren und so einen Kationenkanal in CHO-Zellen bilden (Hanaoka et al., 2000). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Ergebnissen fanden die Autoren für beide Proteine keine Kanalaktivität, wenn sie allein exprimiert werden. Nur wenn beide Proteine zusammen exprimiert wurden, konnte Polycystin-2 in der Zellmembran nachgewiesen werden, weshalb angenommen wurde, dass Polycystin-1 für die Translokation verantwortlich ist. Tsiokas et al. (1997) fanden, dass die Assoziation der beiden Proteine homo- oder heterodimerisch sein kann und Polycystin-2 zudem mit sich selbst über die coiled-coil-Domänen dimerisieren kann, wobei aber ein anderer Teil der Domänen beteiligt ist als an der Interaktion mit Polycystin-1. Ein anderes Protein, dass mit dieser

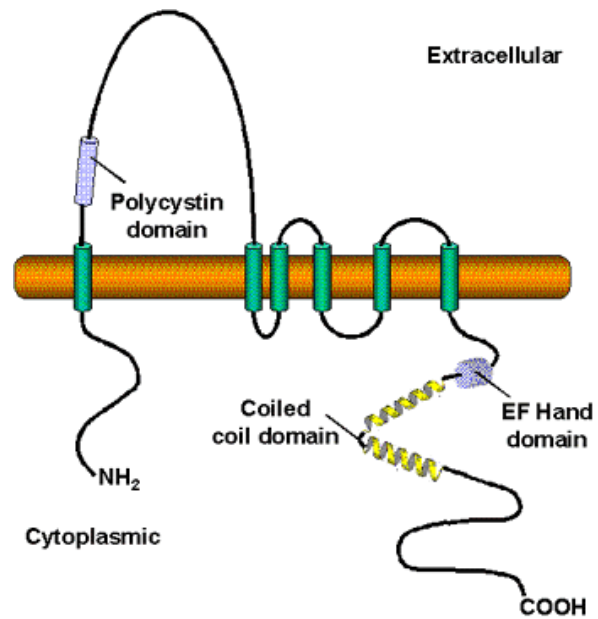


Abb. 8: Schematische Darstellung des humanen Polycystin-2
<http://www.cimr.cam.ac.uk/medgen/pkd/pkd2/pkd2.htm>

Domäne interagiert, ist PIGEA-14 (Hidaka et al., 2004), welches einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2 nimmt.

Eine aktuelle Arbeit von Köttgen et al. (2005) gibt eine Erklärung für die unterschiedlichen Lokalisationen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Polycystin-2 von zwei Instanzen kontrolliert wird. Die Proteine PACS-1 und -2 (phosphofurin acidic cluster sorting protein) sind in der Lage, eine Sequenz saurer Aminosäuren zu erkennen, wie sie im C-Terminus von Polycystin-2 zu finden ist. Die Interaktion wird durch die Casein Kinase 2- abhängige Phosphorylierung des Serin- Rests an Position 812 reguliert.

PACS-2 und COPI (coat protein I) bilden einen Komplex, der phosphoryliertes Polycystin-2 im ER hält, bzw. vom Golgi- Apparat zurück zum ER führt. Nach Desphosphorylierung durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A) gelangt Polycystin-2 zum Golgi- Apparat. Von dort wandert es entweder zur Zellmembran oder wird von der Casein Kinase 2 (CK2) phosphoryliert, um und dann vom PACS-1/AP-1 (adapter protein complex 1) Komplex gebunden zu werden. Der PACS-1/AP-1 Komplex kann Polycystin-2 zurück an PACS-2/COPI geben, worauf es wieder zum ER geführt wird. Diese Interaktionen werden nicht von Polycystin-1 behindert.

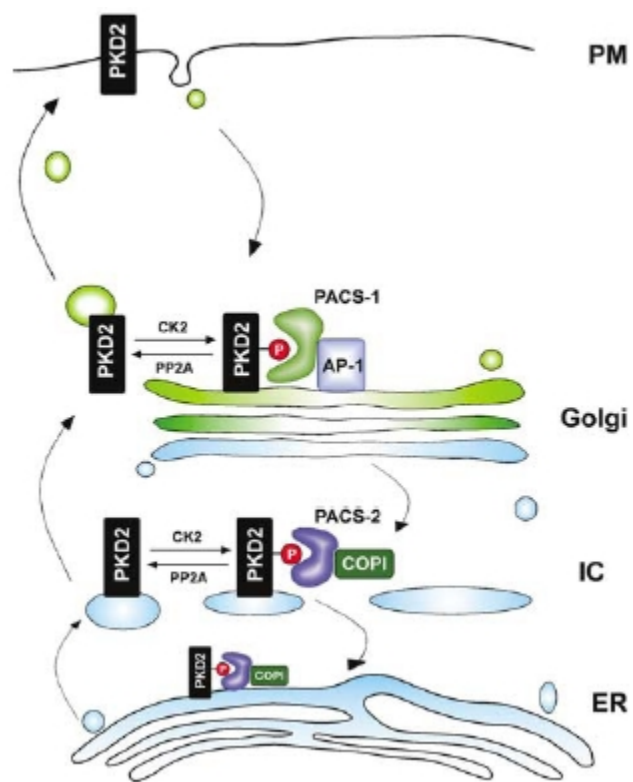


Abb:9: Modell der Polycystin-2 Lokalisation in der Zelle
PM: Zellmembran, IC: intermedieäres Kompartiment

Als weiterer putativer Bindungspartner von Polycystin-2 wurde Hax-1, ein Protein, das mit dem Zytoskelett assoziiert ist, aufgefunden (Gallagher et al., 1999). Die Autoren spekulieren, dass auch Polycystin-2 in Zell- Matrix Kontakten involviert ist. Das CD2AP (CD2- assoziiertes Protein) konnte in einem Yeast-Two-Hybrid Experiment als möglicher Assoziationspartner identifiziert werden (Lethonen et al., 2000). Diesem Protein werden Funktionen bei der Aufrechterhaltung der Organisation des Nephrons zugesprochen. Spezifische Interaktion konnte auch zwischen Tropomyosin-1 (TM-1) und einem C- terminalen Teil von Polycystin-2 (Gly⁸²¹-Arg⁸⁷⁸) ermittelt werden (Li et al.,

2003). Das Protein ist eine Komponente des Aktin- Mikrofilament- Komplexes und ist in Muskeln, aber auch in nicht-muskulären Geweben, zu finden. Auch eine Spleißvariante von TM-1, die in der Niere und im Herzen exprimiert wird, bindet ebenfalls an Polycystin-2. TM-1 wird als Suppressor neoplastischen Wachstums angesehen. Das als Angiogenese-Inhibitor interpretierte Troponin-1 wurde ebenfalls als potentieller Bindungspartner von Polycystin-2 erkannt (Li et al., 2003). Die Bindungsstelle liegt wiederum im C-Terminus von Polycystin-2 (Arg⁸⁷²- His⁹²⁷).

Immunhistologische Untersuchungen sowie *in situ* Hybridisierungen zeigten, dass PKD2 in der Niere, Leber, Lunge, Herz, Gehirn, Pankreas, Intestinaltrakt, Plazenta, Thymus und den Reproduktionsorganen exprimiert wird (Mochzuki et al., 1996; Ong et al., 1999; Foggensteiner et al., 2000). In der Niere findet man Polycystin-2 hauptsächlich in den reifenden proximalen und distalen Tubuli und den Sammelröhren, bei adultem Gewebe mehr im distalen Bereich. In nicht renalen Geweben findet man Polycystin-2 in den entwickelnden Epithelien, sowie in der glatten Muskulatur, der Skelettmuskulatur, Herz- und Endothelzellen, nukleierten roten Blutkörperchen und Neuronen (Ong et al., 1999, Torres et al., 2001).

1.4 ADPKD und primäre Cilien

Nach neuesten Erkenntnissen ist Polycystin-2 ein essentieller Faktor beim Aufbau einer primären Cilie (Jurczyk et al., 2005). Primäre Cilien sind nicht aktiv bewegliche mikrotubuläre Strukturen, die durch intraflagellaren Transport (IFT) von Basalkörperchen aufgebaut werden. Das Zentrosom Protein Pericentrin (Pcnt) co- lokalisiert mit IFT Proteinen an der Basis von primären und beweglichen Cilien. In RNA Interferenz Experimenten wurde gezeigt, dass die Depletion von Pcnt die basale Lokalisation von IFT Proteinen und Polycystin-2 zerstört und so den Aufbau primärer Cilien verhindert. Mit Antikörpern gegen Pcnt konnten IFT Proteine und Polycystin-2 co- immunopräzipitiert werden. Schon zuvor konnte in *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden, dass *lov-1* (das PKD1- Homologe) und *pkd2* in Cilien von Sensor-Neuronen vorhanden sind und mit OSM-5, einem Polaris homologen Protein, und IFT88 co-lokalisieren.

Mutationen in *lov-1* und *pkd2* zeigten Störungen in der Cilienfunktion, während Mutationen von *osm-5* die ciliäre Struktur veränderten (Qin et al., 2001; Haycraft et al., 2001). Auch in kultivierten Zellen von kortikalen Sammelröhren (mCCD) der Maus konnte eine Co-Lokalisation von Polycystin-1 und-2, Polaris und Cystin gefunden werden (Yoder et al., 2002). Polaris (Tg737-Gen) und Cystin (cpk-Gen) sind aus

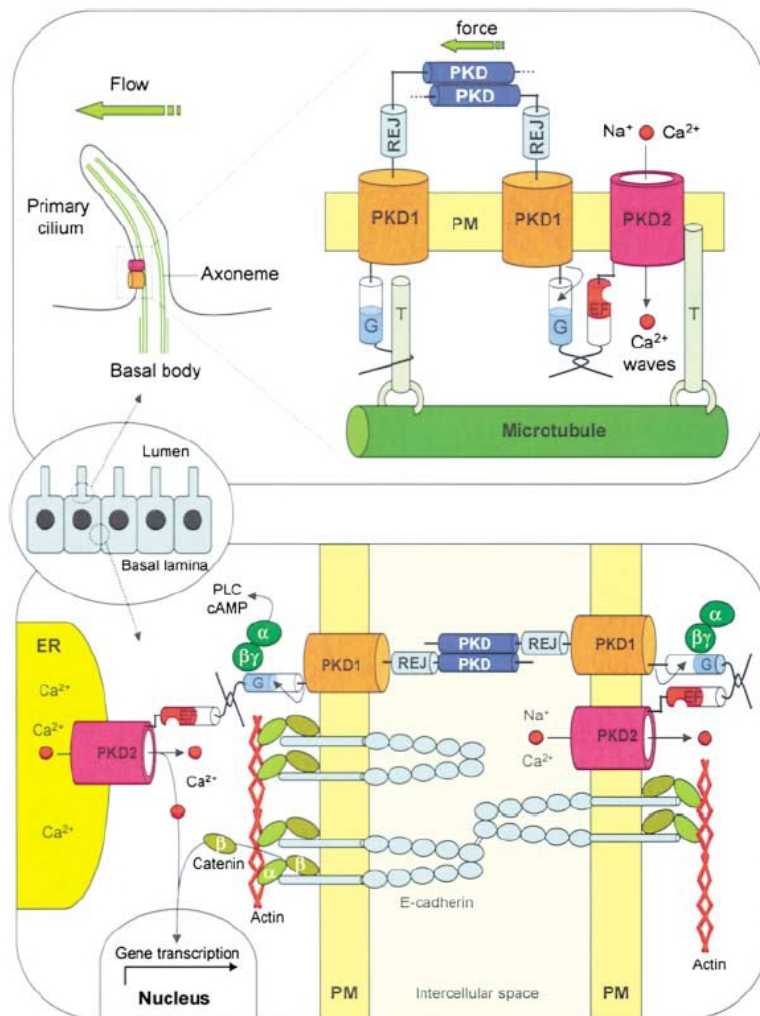


Abb. 10: Modelle der Polycystin- Komplexe in den Epithelien die Niere
Calvet et al., 2004

Mausmodellen der Autosomal Rezessiven Polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) bekannt.

Polycystin-1 und -2 sind an der Übertragung mechanosensorischer Stimuli von primären Cilien beteiligt (Nauli et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in Polycystin-1 freien Zellen, bzw. durch Blockierung von Polycystin-1 und/oder -2 ein sonst gemessener Kalzium- Einstrom bei fluss-induzierter Bewegung primärer Cilien nicht zustande kam. Es wird spekuliert, dass diese Funktion benötigt wird, um die intratubulären Durchmesser, in Abhängigkeit von der Menge strömender Flüssigkeit, zu regulieren. Fehlt eines bzw. beide Polycystine, so könnte es zu einem kompensierenden Wachstum kommen aufgrund des vermeintlich zu geringen Flüssigkeitsdurchlaufs (Calvet, 2003).

1.5 Polycystin- verwandte Proteine

In den vergangenen Jahren sind weitere Proteine entdeckt worden, die zur Familie Polycystine gerechnet werden. Die Ähnlichkeit mit Polycystin-1 oder Polycystin-2 wird dabei als Kriterium zur Einteilung verwendet. Polycystin-ähnliche Proteine existieren im gesamten Tierreich mit Ausnahme einzelliger Lebewesen (Delmas et al., 2004)

Polycystin-1 ähnliche Proteine wie PKD1L1-3 und PKDREJ besitzen eine große extrazelluläre Domäne, elf vorhergesagte Transmembrandomänen und relativ kurze intrazelluläre C-Termini. Ein weiteres Merkmal dieser Gruppe ist die Kombination von REJ-, GPS- und PLAT- Domäne. Für PKD1 und PKD1L1 konnten keine strukturellen Hinweise gefunden werden, dass sie eine Kanalpore ausbilden können. Im Gegensatz dazu findet man bei PKD1L2 und PKD1L3 einen deutlichen strukturellen Hinweis, dass diese Proteine potenzielle Kanalporen- bildende Eigenschaften aufweisen.

Zur Familie der PKD2- ähnlichen gehören PKD2, PKD2L1 und PKD2L2. Sie besitzen sechs Transmembrandomänen, bilden nicht selektive Kationenkanäle und teilen deutliche Homologie mit den TRP- Kanälen (transient receptor potential) der Phototransduktion in *Drosophila*. Alle besitzen eine putative coiled-coil Domäne am C-Terminus, aber nur PKD2 und PKD2L1 zeigen ein Kalzium bindendes EF-Hand Motiv. Generell sind PKD2- ähnliche Kanäle durchlässiger für Ca^{2+} - als für Na^{+} - und K^{+} - Ionen (Delmas et al., 2004)

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über Namen, Größe, Anzahl der Transmembrandomänen, Expressionsorte und soweit bekannt, molekulare und biologische Funktionen.

Einleitung

Gen	Struktur	Expression	Molekulare Funktion	Biologische Rolle
hPKD1	4302 AS 11 TM	Weit verbreitet, höher in fötalen Geweben	Rezeptor nicht bekannter Liganden, Regulator von Ionenkanal (PKD2) und G- Protein Signalwegen	Mechanotransduktion, Regulator von Zell- wachstum, -proliferation und -Differenzierung
hPKDREJ	2254 AS 11 TM	Testis	Rezeptor?	Ionenkanalregulator während der Befruch- tung?
hPKD1L1	2842 AS 11 TM	Herz, Gehirn, Jejunum, Plazenta, Gebärmutter	Rezeptor?	Unbekannt
hPKD1L2	2459 AS 11 TM P Loop	Skelettmuskel, Leber, Testis, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge und Pankreas	Rezeptor, putativer Ionenkanal?	Unbekannt
hPKDL3L	1732 AS 11 TM P Loop	Plazenta, Leber und Testis	Rezeptor, putativer Ionenkanal	Unbekannt
hPKD2	968 AS 6 TM P Loop	weit verbreitet, höher im adulten Gewebe	Kalzium durchlässiger Ionenkanal	Mechanotransduktion, Regulator von Zell- wachstum, -proliferation und- differenzierung
hPKD2L1	805 AS 6 TM P Loop	Herzmuskel, Skelett muskel, Gehirn, Milz, Testis, Retina und Niere, höher in adultem Gewebe	Kalzium durchlässiger Ionenkanal	Unbekannt
hPKD2L2	624 AS 6 TM P Loop	Testis	Putativer Kalzium durchlässiger Ionenkanal	Befruchtung?
suREJ1	1450 AS 1 TM	Seeigelspermium, acrosomale Plasma-	Rezeptor für Fucose- Sulfat Polymer in	Acrosomreaktion und Befruchtung

Einleitung

		membran	Eigelee	
suREJ2	1472 AS 2 TM	Seeigelspermium, in der gesamten Plasmamembran	Unbekannt	Unbekannt
suREJ3	2681 AS 11 TM	Seeigelspermium, acrosomale Plasmamembran	Rezeptor für Fucose-Sulfat Polymer in Eigelee	Acrosomreaktion und Befruchtung
suPKD2	907 AS 6 TM P Loop	Seeigelspermium, acrosomale Plasmamembran	Putativer Kalzium durchlässiger Ionenkanal	Befruchtung?
<i>lov-1</i> (PKD1-Homolog)	3178 AS 11 TM	<i>C. elegans</i> , männliches Sensor- Neuron	Rezeptor unbekannter Liganden und Regulator von Ionenkanälen?	Männliches Paarungsverhalten
<i>pkd-2</i>	775 AS 6 TM P Loop	<i>C. elegans</i> , männliches Sensor- Neuron	Putativer Kalzium durchlässiger Kanal	Männliches Paarungsverhalten
<i>amo</i> (PKD2 Homolog)	924 AS 6 TM P Loop	Flagellen- und Kopfregion von <i>Drosophila</i> Spermien	Putativer Kalzium durchlässiger Kanal	Direkte Bewegung in den weiblichen Reproduktions-Trakt

Tabelle 1: Struktur, Gewebeverteilung und Funktion Polycystin- verwandter Proteine (nach Delmas et al., 2004, modifiziert) AS: Aminosäure, TM: Transmembrandomäne, P Loop: Kanalpore, h: human

1.6 Tiermodelle Polyzystischer Nierenerkrankungen

Nachdem die murinen Pkd1- und 2- Gene identifiziert worden waren, war es nahe liegend, durch gezielte Mutagenese die Gene auszuschalten. Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob diese Tiermodelle vergleichbar mit der humanen Erkrankung sind und ob sie neue Aufschlüsse über Pathogenese und potentielle Therapie der ADPKD geben.

1.6.1 Mutagenese des murinen Pkd1- Gens

In der ersten gezielten Mutagenese des Pkd1- Gens sollte eine identifizierte humane Mutation, die zur ADPKD führt, imitiert werden. Dazu wurde das Exon 34 durch homologe Rekombination deletiert (Lu et al., 1997). Wie es berichtet wurde, zeigten heterozygote Mäuse zunächst keinen erkennbaren Phänotyp, wo hingegen homozygote Mäuse schon im Embryonalalter verstarben. In den homozygoten Mutanten wurden massive vergrößerte Zystennieren, Zysten der pankreatischen Ducten und pulmonale Hyperplasie, gefunden. Am Embryonaltag 15,5 (E15,5) wurde in den proximalen Tubuli der Nieren die beginnende Zystenentstehung erkannt, die mit rascher Progression das gesamte Nierenparenchym verdrang. Später wurde in einer anderen Arbeit berichtet, dass die Mäuse mit heterozygoter Deletion der Exon 34 vereinzelte Nieren- und Leberzysten im Alter von 9-16 Monaten entwickelten (Lu, et al., 1999).

In einem anderen Modell wurde eine vorzeitige Stoppmutation in das Exon 43 (Pkd1^L) eingebracht (Kim et al., 2000). Polyzystin-1 wurde mit immunologischen Methoden in den Geweben der homozygoten Pkd1^L-Embryonen nachgewiesen. Die eingeführte Mutation müsste also ein Fehlen der letzten drei Transmembrandomänen sowie der intrazelluläre C-Terminus verursacht haben. Homozygote Pkd1^L-Mutanten verstarben am E15,5 mit subkutanen Ödemen, vaskulären Lecks und Ruptur von Blutgefäßen. Zu diesem Zeitpunkt waren Nierenzysten und Zysten der pankreatischen Ducten vorhanden. Durch die Deletion von Exon 17 bis Exon 21 des Pkd1- Gens erstellten Boulter et al. (2001) ein Tiermodell. 50% der adulten, heterozygoten Mäuse entwickelten im Alter bis neun Monate mikroskopische renale Zysten, im Alter von neunzehn Monaten wurden diese jedoch in allen Tieren gefunden. Leberzysten wurden nur selten und im Alter von mindestens neunzehn Monaten gefunden. Homozygote Embryonen verstarben am E13,5-E14,5 an kardiovaskulären Defekten wie abnormale atrioventrikuläre Septierung,

fehlorganisiertes Myocardium und doppelter Ausfluss der rechten Ventrikels. Außerdem wurden massive Störungen der Knochenbildung beobachtet.

1.6.2 Mutagenese des murinen Pkd2- Gens

Wu et al. (1998) konstruierten ein instabiles Pkd2- Allel durch die Insertion eines mutierten Exon1 in Tandem- Orientierung mit dem Wildtyp Exon1. Dieses Allel wurde im Laufe der Zeit durch intragenische homologe Rekombination somatisch inaktiviert und erzeugte so ein Nullallel. Sowohl hetero- als auch homozygote Mäuse entwickelten polyzystische Nieren und Läsionen der Leber, die dem humanen Phänotyp sehr ähnlich sind. In allen untersuchten Fällen hatten die Zysten der renalen Tubuli die Fähigkeit, Polyzystin-2 zu bilden, verloren. Somatischer Verlust beider Pkd2-Allele war sowohl notwendig, als auch ausreichend, um die Ausbildung renaler Zysten zu bewirken, was auf einen rezessiven zellulären Mechanismus der Erkrankung schließen lässt.

In späteren Experimenten etablierten Wu et al. (2000) ein Mausmodell mit einem zerstörten Exon 1, also einem Nullallel. Homozygote Mutanten verstarben zwischen E13,5 und der Geburt. Bei ihnen wurden strukturelle Defekte der Septierung des Herzens, Zystenbildung im reifenden Nephron und den pankreatischen Ducten gefunden.

Durch die Zerstörung des Exon 1 konnte zudem gezeigt werden, dass homozygote Embryonen eine rechten pulmonären Isomerismus, Verdrehung des Herzens und Situs abdominalis aufweisen (Pennekamp et al., 2002).

1.6.3 Tiermodelle mit unbekannter genetischer Ursache

Neben den Mausmodellen gibt es auch ein gut dokumentiertes Modell der ADPKD in der Ratte, die Han:SPRD-Pkd (Han:SPRP-cy)- Ratte. Die genetische Ursache der Erkrankung ist nicht bekannt und liegt auf jedem Fall nicht in der Mutation des Pkd1- Gens begründet (Nauta et al., 1997). Homozygote Tiere versterben an Urämie innerhalb von 3- 4 Wochen nach der Geburt und weisen massive Zystenbildung in allen Nephronen auf. In heterozygoten Ratten verläuft die Krankheit langsamer, ist aber nach 12 bis 21 Monaten letal. Immunhistologische Untersuchungen zeigen, dass ca. 75% der Zysten in den proximalen Tubuli entstehen. Obwohl zu keiner Zeit eine Veränderung der Zellpolarität entdeckt wurde, konnte festgestellt werden, dass sich die Expression von Alkalischer Phosphatase, Aquaporin-1, Na- Si-1 co- Transporter und der Na⁺- K⁺- ATPase erst im

späteren Verlauf der Erkrankung in Abhängigkeit von einer ansteigenden Clusterin-Expression verändert.

1.6.4 Tiermodelle der Autosomal Rezessiven Polyzystischen Nierenkrankheit (ARPKD)

Einige Mutationen, die im Menschen zur ARPKD oder Nephronophthise (terminale Schrumpfniere) führen, ähneln in Tiermodellen eher der Erscheinungsform der ADPKD. Beispielsweise wurden Mäuse mit homozygoten Mutationen im *pcy*-Gen (polycystic) zunächst als Modell der ADPKD betrachtet (Takahashi et al., 1991). Nach genauerer Untersuchung wurde festgestellt, dass in diesen Mäusen ein Gen mutiert ist, welches das Orthologe zum humanen NPHP3- Gen ist und bei Mutation verantwortlich für die adolescente Form der Nephronophthise ist (Olbrich et al., 2003). Auch eine Modell der Ratte (Crj:CD/SD) mit homozygoten Mutationen im *pck*- Gen (polycystic kidney) wurde zunächst als Modell der ADPKD betrachtet, aufgrund der Entwicklung renalen Zysten in der ersten Lebenswoche und biliären Erweiterungen bei Hepatomegalie (Lager et al., 2001). Doch hier zeigte sich, dass das *Pkhd1*- Gen betroffen war, welches bei Mutation im Menschen zur ARPKD führt (Ward et al., 2002).

Obwohl diese Tiermodelle nicht genau den Krankheitsverlauf wie beim Menschen zeigen, so geben sie doch neue Hinweise auf die Entstehung von Zysten. Mausmodelle konnten zudem neue Gene identifizieren, die an der Pathogenese der ADPKD beteiligt sind. Mutationen im *Nek8*- Gen, welches für die NIMA- verwandten Kinase 8 (never in mitosis-A) codiert, wurde im *jck*- Locus (juvenile cystic kidney) gefunden und zeigt sich verantwortlich für Zystenbildung in früheren postnatalen Lebensstadien (Liu et al., 2002). Eine andere Kinase aus der gleichen Familie, die vom *Nek1*- Gen codiert wird, wurde als krankheitsverursachend in *kat*- Mäusen (kidney, anaemia, testis) bestimmt (Upadhyaya et al., 2000)). Die Mutanten zeigen einen vielfältigen Phänotyp zu dem renale Zysten, Dysmorphien des Gesichts, Zwergwuchs, männliche Infertilität, Anämie und Zysten des Choroideus plexus gehören. Das murine *cpk*- Modell (congenital polycystic kidney), welches Mutationen im *Cys1*- Gen trägt, das für Cystin codiert, führt zu massiven Nierenzystenbildung mit schneller Entwicklung zur Niereninsuffizienz (Hu et al., 2002).

Wie im Menschen ist auch in den Tiermodellen eine große phänotypische Variabilität vorzufinden. Prädisposition anderer genetischer Faktoren, so genannte „Modifier“-Gene können Einfluss auf Expression der mutierten, krankheitsauslösenden

Gene nehmen und verändern so den Verlauf der Erkrankung. Beispielsweise spielt der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle für die biliäre Erkrankung in *cpk/cpk*-Mäusen. Während BALB/c, DBA/2J oder CD1 biliäre Zysten entwickeln, findet man keine in Mäusen, die zur C57BL/6J-Linie gehören (Guay- Woodford, 2000).

Die Bedeutung primärer Cilien bei der Zystenentstehung war noch bis vor kurzer Zeit nicht erkannt. Das *orpk*-Mausmodell (Oak Ridge polycystic kidney, Moyer et al., 1994; Yoder et al., 1995) mit einer hypomorphischen Mutation des Tg737-Gens führte erst später zur Erkenntnis, dass primäre Cilien eine Rolle bei der Polyzystischen Nierenkrankheit spielen (Yoder et al., 2002). Das betroffene Protein; Polaris, welches an ciliären Axoneme und Basalkörperchen lokalisiert ist, zeigte sich als äußerst wichtig bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung von Cilien. Homozygot mutierte Mäuse dieses Modells zeigen renale Zysten, Fehlbildung der hepatischen Ducten und Hypoplasie der pankreatischen Ducten. Die primären Cilien in renalen, hepatischen oder pankreatischen Epithelien dieser Tiere sind stark verkümmert. Interessanterweise sind alle Proteine, die in ADPKD, ARPKD und Nephronophthise involviert sind, Teil dieser Organelle.

Ziele dieser Arbeit

Im ersten Teil der Arbeit sollte eine transgene Mauslinie mit Reportergen unter der Promotorkontrolle des *Pkd1*-Gens erstellt werden. Durch homologe Rekombination in *E. coli* sollte ein manipuliertes DNA-Fragment in einen größeren genomischen Abschnitt des *Pkd1*-Gens inseriert werden. Zwölf Antiseren gegen verschiedene Epitope des humanen Polycystin-1 sollten hinsichtlich ihrer Aktivität auf Sektionen von Mausembryonen untersucht werden.

Im zweiten Teil sollten die in dieser Arbeit entdeckten Spleißformen des *Pkd2*-Gens untersucht werden. Durch quantitative PCR sollte das Expressionsniveau einer sehr häufigen und potentiell translatierten Variante bestimmt und mit dem der normalen *Pkd2*-mRNA verglichen werden. Der Vergleich sollte an Geweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien der Maus erfolgen. Zellkulturexperimente sollten zur weiteren Charakterisierung der Variante beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsfirmen

Die verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Enzyme etc. wurden von folgenden Firmen bezogen:

Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage

Amersham Biosciences, Freiburg

Applied Biosystems, Foster City, USA

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Carl Roth GmbH + CO. KG, Karlsruhe

Charles River, Sulzfeld

Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH + Co, Köngen

Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

Corbett Research, Sydney, AUS

Dianova GmbH, Hamburg

Difco Laboratories, Detroit, Michigan .USA

Epicentre Technologies, Madison, USA

Eppendorf, Hamburg

Eurogentec, Seraing, Be

Exalpha Biologicals, Maynard, MA, USA

Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

Fluka Chemie AG, Buchs CH

GibcoBRL Life, Technologies Invitrogen, Karlsruhe

Greiner, Solingen,

Heraeus, Düsseldorf

Interactiva, Ulm

Invitrogen, Karlsruhe

Kem-En-Tec, Kopenhagen, DK

Nalgene-Nunc, Wiesbaden

New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA

New England Biolabs, Schwalbach / Taunus

Merck, Darmstadt

MWG Biotech, Ebersberg

Perkin-Elmer, Weiterstadt

Pharmacia Amersham, Freiburg

Promega GmbH, Mannheim

Qiagen, Hilden

Research Genetics, Inc., Huntsville, AL, USA

Riedel-de Haën, Seelze, Hannover

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Schleicher& Schuell, Dassel

SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg

SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen

Sigma Chemical Co

Stratagene, Heidelberg

Whatman Biometra GmbH, Göttingen

2.2 Geräte

ALF-Express	Pharmacia
ABI PRISM 310	ABI, Perkin-Elmer
DNA Thermal Cycler	Grant, Biometra, Perkin Elmer
Elektroporator	BioRad GenePulser
Filmentwickler	Kodak, RP X-OMat Prozessor
Gelelektrophorese-Einheit für Proteingele	BioRad Mighty Small™
Gelelektrophoresekammer	Pharmacia LKB GNA 100 Pharmacia LKB GNA 200 Fladder
Gelphotographie	Polaroid MP-4 Land Camera
Heizblöcke	Eppendorf Thermostat 5320 Stuart Test Tube Heater
Inkubator, Schüttler	Edmund Buhler, Laborgerätebau, Glastechnik, Umwelttechnik, SM 5

Kamera	RICO XR/X 3000D, SLR Kamera
Kaltlicht-Leuchte	Leica
Kühlzentrifugen	Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge Rotoren: Sorvall SS-34, Sorvall SH-MT
Mikroskop	Axioskop, Zeiss, Jena
Netzgeräte	Pharmacia GPS 200/400 Pharmacia EPS 3500
pH-Meter	Knick, ph-mV-Meter
Photometer	Genequant, Pharmacia
Schüttler	New Brunswick Scientific, Edison, N.J., U.S.A. Biodancer
Stereolupe	Leica MZ 12
Sterilbank	Heraeus Herasafe
Tischzentrifugen	Heraeus Sepatech Biofuge A Heraeus Sepatech Biofuge 13 Heraeus Labofuge I;
UV-Lampe	BACHOFER 302 nm; Vilbert Lourenat
Waagen	Sartorius Type 1801 Sartorius L2200S
Zentrifugen	BECKMAN CS-15R Centrifuge, Rotoren: F2402, F0630, S1480

Tabelle 2: Verwendete Geräte und Hersteller

2.3 Kultivierung von *Escherichia coli*-Kulturen

Als Standardmedium zur Kultivierung von *E. coli* wurde LB -Medium (Sambrook et al. 1989) verwendet.

LB-Medium:

Bacto Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

mit H₂O in ca. 900ml Volumen lösen, mit 1N NaOH auf pH 7,2 titrieren und mit H₂O auf 1 l auffüllen, autoklavieren.

Um LB-Platten herzustellen, wurde vor dem Autoklavieren 15g Agar zugegeben. Antibiotika wurden in das noch flüssige Medium (ca. 40- 45°C) zugegeben und dann in die Platten gegossen.

Zur Regeneration, bzw. zur Phänotypexpression, wurden *E. coli*-Zellen nach der Transformation für 45-60 min in SOB-, bzw. SOC-Medium inkubiert.

SOB-Medium:

Trypton 20 g
 Hefeextrakt 5 g
 NaCl 0,584 g
 KCl 0,18 g
 H₂O ad 1 l und autoklavieren

SOC-Medium:

Zu 98ml SOB werden steril hinzugefügt:
 2M MgCl 1 ml
 2M Glucose 1 ml

Antibiotikum	Konzentration	Besonderheiten
Ampicillin (Amp)	100µg/ml	bei Plasmiden mit großen Fragmenten (>10kb) mit 50µg/ml
Zeocin (Zeo)	50µg/ml	Nur mit LB _{Low Salt}
Chloramphenicol (Cm)	12,5µg/ml 25 µg/ml	Selektion von BACs p705-Cre
Kanamycin	50 µg/ml	

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika

2.3.1 Das LacZ-Gen als Selektionsmarker

Um bei transformierten Bakterienkolonien unterscheiden zu können, ob sie ein Insert im Plasmidvektor tragen, oder ob sie nur den religierten Vektor beinhalten, erfolgt die Insertion der DNA Fragmente häufig in das LacZ-Gen (z.B. bei pUC 18). Dadurch wird die Aktivität der β-Galaktosidase (LacZ) zerstört. Vor dem Gen befindet sich der Promotor

des Lac-Induktors, welches durch Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden kann. Die Induktion des LacZ-Gens ist nur erforderlich, wenn die Wirtszelle den Repressor des Lac-Promotors exprimiert. Dieses ist bei Bakterienstämmen, die ein bestimmtes F-Plasmid ins Genom integriert haben (F[']), der Fall wie z.B. die Stämme TOP10 F['] oder XL1 Blue. Bei Stämmen, die keinen Repressor für das Lac-Operon exprimieren, ist eine Induktion mit IPTG nicht nötig (z.B. TOP 10). Bei Expression des intakten LacZ-Gens wird das farblose X-Gal (5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galaktosid) gespalten und setzt einen blauen Farbstoff frei. So können fragmenttragenden Kolonien (farblos) von Kolonien mit religiertem Vektor unterschieden werden (blau).

Neben dem Antibiotikum zur Selektion Plasmid tragender Zellen wurde X-Gal (66 μ g/ml, Stammlsg. 40mg/ml im DMF) und IPTG (40 μ g/ml) kurz vor dem Gießen der Platten dem ca. 40-45°C warmen Medium zugesetzt.

2.3.2 Das *ccd*-Gen in pZErO als Selektionsmarker

Der Vektor pZErO 1.0 (Invitrogen) enthält zur Unterscheidung von fragmenttragenden Zellen das *ccd*-Gen, welches sich unter der Kontrolle des LacZ-Promotors befindet. Analog zum LacZ-Gen wird die Aktivität des *ccd*-Gens (controlled cell death) durch ein integriertes DNA-Fragment zerstört, so dass nur Kolonien mit einem Insert im Vektor wachsen können. Das Gen befindet sich unter der Kontrolle des LacZ-Promotors und kann in entsprechende Zellen per IPTG induziert werden (s.o.).

Das pZErO-Plasmid codiert unter anderem für eine Zeocinresistenz. Um Zeocin als Selektionsmittel (50 μ g/ml) einzusetzen, musste die Konzentration im LB-Medium an NaCl halbiert werden (LB_{Low Salt}), da das Antibiotikum bei zu hohen Kochsalzkonzentrationen nicht aktiv ist.

2.3.3 Verwendete *Escherichia coli* Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP 10	F ['] , <i>mcrA</i> , $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Delta 80 lacZ\Delta$ M15, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta ara-$ <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen

TOP 10F'	F' {lacI ^q Tn10Tet ^R }, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
XL1 Blue	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk-mk+</i>), <i>lac</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , F'[<i>proAB</i> , <i>lacqZ</i> ΔM15, Tn10]	Stratagene

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme

2.3.4 Gefrierkulturen von *E. coli*

Von Bakteriensuspensionen wurden Gefrierkulturen angelegt, indem sie nach selektiver Anzucht 15 Minuten in Eiswasser inkubiert, davon 500µl in ein Kryoröhrchen überführt, mit 200µl sterilem Glycerin vermischt und bei -70°C gelagert wurden.

2.3.5 Elektrokompente Zellen

Für die Transformation von Nukleinsäuren in Bakterien wurde häufig das Elektroporationsverfahren verwendet. Um die Transformationseffizienz zu steigern, wurde folgendes Protokoll verwendet (Chuang et al., 1995).

Von einer Übernachtskultur von *E. coli* (XL1-Blue oder Top 10 bzw. TOP 10F') wurden 1,5 ml in 200 ml LB-Medium angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 18°C und 200- 250 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) zwischen 0,4 und 0,5. In dieser logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen für 10 min in Eiswasser inkubiert, anschließend zentrifugiert und 3-4 mal in eiskaltem, sterilem Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in ca. 600 µl H₂O mit 7% DMSO resuspendiert und in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren, Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff oder bei -70°C.

2.3.6 Transformation von DNA in Bakterien

2.3.6.1 Elektroporation

Um sicher zu gehen, dass die zu transformierende DNA keine zu hohen Salzkonzentrationen enthält und so einen Lichtbogen bei der Elektroporation verursacht, wurde mit der zu transformierenden DNA wie folgt verfahren:

ad 50µl ddH₂O

ad 500µl Butanol

Vortexen

Zentrifugation 13000 rpm, 10min

Überstand abnehmen, Pellet kurz trocknen

Resuspension in 10µl ddH₂O

2-4µl zur transformierende DNA Lösung wurden zu den auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Zellen zugegeben und weitere 15- 30 min auf Eis gelagert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5kV, 25µF, 400MΩ in eisgekühlten 0,2 cm Küvetten im GenePulser (BioRad). Danach wurden die Zellen in 500µl SOC-bzw. SOB-Medium für 45- 60 min inkubiert. Erst dann erfolgte die Selektion auf Antibiotika-haltigen Platten.

2.3.6.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente Zellen (Top10, bzw TOP 10F') der Firma Invitrogen wurden auf Eis aufgetaut. Nach vorsichtiger Zugabe der zu transformierenden DNA (2-4 µl)erfolgte eine weitere Inkubation für 15-30 min auf Eis, bevor die Zellen für 45 s in ein 42°C warmes Wasserbad kamen, um daraufhin wieder für 2 min auf Eis gelagert zu werden. Anschließend erfolgte eine 45-60-minütige Inkubation (37°C, 225 rpm) in 450 µl vorgewärmtem SOC-, bzw SOB-Medium, bevor die Suspensionen auf selektiven Medien ausgestrichen wurden.

2.3.7 „ET-Cloning“

Zhang et al. veröffentlichten 1998 eine Methode mit der gezielte homologe Rekombination in *E. coli* durchgeführt werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Arabinose induzierbare Plasmid pBAD-ET γ entwickelt. Es enthält u.a. die Gene *recE*, *recT* und *red γ* . RecT-Protein paart homologe DNA-Stränge und bewirkt deren Austausch. Es wird von diesem Plasmid konstitutiv exprimiert. Für den Austausch der Stränge wird zudem RecE (eine Exonuklease VIII) benötigt, die unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors gestellt wurde. Red γ ist ein virales Protein, das den Abbau von linearen DNA-Fragmenten durch das RecBC System in *E. coli* verhindert. Mit diesem System können Elemente per Rekombination in Plasmide eingebracht werden, wobei die Rekombinationsrate abhängig von der Länge der flankierenden homologen Sequenzen ist. Mit zunehmender Länge dieser Bereiche erhöht sich die Effizienz der Rekombination.

In der Regel wird ein Markergen, meist eine Antibiotika-Resistenz, zwischen die flankierenden homologen Bereiche inseriert, um erfolgreiche Rekombinationsereignisse selektieren zu können. Werden diese Markergene noch zusätzlich mit flankierenden LoxP oder FRT-Sequenzen versehen, so können diese anschließend über ein weiteres Rekombinationsereignis wieder deletiert werden. In dieser Arbeit wurde das Plasmid p705-Cre verwendet, um eine LoxP-flankierte Zeocinresistenz zu entfernen. p705-Cre ist temperatursensitiv und wird als „low-copy“ Plasmid bei 30°C repliziert. Auf diesem Plasmid befindet sich die Cre-Rekombinase, die LoxP-flankierte Sequenzen erkennt und je nach Orientierung der LoxP-Stellen den dazwischen liegenden Bereich deletiert oder invertiert. In dieser Arbeit wurden die LoxP-Stellen so orientiert, dass es zu einer Deletion des Markergens kam. Die Cre-Rekombinase ist unter der Kontrolle eines lambdaPR-Promotors, der bei 30°C nur sehr schwache und bei 37°C starke Expression bewirkt. Durch die Temperaturanhebung auf 37°C kommt es also zu einem Expressionsstoß der Cre-Rekombinase, das Plasmid wird aufgrund der Temperatursensitivität jedoch nicht weiter repliziert.

Die linearisierten Fragmente und die Plasmide mit homologen Bereichen wurden per Elektroporation in Arabinose-induzierte pBAD-ET γ tragenden TOP10F[']-Zellen transformiert. Die Rekombination wurde per Restriktionsanalyse bestätigt, das rekombinierte Plasmid erneut transformiert, um sicher zu gehen, dass es keine Verschleppung der nicht rekombinierten Ausgangsplasmide gab. Das reine, rekombinierte Plasmid wurde dann zusammen mit p705-Cre per Elektroporation transformiert und zwei

Tage bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden danach in 5 ml Medium angeimpft. Durch eine Miniprep wurden am nächsten Tag die Plasmide isoliert und per Restriktion analysiert.

2.3.8 Elektrokompente Zellen für das „ET-Cloning“

Nach Transformation des pBAD-Ety in TOP 10 F'-Zellen und Selektion auf Ampicillin Platten wurde eine Kolonie in 5ml LB_{Amp} über Nacht bei 37°C, 225 rpm inkubiert. Eine Glycerin-Lösung (10%) wurde zuvor für mindestens 3h in Eiswasser gestellt. 0,7 ml der Baktereinsuspension wurden in 70 ml Glukose-freies LB_{Amp} bis zu einer OD₆₀₀= 0,1 -0,15 angezogen, dann 0,7 ml einer 10 %igen L-Arabinose Lösung (10%) hinzu gegeben und die Zellen weitere 45 – 60 min bis zu einer OD₆₀₀= 0,3 – 0,4 inkubiert. Durch Zentrifugation bei 7000 rpm und -4°C wurden die Zellen sedimentiert und vorsichtig in 30 ml eiskalter Glycerinlösung (10%) resuspendiert. Auf diese Weise wurden die Zellen insgesamt dreimal gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde die verbleibende Flüssigkeit restlos entfernt, die Zellen in 200µl 10% Glycerin resuspendiert und zu 50µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.9 Plasmidvektoren

Vektor	Selektion	Referenz
pZErO-1	Zeocin	Invitrogen
pCR2.1 Topo TA	Kanamycin, Ampicillin	Invitrogen
pThio His A, B, C	Ampicillin	Invitrogen
pEYFP-C1	Kanamycin, Neomycin	Clontech
pEYFP-N1	Kanamycin, Neomycin	Clontech
pDsRed-N1	Kanamycin, Neomycin	Clontech
pIRES-EGFP	Kanamycin, Neomycin	Clontech
pBad Ety	Ampicillin	Gene Bridges, Dresden
p705-Cre	Chloramphenicol	Gene Bridges, Dresden
pUC 18, 19	Ampicillin	New England Biolabs

Tabelle 5: Verwendete Plasmidvektoren

2.4 DNA Isolierung

2.4.1 Plasmidpräparation (Miniprep)

Um Restriktionsanalysen an Plasmiden durchzuführen, wurden 3ml einer 5ml-üN-Kultur 1min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 200µl Lösung S1 resuspendiert. Mit 200µl S 2-Lösung. wurden die Zellen lysiert, Proteine und DNA denaturiert und 5 min bei RT inkubiert. Zur Neutralisierung wurden 200µl S3-Lösung zugegeben und der Ansatz 10 min bei 13000 rpm (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (ohne weißes Zelledebris!), die darin enthaltenen Plasmide mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol versetzt und 20 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 70%EtOH gewaschen, anschließend getrocknet und in 50µl TE pH 8.0 oder Tris/ HCl pH 8.0, bzw. H₂O resuspendiert und bei -20°C gelagert.

Die erhaltenen Plasmide konnten problemlos Restriktionsanalysen unterzogen werden. Für Sequenzanalysen ist dieser Art der Plasmidisolierung jedoch nicht ausreichend. Mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) konnten die Plasmidlösungen nach Anweisungen des Herstellers wie ein PCR-Produkt schnell gereinigt und zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Lösung S1:

50 mM Tris/HCl,
10 mM EDTA,
100 µg RNase A/ml,
pH 8,0

Lösung S2:

200 mM NaOH
1% SDS

Lösung S3:

2,8 M KAc
pH 5,1

2.4.2 Plasmidpräparationen mit Ionenaustauschersäulen

Um möglichst reine Plasmidpräparationen zu erhalten, die zur Sequenzierung oder zur Archivierung eingesetzt wurden, kamen die kommerziellen Kits QIAprep (Qiagen) oder JETStar 2.0 (Genomed, Bad Oeynhausen) zum Einsatz. Die Plasmide wurden entsprechend der Angaben des Herstellers aufgearbeitet und anschließend bei -20°C gelagert.

2.4.3 DNA Isolierung aus Gewebeproben/ Phenol-Chloroform-Fällung

Für die Isolierung von genomischer DNA aus Geweben wurden die Gewebestückchen in 750µl Lysispuffer mit zusätzlich 50µl Proteinase K (10mg/ml) gegeben und bei 55°C üN inkubiert, bzw. nur solange, bis das Gewebe sich aufgelöst hatte. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 400µl Phenol und 400µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1). Die Lösungen wurden durch Schütteln vermischt und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und auf 2ml mit Isopropanol aufgefüllt und durchmischt. Die gefällte DNA wurde je nach Verwendungszweck entweder aus dem Gefäß gefischt oder durch Zentrifugation sedimentiert. Nach einem Waschschrift in 70% EtOH wurde die DNA in 200µl TE resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Lysispuffer:

- 10 mM Tris/HCl pH 8,0
- 10 mM EDTA
- 10 mM NaCl
- 0,6% SDS

2.4.4 DNA-Fällung mit Ethanol

Zur Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen, um sie beispielsweise zu konzentrieren, kann eine Ethanol-Fällung vorgenommen werden. Nach Zugabe von 1/10 Vol. Na-Acetat (3M, pH 5,2) in die DNA-Lösung wird anschließend das 2,5-fache Volumen Ethanol abs. (-20°C) pipettiert und gemischt. Es erfolgt eine Pelletierung der DNA durch Zentrifugation (13000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wird abgegossen und das Präzipitat mit 70%igem EtOH gewaschen. Abschließend wird das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Nach dem

Trocknen wird das Pellet in der gewünschten Menge Aqua dest. oder TE-Puffer gelöst. Genomische DNA wurde vorsichtig schüttelnd über Nacht resuspendiert.

2.4.5 DNA-Fällung mit Isopropanol

Alternativ zur Ethanolfällung kann DNA durch Zugabe von 0,7-2 Volumen Isopropanol gefällt werden. Die mit Isopropanol vermischte Probe wurde 20-30 min bei 13000rpm, 4°C zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen, das Pellet mit 70% EtOH gewaschen, erneut bei 13000 rpm, 4°C für 5 min zentrifugiert und der Überstand danach wieder verworfen. Nach Trocknung des Pellets wurde es in H₂O, TE oder 10 mM Tris/HCl pH 8,0 gelöst.

TE-Puffer

10 mM Tris HCl pH 8,0
1 mM EDTA

2.5 RNA-Isolierung aus Gewebeproben und Zellkulturen

2.5.1 RNA Isolierung mit TRIzol®Reagent

50-100 mg Gewebe wurden in 1 ml TRIzol (Invitrogen) homogenisiert, wobei das Volumen der Gewebeprobe kleiner als 1/10 des TRIzol-Volumens sein sollte. Zellkulturen wurden mit 1 ml TRIzol pro 10 cm² durch Auf- und Abpipettieren abgelöst und lysiert. Die erhaltenen Suspensionen wurden 5 min bei RT inkubiert, bevor 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol zugegeben und kräftig geschüttelt wurde. Nach 2-3 min RT wurden die Proben bei max. 12000 g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die obere, wässrige und farblose Phase in ein neues Gefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation bei max. 12000 g, 4°C für 10 min wurde die RNA pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit mindestens 1ml 70% EtOH pro 1 ml TRIzol gewaschen. Nach einer Zentrifugation bei max 7500 g, 4°C für 5 min wurde das Pellet kurz getrocknet und in ddH₂O durch Pipettieren resuspendiert und anschließend bei 55°C für 10 min inkubiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.5.2 RNA-Isolierung mit RNeasy Kit (Qiagen)

Um eine einheitliche, einfache und schnelle Isolierung der RNA für quantitative PCR Analysen durchzuführen, wurden RNeasy Kits von Qiagen verwendet. Die RNA wurde nach Anweisungen des Herstellers aus verschiedenen Geweben isoliert und anschließend bei -20°C gelagert.

2.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Isolierte DNA- und RNA-Proben wurden mit dem Genequant Photometer der Firma Pharmacia quantifiziert. Neben der reinen Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren ermittelt das Gerät auch den Verunreinigungen mit Proteinen durch Bildung des OD₂₆₀/OD₂₈₀-Quotienten, der bei einer DNA Lösung zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Die Messung erfolgte in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm. Nach einer Referenzmessung mit dem Lösungsmittel (ddH₂O, TE) wurde die Konzentration der Nukleinsäure in einer definierten Verdünnung bestimmt und daraus die Konzentration der Ausgangslösung vom Gerät berechnet.

2.7 Gelelektrophorese von DNA Fragmenten

Für die Größenbestimmung wurden PCR-Produkte, restringierte Plasmide bzw. DNA Fragmente durch Elektrophorese in Agarosegelen aufgetrennt. Agarose wurde in der gewünschten Menge im Laufpuffer aufgekocht und vor dem Gießen auf Gelschlitten mit 1µl Ethidiumbromid (EtBr) (5mg/ml) pro 1 ml Lösung vermischt, wodurch das nachträgliche Färben der Gele in EtBr-Lösung entfiel. Als Laufpuffer wurde in der Regel TBE verwendet. Sollte das Gel anschließend einem Southern Transfer unterzogen werden, so wurde TEP-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladepuffer vermischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Abhängig von der Größe des Gels und der DNA-Fragmente wurde eine Feldstärke von 0,5 – 5 V/cm für 30 min - 12 h angelegt. Die Gele wurden unter UV-Licht mit einer Polaroidkamera dokumentiert. Die Größenstandards wurden von Gibco BRL/Invitrogen, New England Biolabs und Fermentas bezogen.

TBE-Laufpuffer, 10 x :

1 M Tris Borat
20 mM EDTA
pH 8.0

TEP-Laufpuffer, 10 x:

360 mM Tris
300 mM NaH₂PO₄
10 mM EDTA
pH 7,8

Ladepuffer:

60% Saccharose (6g)
0,3% Bromphenol-Blau
0,3% Xylen-Cyanol

Agarosekonzentration [%]	Effizienter Trennbereich [kb]
0,5	2 - 25
1	0,5 – 7
1,5	0,2 – 3
2	0,1 - 2

Tabelle 6: Trennbereiche von Agarosegelen

2.7.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers verwendet.

2.8 Southern Transfer (Southern Blot)

Um Hybridisierungsexperimente an DNA-Fragmenten durchzuführen, musste die DNA nach Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung aus den Agarosegelen auf Nylonmembranen transferiert werden. Um später Fragmentgrößen ungefähr zuordnen zu können, wurde das Gel mit einem fluoreszierenden Lineal fotografiert, das unterhalb der Geltaschen an die Größenstandards angelegt wurde. Das Gel wurde dann zunächst für 10 min in 0,25M HCl depurinieren, um den Transfer von großen Fragmenten zu erleichtern, wobei das Gel vollständig von der Lösung bedeckt sein musste. Nach einem kurzen Waschgang in H₂O erfolgte eine Denaturierung in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl für 30 min mit anschließender Äquilibrierung in 2xSSC. Das Gel wurde luftblasenfrei auf einen Stapel 3MM Whatman Filterpapier gelegt, das eine Flüssigkeitsbrücke mit einem unter einer Glasplatte platziertem 20x SSC-Reservoir bildete. Die Geltaschen wurden entfernt und einer positiv geladenen Nylonmembran, die der Größe des Gels entsprach, luftblasenfrei aufgelegt. Um das Gel herum wurde Frischhaltefolie gelegt, damit der Kapillarstrom nur durch das Gel erfolgen konnte. Auf die Nylonmembran wurden drei Lagen in 2xSSC angefeuchtetes 3MM Whatman Papier gelegt. Darüber befanden sich mehrere Schichten saugfähigen Zellstoffs, auf den eine Glasplatte und ein zusätzliches Gewicht von ca. 500-1000 g gelegt wurden. Der Transfer erfolgte über Nacht. Die Membran wurde danach mit 2xSSC gespült und die DNA für 1-2 h bei 80° mit der Membran vernetzt.

2.9 DNA-DNA-Hybridisierung

2.9.1 Radioaktive DNA-Sonden

Für Hybridisierungsexperimente wurden unter anderem radioaktiv markierte PCR-Produkte oder durch Restriktion erhaltene DNA-Fragmente eingesetzt. Die Markierung der Sonden mit α -P³²-dCTP erfolgte enzymatisch mit dem „High Prime Kit“ (Roche). 50 bis 100 ng der Sonde wurden in 11 μ l H₂O für 10 min im Wasserbad gekocht, 5 min auf Eis abgekühlt und mit 5 μ l (50 μ Ci) α -³²P-dCTP und 4 μ l Reaktionsmix gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C. wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde über QIAquick-Säulchen (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.9.2 Nicht-radioaktive DNA-Sonden

Alternativ zur radioaktiven Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte Sonden eingesetzt, die durch Antikörper und einer anschließenden Enzymreaktion detektiert wurden. Die Markierung der Sonden erfolgte mit dem „DIG-DNA-Labeling Kit“ (Roche) nach Angaben des Herstellers. Zufällige Hexanukleotide werden als Startermoleküle auf die zu markierenden DNA nach Denaturierung aufgebracht, woraufhin mit Hilfe des Klenow-Fragments Digoxigenin gekoppeltes dUTP in den synthetisierten Strang inseriert wird.

2.9.3 Radioaktive Hybridisierung

Alle zu hybridisierenden Membranen wurden nach Befeuchtung mit 2x SSC bei 68°C für mindestens 1h im Hybridisierungspuffer (1ml/cm²) ohne Sonde prähybridsiert. 50-100 ng der denaturierten Sonde wurden zur auf 68°C vorgewärmten Hybridisierungslösung zugefügt und über Nacht mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dann in 2xSSC, 0,1% SDS zweimal 10 min bei RT gewaschen, bevor dreimal mit 0,1x SSC, 0,1-0,5% SDS bei 68°C gewaschen wurde. Mit einem Geigerzähler wurde dabei die Abnahme der Radioaktivität geprüft. Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet und danach in Frischhaltefolie verpackt, bevor ein BioMAX MR Röntgenfilm für 2-24 Stunden bei -70°C aufgelegt wurde.

2.9.4 Nichtradioaktive Hybridisierung

Die nichtradioaktive Hybridisierung wurde analog zur radioaktiven durchgeführt, nur, dass die Sonde Digoxigenin-markiert war. Um die Signale sichtbar zu machen, wurde die hybridisierte und gewaschene Membran zunächst für 1 min bei RT in Puffer 1 äquilibriert, bevor sie 30 min mit einer Blocking-Reagenz-Lösung (1% w/v in Puffer 1) bei RT inkubiert wurde. Daraufhin wurde das Anti-DIG Alkalische Phosphatase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:20000 in Puffer 2 gegeben und mit der Membran für 30- 60 min bei RT langsam rotiert. Unspezifisch gebundene Konjugate wurden durch zwei bis drei 15-minütige Waschschrte bei RT mit je 100 ml Waschpuffer entfernt. Nach einer 2-minütigen Äquilibrierung der Membran in Puffer 3 erfolgte eine Inkubation für 5 min in 1-2 ml einer 1:100 in Puffer 3 verdünnten CPD-Star, bzw. CSPD-Lösung (Roche), einem

Chemolumineszenzsubstrat. Die Membran wurde danach noch feucht, aber nicht nass in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein BioMAX MR Röntgenfilm für 15s – 10 min aufgelegt.

Puffer 1:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
mit NaOH (fest) auf pH 7,5 einstellen

Puffer 2:

Puffer 1 mit 1% Blocking Reagenz (w/v)

Waschpuffer:

Puffer 1 mit 0,3% Tween 20 (v/v)

Puffer 3:

0,1 M Tris/ HCl
0,1 M NaCl
pH 9,5

2.9.5 Koloniehybridisierungen auf Nylonmembranen

Zur Identifikation von Bakterienkolonien, die ein gesuchtes DNA-Fragment in einem Vektor beherbergten, wurde eine Nylonmembran (Roche) auf eine mit Bakterien bewachsene Platte gelegt und nach 2-3 min wieder entfernt. Die Membran wurde mit den Bakterien nach oben zunächst für 3 min auf ein mit 10% SDS getränktes 3MM Whatman Papier gelegt. Anschließend erfolgte eine Behandlung für 5 min auf einem mit 0,5N NaOH und 1,5 M NaCl durchfeuchtetem 3MM Papier (Denaturierung), bevor die Membranen 5 min auf einem mit 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,4 durchnässtem 3MM Papier neutralisiert wurden. Überschüssige Flüssigkeit wurde von allem 3MM Papieren vorher entfernt. Letztlich wurde die Membran noch für 5 min auf einem mit 2x SSC durchtränktem 3MM Papier platziert, bevor sie für 1- 2 h bei 80°C gebacken wurde. Die gesuchten Kolonien wurden durch Hybridisierung mit geeigneten Sonden identifiziert.

2.10 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

2.10.1 DNA-Restriktion

Eine quantifizierte Menge DNA wurde mit der notwendigen Volumen 10x Puffer, sowie ca. 1U Enzym/ μg DNA versetzt und bei der optimalen Temperatur (meist 37°C) für 1 – 12h inkubiert. Bei der Verwendung von mehr als einem Enzym wurde der nach Tabelle des Herstellers ein Puffer mit maximaler Aktivität der Enzyme verwendet. Alternativ wurden die Enzyme nacheinander verwendet. Die DNA wurde zwischen den Restriktionen per Phenol/ Chloroform Extraktion gereinigt. Die Analyse der Restriktionen erfolgte auf Agarosegelen.

2.10.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Bei der Ligation von Vektoren und einem DNA-Fragment kommt es häufig vor, dass der Vektor mit sich selbst ligiert wird, wenn er mit nur einem Enzym restringiert wurde. Um dieses zu vermeiden, wurden die 5'-Enden des restringierten Vektors mit einer alkalischen Phosphatase (Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), Roche) behandelt. Nach (Hitze-) Inaktivierung des Restriktionsenzym wurde in das gleiche Gefäß 10x SAP-Puffer sowie 1 U Enzym pro 50-100 ng Vektor pipettiert und für mind. 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte für 10 min bei 65°C mit anschließender Fällung und darauf folgendem Lösen der DNA in H₂O.

Alternativ zur SAP wurde CIP (Calf Intestinal Phosphatase, New England Biolabs) benutzt. Diese ist allerdings kaum hitzeinaktivierbar und musste daher per Phenol-Chloroform-Fällung entfernt werden.

2.10.3 Auffüllen von 5'-Überhängen mit Klenow-Enzym

Mussten nach einer Restriktion (z.B. durch *Bam*HI) die überhängenden 5'-Enden aufgefüllt werden, um glatte Enden zu erzeugen, so wurde dazu das Klenow-Enzym (New England Biolabs) eingesetzt. Bei dieser Polymerase ist die 3'-5'-Exonuklease durch Mutationen inaktiviert und ihr fehlt die 5'-3'-Exonukleaseaktivität, so dass 5'-Überhänge von ihr nicht entfernt werden können. In Gegenwart von Nukleotiden im geeigneten Milieu werden die Überhänge jedoch aufgefüllt. In einem Gesamtvolumen von 25 μl wurden die

Restriktionsfragmente mit 2,5 µl Puffer (*Hind*III, 10x), 5µl dNTPs (jeweils 0,5mM) sowie 1U Klenow-Enzym versetzt und bei 37°C für 2h inkubiert. Die Hitzeinaktivierung erfolgte bei 75°C für 20 min.

2.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Um restringierte und isolierte DNA-Fragmente mit einem Vektorplasmid zu verbinden, kam die T4-DNA Ligase (New England Biolabs) zum Einsatz. Plasmide und DNA-Fragmente wurden im molaren Verhältnis 1:3 – 1:5 gemischt, das entsprechende Volumen 10x T4 Ligationspuffer und 1U T4-Ligase/µg DNA zugegeben und bei 14°C über Nacht inkubiert.

2.10.5 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten, die mit einer Polymerase mit terminaler Transferaseaktivität erzeugt wurden, erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers. Im Gegensatz zur klassischen Ligation ist das Enzym, eine Topoisomerase, direkt an den Reaktionsort gekoppelt. Dadurch ist eine Ligationszeit von 5 Minuten bei RT ausreichend. Die anschließende Transformation erfolgte in chemisch kompetente Zellen.

PCR-Produkte, die durch Polymerasen mit „proofreading“ Aktivität erzeugt wurden und daher keine „A“-Überhänge hatten, wurden nach der klassischen Methoden mit einem *Eco*RV-restringierten pZeRO 1.0 ligiert und entweder in chemisch kompetente oder elektrokompente Zellen transformiert.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Thermostabile Polymerasen werden zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten eingesetzt. Oligonukleotide („Primer“) mit einem freien 3'-OH Ende, die einen Abschnitt flankieren und komplementär zur Ausgangs-DNA sind, fungieren dabei als Startermoleküle. Nach einer Denaturierungsphase, in der die Stränge der DNA, die als Matrize dient, getrennt werden, folgt die Anlagerung der Primer bei einer spezifischen Temperatur (Annealing). Die thermostabilen Polymerasen verlängern in der Synthesephase die Oligonukleotide mit

der Ausgangs-DNA als Vorlage. Diese drei Schritte werden wiederholt bis der Abschnitt vervielfältigt ist. Grundsätzlich wird folgendes Temperaturprofil durchlaufen:

1.	94°C	1,5- 5 min	Initiale Denaturierung
2.	94°C	15 - 30 s	Denaturierung
3.	52-68°C	15 - 30 s	Annealing
4.	72°C	60 s pro 1000 bp	Synthese
5.	72°C	5 min	finale Elongation/ Synthese
6.	4-12°C	∞	

Die Schritte 2.- 4., in denen die Matrize im Idealfall exponentiell vermehrt wird, werden 25- 35 Mal wiederholt.

Bei Oligonukleotiden mit hoher Schmelztemperatur wurde alternativ eine PCR mit nur zwei Schritten angewendet. Anlagerung der Primer und Synthese des Stranges erfolgten bei derselben Temperatur (68- 70°C)

Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang.

2.11.1 Standard PCR-Reaktionen

Eine Standard-PCR-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

DNA (genomisch)	100- 200	ng
10x PCR-Puffer	2,5	µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	1	µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	1	µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	1	µl
Polymerase	0,2	µl
H ₂ O	ad	25 µl

2.11.2 Spezielle PCR-Reaktionen

Manche PCR-Formate ließen sich mit den Standardreaktionsbedingungen nicht amplifizieren. Hier kam häufig eine spezielle Taq-Polymerase zum Einsatz, die im Institut für Molekulare Pathologie im ZMBE in Münster hergestellt wurde. Neben einem eigenen PCR-Puffer wurden dem Ansatz noch 500mM Betain und 5% Dimethylsuloxid (DMSO) beigefügt:

DNA (genomisch)	100- 200	ng
10x PCR-Puffer	2,5	µl
dNTPs (jeweils 10 mM)	1	µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	1	µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	1	µl
Betain 5 M	2,5	µl
DMSO	1,25	µl
Polymerase	0,2	µl
H ₂ O	ad 25	µl

PCR-Puffer 10x:

0,5 M Tris⁷ HCl pH 9,5

0,2 M (NH₄)₂SO₄

10 mM DTT

15 mM MgCl₂

0,05% NP-40

Zur Optimierung der Reaktionen wurde die Konzentration an MgCl₂ bis auf 3,5 mM Endkonzentration variiert.

Bei manchen Formaten wurde den Reaktionen noch Tetramethylammoniumchlorid (TMAC) in einer Konzentration von 1×10^{-4} - 1×10^{-5} M zugegeben. TMAC äquilibriert die Energien der A-T und G-C Duplex-Paarungen und reduziert potentielle Fehlpaarungen, so dass unspezifische Anlagerungen der Oligonukleotide stark verringert werden (Hung et al., 1995).

Problematische Formate wurden permanent auf Eis gehalten, um die Aktivität der Polymerase zu minimieren und unspezifischen Kettenverlängerungen während des Ansatzes der Reaktion zu vermeiden. Die Reaktionsgefäße wurden dann vom Eis unmittelbar in vorgeheizte PCR-Maschinen (95°C) überführt.

2.12 Reverse Transkription von RNA

RNA kann in PCR-Reaktionen nicht direkt eingesetzt werden, da die DNA-abhängigen Polymerasen RNA nicht als Matrize verwenden können. Die RNA muss zunächst in DNA umgeschrieben werden. Dies geschieht mit Hilfe retroviraler Reverser Transkriptasen.

Reverse Transkriptionen wurden mit der SuperScript™ II, bzw. III Kit, (Invitrogen) durchgeführt.

Totale RNA	0,5- 2	µg
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈	200-500	ng
dNTP-Mix (jedes Nukleotid 10 mM)	1	µl
H ₂ O	ad 13	µl

Das Gemisch wurde für 5 min bei 65°C inkubiert und danach für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Die Reaktionsgefäße wurden kurz zentrifugiert, bevor

5x First-Strand Buffer	4	µl
0,1 M DTT	1	µl
RNaseOUT™	1	µl
SuperScript™ II, bzw. III (200 U/µl)	1	µl

zugegeben und vermischt wurden. Die Inkubation erfolgte zunächst für 60 min bei 50°C, dann für 30 min bei 55°C, bevor der Ansatz bei 70°C in 15 min inaktiviert wurde. Das Volumen wurde daraufhin mit H₂O auf 50µl aufgefüllt, wovon 5µl für eine PCR-Reaktion verwendet wurden. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.13 DNA-Sequenzierung

2.13.1 ALF-DNA-Sequencer

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Sequenzierungen mit dem ALF-DNA-Sequencer (Pharmacia) durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der SequiTherm EXCEL™II Long Read™ Premix (Biozym) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.13.2 ABI PRISM® 310 und ABI PRISM ®3700

Die Sequenzierungsreaktionen für ABI PRISM Geräte wurden mit dem ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt.

PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierungsreaktion Pre-Sequencing Kit (USB Corporation, Cleveland, Ohio USA) vorbehandelt. Einzelsträngige Oligonukleotide werden dabei durch eine Exonuklease I hydrolysiert. Eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert die entstandenen Nukleotide, damit diese an der Sequenzreaktion nicht teilnehmen können. 3µl des PCR-Produktes wurde mit 0,6µl Exonuklease I und 0,6µl Alkalischer Phosphatase versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert, bevor die Enzyme durch Hitze (80°C, 15 min) inaktiviert wurden. Daraufhin folgte eine Dialyse des Ansatzes auf Mikrofilterplättchen (Millipore), wobei die Plättchen direkt auf Wasser gelegt werden und die zu dialysierende Probe auf das Plättchen pipettiert wird. Die Dialysezeit betrug 15 min.

Plasmide, die über Ionenaustauschersäulen gewonnen wurden, konnten direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden.

Reaktionsbedingungen für das Big Dye Terminator Ready Reaction™ Sequencing Kit:

1. Denaturierung	96°C	2	min
2. Denaturierung	94°C	10	s
3. Hybridisierung	50°C	5	s
4. Elongation	60°C	2-4	min

Der Reaktionsansatz wird nach der Sequenzreaktion mit ad 100µl mit H₂O versetzt. Nach Zugabe von 3M NaAc (pH 5,2) und 275µl abs. Ethanol wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Es folgte ein Waschschrift mit 500µl 80% EtOH, eine Zentrifugation für 5 min bei 10000 rpm. Der Überstand wurde anschließend wieder entfernt. Das Pellet wurde in 20 µl TSR (Template Suppression Reagent, Applied Biosystems) resuspendiert.

2.14 Quantitative PCR

Die quantitativen PCR-Untersuchungen am Pkd2-Gen wurden mit dem „TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit“ (Applied Biosystems) auf dem RotorGene 3000 (Corbett Research) durchgeführt.

Bei dem Taqman-Prinzip wird zu einem idealerweise 50-150 bp großen Amplikon eine Sonde erzeugt, die im Bereich zwischen den Oligonukleotiden mit einem Strang des PCR-Produkts nach der Denaturierung hybridisieren kann. Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Reporter) und am 3'-Ende mit einem Quenchermarkiert. Auf dieses wird die Energie des angeregten Farbstoffs übertragen, solange es sich in räumlicher Nähe befindet. Der Quencher wird dabei angeregt, emittiert aber bei der Rückkehr in den Grundzustand in einer Wellenlänge, die nicht detektiert wird.

Nur hybridisierte Taqman-Sonden werden während der Strangsynthese von der 5'-3' Exonuklease Aktivität der Polymerase zu Nukleotiden hydrolysiert. Dadurch werden Fluoreszenzfarbstoff und Quenchermarkiert räumlich voneinander getrennt und der Fluoreszenzfarbstoff emittiert bei Rückkehr in den Grundzustand Licht. Die Zunahme des PCR-Produkts wird über die Zunahme der Lichtemission bei Anregung gemessen. In diesem System können verschiedene Taqman-Assays in einer Reaktion verwendet werden, sofern sie sich nicht bei der Amplifikation gegenseitig beeinflussen. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, die bei unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden bzw. emittieren, werden die verschiedenen Formate in einer Reaktion gemessen.

Reaktionsansatz mit dem TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit:

RNA	bis 150 ng
Primer 3261	30 pmol
Primer 6814/ 6816	20 pmol
Taqman-Sonde	10 pmol
2x Master Mix	7,5µl
40x MultiScribe Mix	0,375 µl
ad 15 µl	H ₂ O

Reaktionsbedingungen:

1. 48°C 30 min Reverse Transkription
2. 95°C 10 min Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase
3. 95°C 15 s Denaturierung
4. 60°C 60 s Hybridisierung, Synthese und Datenaufnahme

Die Schritte 3 und 4 wurden 40- 45 mal wiederholt.

Wie Voruntersuchungen zeigten, konnte das „Taqman Rodent GAPDH Control Reagents Kit“ (Applied Biosystems) mit einer VIC™-markierten Taqman-Sonde als interne Kontrolle verwendet werden, ohne dass sich die PCR-Formate gegenseitig beeinflussten. Neben der Taqman-Sonde gehören Oligonukleotide für die spezifische Amplifikation des murinen GAPDH zum Kit.

Name	Sequenz	Modifikation
Pkd2 ex7 for2 (6814)	5'-CAT GGT ATT TTT GGT CTG GAT TAA GCT C-3'	
Pkd2delex7for (6816)	5'-CTG GAT GTT GTG ATT GTC GTG CTC- 3'	
3261	5'-GGG TGC CGA AGA CAA GGT ATG C-3'	
Taqman-Sonde Pkd2	5'-CCA TGA GCC AGC TCT CCA CAA CCA TGT C-3'	5': 6-FAM 3': Darquencher

Tabelle 7: Oligonukleotide für die Quantitative PCR

2.15 Zellkultur

Zelllinie	Medium
HeLa	DMEM, 10 % FCS, 1% Glutamin [2 mM], 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
MDCK C7	MEM, 10% FCS, 1% Pen/Strep
mIMDCK2	DMEM high Glucose; 10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamin [2mM], 1% Na Pyruvat

Tabelle 8: Zelllinien

HMEC-1 Zellen wurden im Institut für Medizinische Biochemie, ZMBE Münster von Herrn Dr. Arseni Markoff kultiviert. Alle Medien und Zusätze wurden über Gibco BRL, bzw. Invitrogen bezogen, Kulturflaschen und – schalen über die Firmen Greiner und Nalgene-Nunc.

Alle Arbeitsschritte bei der Zellkultur wurden mit größtmöglicher Sorgfalt unter einer Sterilbank (Herasafe, Heraeus) durchgeführt. Vor jedem Arbeitsgang wurden alle verwendeten Geräte mit 70% Ethanol gereinigt, um mögliche Kontaminationen durch Bakterien und Pilzsporen zu vermeiden. Alle Zellen wurden in einem Brutschrank der Firma Heraeus bei 5% CO₂, gesättigter Wasserdampf Atmosphäre und einer Temperatur von 37°C gehalten. Ein Wechsel des Mediums wurde in der Regel zwei– dreimal pro Woche vorgenommen, abhängig von der Zelldichte. Die alte Nährlösung wurde mit einer sterilen Glaspipette, die über ein Schlauchsystem an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, abgezogen, bevor das neue, vorgewärmte Medium zu den Zellen gegeben wurde.

Um konfluente Zellen vom Untergrund der Kulturflasche zu lösen, wurde sie nach Entfernen des Mediums mit PBS gewaschen. Danach wurden einige Tropfen Trypsin-Lösung (PBS, 0,05% Trypsin, 0,02% EDTA) zugegeben und das Ablösen der Zellen mikroskopisch kontrolliert. Nachdem sich alle Zellen abgelöst hatten, wurden sie mit 5 ml vollständigen Mediums aus der Flasche gespült und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen erneut in vollständigem Medium resuspendiert und auf Kulturfläschchen verteilt.

MDCK Zellen bilden bei Konfluenz eine sehr feste Zellschicht, die mit der oben beschriebenen Methode nicht vom Untergrund zu lösen ist. Deshalb wurden diese Zellen, nachdem sie mit PBS gewaschen waren, mit einem EDTA-Puffer für ca. 15 min bei 37°C inkubiert. Dadurch lösten sich die Zell-Zell-Verbindungen, was mikroskopisch sichtbar ist. Erst danach konnte das Ablösen mit Trypsin erfolgen.

PBS-Puffer (10x)

80,0 g NaCl
2,0 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄
2,4 g KH₂PO₄
ad 1 l mit H₂O, pH 7,4 mit HCl

EDTA-Puffer

0,1g EDTA
4,0 g NaCl
0,1 g KCl
0,575 g Na₂HPO₄
0,1 g KH₂PO₄
ad 500 ml H₂O, autoklavieren

Der pH-Wert dieser Lösung liegt sich zwischen 7,1 und 7,3.

2.15.1 Einfrieren der Zellen

Nachdem die subkonfluenten Zellen wie beschrieben abgelöst und pro Schale in 1ml Medium resuspendiert worden waren, wurden sie mit gleichem Volumen gekühltem Einfriermedium aufgefüllt. Nach Verteilung auf zwei Kryoröhrchen (Nalgene-Nunc) wurden die Zellen für max. 30 min bei 4°C gelagert, bevor sie in einer gekühlten (4°C) Styroporbox bei -70°C eingefroren wurden. Die Styroporbox verhindert ein zu schnelles Einfrieren der Zellen. Nach spätestens zwei Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Einfriermedium

- 55% Medium
- 30% Fötale Kälberserum
- 15% DMSO
- sterilfiltrieren

2.15.2 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, bei 37°C aufgetaut und in Kulturflaschen mit vollständigem Medium überführt. Nachdem die Zellen sich auf dem Untergrund festgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt.

2.15.3 Isolierung translatierter RNA aus membrangebundenen Polysomen

Zum Nachweis für die Translationsaktivität von mRNAs wurde die membrangebundene Fraktion der Polysomen nach Mechler (1987) isoliert. Der cytoplasmatische Teil aus 10^{10} HMEC-1 Zellen wird dabei durch Zentrifugation in einem Sucrose-Gradienten in verschiedene Kompartimente getrennt. Die Fraktion der membrangebundenen Polysomen wurde entnommen und die RNA per TRIzol-Reinigung isoliert.

2.15.4 Transfektionen

Zelltransfektionen wurden auf subkonfluenten Zellen mit dem Effectene Transfektions Reagenz der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die DNA wird dabei zunächst mit einem Reagenz kondensiert und anschließend mit kationischen Lipiden umgeben. Diese Komplexe können im Gegensatz zu vielen anderen Transfektionsmethoden in Serum- und Antibiotika-haltigen Medien angewendet werden. Zur Expression der transfizierten Plasmide wurden die Zellen 24- 48 h inkubiert.

2.15.5 Immunofluoreszenz von HeLa-Zellen

PKD1 und PKD1/Pkd2 oder PKD1/Pkd2d7 transfizierte Zellen wurden auf Deckgläschen in 100 mM Zellkulturschalen angezogen. Die Deckgläschen wurden mit PBS gewaschen, fixiert in 4% Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 für 10 min bei Raumtemperatur und mit PBS (0,5 % Triton X-100) permeabilisiert. Danach wurden die Zellen mit primärem Antikörper (M2-anti-Flag, Sigma, 1:2000) in 2% BSA/PBS für 1h inkubiert. Nach 4-5-fachem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit sekundärem, fluoreszenzmarkierten Antikörpern (Dianova, 1:2000) für 30-45 min inkubiert, gründlich mit PBS, einmal mit bidest. Wasser gewaschen und mit einem Tropfen Mowiol eingedeckelt (Zellseite nach unten). Die Zellpräparate wurden üN bei 37°C inkubiert, zum Austrocknen des Einbettmediums (Mowiol).

Mowiol (mit Bleichschutz für die Immunofluoreszenz)

2,4 g Mowiol (Hoechst)

6g Glyzerin

6ml H₂O

2 h bei RT schütteln

12 ml 0,2M Tris/ HCl ph 8,5

bei 53°C schütteln bis sich alles gelöst hat. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 5000 rpm, um nicht gelöste Partikeln zu entfernen. Als Bleichschutz wird zur Mowiol-lösung ¼ Vol. 2.5% N-Propyl-Galat (Sigma) in 50% Glyzerin/PBS, pH 7 zugegeben. Der Überstand wird in 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.15.6 Immunopräzipitation der Polycystine (nach Hanaoka et al., 2000)

Für die Immunopräzipitation der Polycystine wurde das Zellpellet in 1000 µl Lysis-Puffer lysiert, für 1 h auf Eis inkubiert und dann 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Das Lysate wurde mit 2µg von 9e10 monoklonalen anti-myc Antikörpern (Exalpha Biologicals) oder gleicher Menge von Pkd2-CT (von Dr. Arseni Markoff, Institut für Medizinische Biochemie, ZMBE Münster) oder PKD1-LRR (von F. Qian, Johns Hopkins University School of Medicine) bei 4°C für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurden 50µl Protein-G-Sepharose-Beads zugegeben und wiederum für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Immunopräzipitate wurden dann 5-mal mit Lysis-Puffer gewaschen und in 60µl Laemmli

Ladepuffer eluiert. Davon wurden zehn bis fünfzehn Mikroliter auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Lysis-Puffer

20 mM Na₃PO₄

150 mM NaCl

10% Glyzerin

1 mM EDTA

pH 7,2

1 µg/µl TM Protease Inhibitor Cocktail (Roche)

2.16 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate polyacrylamid gelelektropheresis) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der anlagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste des Polypeptides braucht aufgrund der starken negativen Ladung der SDS-Moleküle nicht berücksichtigt zu werden. Im Bereich der Sättigung werden 1,4 g Natriumdodecylsulfat pro 1 g Polypeptid gebunden. Optional können Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten werden. Dazu werden reduzierende Thiolverbindungen wie β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol dem Probenpuffer zugesetzt. Die Molekulargewichtsbestimmung der Polypeptide erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit der bekannter Proteine (Marker). Bei der Probenvorbereitung wurde SDS im Überschuss zu den Proteinen hinzugegeben und die Probe anschließend auf für 3-5 min auf 95 °C erhitzt bzw. für 30- 60 min bei 37°C inkubiert.

Für die Elektrophorese von Polycystin-1 wurde ein 4%iges Polyacrylamidgel verwendet, für die Analyse von Polycystin-2 ein 6%iges. Die Elektrophorese wurde mit dem Mighty Small™ Apparat der Firma BioRad durchgeführt. Das Acrylamid-Bisacrylamidgemisch (40%, 29:1) wurde von der Firma Roth bezogen.

Komponente	4% Acrylamidgel	6% Acrylamidgel
H ₂ O	3,1 ml	2,85 ml
40% Acrylamid Mix	0,5 ml	0,75 ml
1,5M Tis/HCl (pH 8,8)	1,3 ml	1,3 ml
10% SDS	50 µl	50 µl
10% Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung von 5 ml Trenngel

Komponente	3% Acrylamidgel	4% Acrylamidgel
H ₂ O	2,375 ml	2,3 ml
40% Acrylamid Mix	225 µl	300 µl
0,5M Tis/HCl (pH 6,8)	380 µl	380 µl
10% SDS	30 µl	30 µl
10% Ammoniumpersulfat	30 µl	30 µl
TEMED	2 µl	2 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung von 3ml Sammelgel

Laufpuffer (10x)

144 g Glycin
 30 g Tris Base
 100 ml SDS 10%
 ad 1l H₂O

Laemmli Probenpuffer

62,5 ml Tris/ HCl pH 6,8
 25% Glycerin
 2% SDS
 0,01% Bromphenolblau

2.17 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot)

Die Übertragung von Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran (Trans-Blot, Bio-Rad) erfolgte in einem Transfertank der Fa. Bio-Rad. Dazu wurde zunächst das Gel auf zwei Schichten in Transferpuffer angefeuchtetem Whatman 3MM luftblasenfrei aufgelegt. Die Membran wurde kurz in Methanol getaucht und ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit zwei Lagen mit Transferpuffer durchtränktem Whatman 3MM versehen. Dieses „Sandwich“ wurde in der zugehörigen Klammer so in den Transfertank gehängt, dass die Proteine, die im elektrischen Feld von der Katode zur Anode wandern, sich in Richtung der Membran bewegten. Danach wurde der Puffer eingefüllt und der Transfer für 1,5- 2 h bei 0,75A durchgeführt.

Transferpuffer

125mM Tris/HCl pH 8,6
192mM Glycin
20% Methanol

Sekundäre Antikörper wurden von der Firma Jackson ImmunoResearch bezogen und gemäß der vorgeschlagenen Verdünnung eingesetzt. Die Detektion wurde mit dem ECL-Plus Kit der Fa. Amersham Biosciences nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die an den sekundären Antikörper gebundene Horseradish Peroxidase oxidiert Luminol unter alkalischen Bedingungen und versetzt es in einen angeregten Zustand. Bei der Rückkehr zum Normalzustand wird Licht emittiert, welches mit einer lichtempfindlichen Membran (ECL Hyperfilm) dokumentiert wird.

2.18 Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikum der WWU Münster gehalten. Generell wurden vier Tiere in einem Standardkäfig mit Wasser ad libitum und einer Standardernährung (Altromin 1324) untergebracht. Mit künstlicher Beleuchtung wurde ein 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus (7.00- 19.00h) vorgegeben, die

Temperatur betrug $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Die Versuche wurden nach dem Deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und waren unter der Nummer G10/98 genehmigt.

2.19 Erzeugung transgener Mäuse

Mäuse des Stammes FVB/N wurden zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie eingesetzt. Dazu wurden zur Erhöhung der Ausbeute aus hormonell stimulierten Mäusen die durch FVB/N-Männchen befruchteten Oozyten entnommen. In die Pronuclei wurde das linearisierte *HindIII*-Fragment aus dem Konstrukt 11L3A injiziert. Dieser Arbeit wurde von Herrn Dr. Boris Skryabin, Institut für Experimentelle Pathologie, ZMBE Münster, durchgeführt. Das linearisierte Fragment wurde von Herrn Dr. Skryabin per Caesium-Chlorid-Gradienten-Zentrifugation gereinigt. Die behandelten Oozyten wurden in pseudoschwangere FVB/N-Weibchen transferiert. Pseudoschwangere Mäuse werden durch Verpaarung mit vasektomierten Männchen erhalten. Die Ovulation wird dabei durch einen mechanischen Reiz ausgelöst und die Weibchen sind in der Lage, implantierte, fertilisierte Oozyten auszutragen. Die Integration der Transgens in das Genom ist ein zufälliges Ereignis und kann nach der Karyogamie der Pronuclei erfolgen.

2.19.1 Nachweis des Transgens

Das Transgen konnte per PCR-Reaktion sowie per Southern Blot-Hybridisierung mit einer LacZ-Sonde nachgewiesen werden. Für die Amplifikation wurden die Primerpaare 4672/4833 (ein ca. 570 bp großes Produkt) sowie 4672/ 4834 (ein ca.830 bp großes Produkt) verwendet. Als Kontrollreaktion der isolierten DNA wurde GAPDH amplifiziert. Die dazu benötigte DNA wurde entweder aus Schwanzbiopsaten der Mäuse oder aus den Fruchtblasen und Nabelschnüren der Embryonen gewonnen.

2.19.2 LacZ-Färbung von Embryonen

Nach Tötung der Maus wurden die Embryonen vorsichtig entnommen und in einer Petrischale mit PBS (1mM MgCl_2) gewaschen. Aus der Nabelschnur und der Fruchtblase wurde die DNA isoliert, um den Genotyp des Embryos zu bestimmen. Die Embryonen wurden in 4% Paraformaldehyd (in PBS pH 7,4, 1 mM MgCl_2) fixiert, und zwar bis zum

Embryonaltag 11 (E11) für 5 min, ab E12 für 15 min und ab E15 für 30 min. Anschließend wurden die Embryonen in PBS pH 8,0 mit 1mM MgCl₂, 0,02% Natrium-Desoxycholat, 0,02% NP40 für 3 x 15- 30 min gewaschen. Die Färbung erfolgte in PBS pH 8,0 mit 1mM MgCl₂, 5 mM K₄Fe(CN)₆, 5 mM K₃Fe(CN)₆ und 1mg/ml X-Gal, bzw. Bluo-Gal für 4- 24 h bei 30°C.

2.20 Immunhistologische Untersuchungen an Embryosektionen von Mäusen

Die Sektionen der Mausembryonen im Alter von ca. E13,5 wurden von Petra Pennekamp, Institut für Humangenetik, Münster, zur Verfügung gestellt. Schnitte in Paraffin eingebetteter Embryonen waren für die Untersuchung mit Antikörpern nicht geeignet, da sie einen sehr großen Hintergrund aufwiesen. Deshalb wurden 8µm Kryosektionen verwendet. Die Schnitte wurden zunächst bei RT an der Luft aufgetaut und anschließend für 10- 20 min bei RT in PBS pH 7,4 mit 0,5 % Triton X-100 inkubiert. Die Präparate wurden mit PBS pH 7,4 mit 3% Rinder Serum Albumin (BSA) und 10 % Fötalem Kälber Serum (FCS) für 15- 30 min bei RT blockiert, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern. Der primäre Antikörper wurde auf Schnitten in einer 1: 100 Verdünnung in der Blockierungslösung verdünnt, auf das Gewebe aufgetragen und 1-2 h bei RT inkubiert. Die Objektträger wurden während der Inkubationszeiten in Behältern aufbewahrt, die mit wassergetränkten Zellulosetüchern ausgelegt waren. Auf diese Weise wurde verhindert, dass die geringen Flüssigkeitsmengen auf den Proben verdampften. Nach Bindung der Antikörper wurden die Objektträger 3x für 5 min in PBS pH7.4 gewaschen. Die mit alkalischer Phosphatase konjugierten, sekundären Antikörper wurden im Blockierungspuffer nach Angaben des Herstellers verdünnt (Jackson ImmunoResearch) und für 30- 60 min bei RT auf die Proben gegeben. Darauf folgte wieder dreimaliges Waschen mit PBS pH 7,4, bevor die Objekte 1 min in 0,1 M Tris/HCl pH 8,2 äquilibriert wurden. Zuvor wurde eine Tablette FAST RED 2 mg (Kem-En-Tec) im diesem Puffer gelöst und durch einen 0,45µm Filter (Schleicher & Schuell) filtriert, um restliche ungelöste Partikel zu entfernen. Die Umsetzung des Substrates dauerte bei RT 10-20 min und wurde per Binokular verfolgt. Die Reaktion wurde durch Waschen in PBS pH 7,4 gestoppt. Die Präparate wurden mit Mowiol eingedeckelt.

Die verwendeten primären Antikörper wurden von Herrn Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf zur Verfügung gestellt und waren gegen verschiedene Epitope des humanen Polycystin-1

gerichtet. Es handelte sich um polyklonale, gereinigte Antikörper aus Kaninchen, Maus, Ratte und Huhn.

3 Ergebnisse (Teil 1)

Erzeugung von Transgenen Pkd1 Mauslinien

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits eine Pkd2-„Knock-out“-Mauslinie im Institut für Humangenetik in Vorbereitung. Zusätzlich sollte nun eine transgene Mauslinie mit einem Markergen unter der Promotorkontrolle des Pkd1-Gens erstellt werden. Zum einen sollten damit die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse aus immunhistologischen Untersuchungen der Polycystin-1 Verteilung möglichst aufgeklärt werden. Zum anderen sollte eine mögliche Beeinflussung der Pkd1-Expression vor dem Hintergrund einer veränderten, bzw. sogar fehlenden Pkd2-Expression untersucht werden. Eine Mauslinie mit mutiertem Pkd1-Gen war zu diesem Zeitpunkt bereits in einer anderen Gruppe etabliert und zeigte bei heterozygoter Mutation keinen Phänotyp, bei homozygoter Mutation einen embryonal letalen Phänotyp (Lu et al., 1997).

3.1 Immunhistologische Untersuchungen an Mausembryonen

Als freundliches Geschenk von Herrn Prof. Hanswalter Zentgraf, DKFZ, Heidelberg, standen mehrere Seren aus Kaninchen, Ratte, Maus und Huhn gegen verschiedene Epitope des humanen Polycystin-1 zur Verfügung. Mit ihnen sollte auf Kryosektionen von Mausembryonen E13,5 (von Petra Pennekamp, Institut für Humangenetik, Münster) getestet werden, ob sie die murine Polycystin-1 Expression nachweisen können. Dieser Nachweis sollte später ein weiteres Werkzeug sein, um an der Pkd2-„Knock-out“-Mauslinie mögliche Veränderungen der Polycystin-1 Expression zu untersuchen.

Von zwölf getesteten Antiseren zeigte nur eines eine Aktivität auf Sektionen von Embryonen (E13,5), die an den bekannten Expressionsorten zu finden war. Dieses Antiserum Pk6 wurde aus einem Huhn gewonnen und richtet sich gegen den zweiten intrazellulären Bogen von Polycystin-1. Die Peptidsequenz Asp³⁰⁹⁹-Arg³²⁸⁰ wurde dabei als Antigen eingesetzt. Diese Sequenz ist in der Maus zu 90% identisch, die nicht identischen Aminosäuren sind zum Großteil konservierte Austausche. Eine Bande in der Größe von Polycystin-1 konnte auf Western Blots, die mit Proteinen aus Geweben von

Mausembryonen (E13,5) beladen waren, mit keinem der zwölf Antikörper nachgewiesen werden.

Grundlegende Probleme lagen bei diesen Untersuchungen darin, dass keine Prä-immunseren verfügbar waren und es keine Information, bzw. keine Proben von Polycystin-1 freien Geweben gab. Es gab folglich keine Negativkontrolle, die die Aktivität von PK6 als Expressionsort von Polycystin-1 hätte bestätigen können. Bekannt war, dass Polycystin-1 in diesem Stadium (E13,5) hauptsächlich in arteriellen Blutgefäßen zu finden ist und dass ein defektes Polycystin-1 zum Absterben am Embryonaltag E15,5, aufgrund eines strukturellen Defekts in den Blutgefäßen, führt (Kim et al., 1999; Boulter et al., 2001). Deshalb wurden zunächst nur einige Übersichten an Kryosektionen von Mausembryonen E13,5 angefertigt, die später mit den Ergebnissen der transgenen Mäuse verglichen werden sollten.

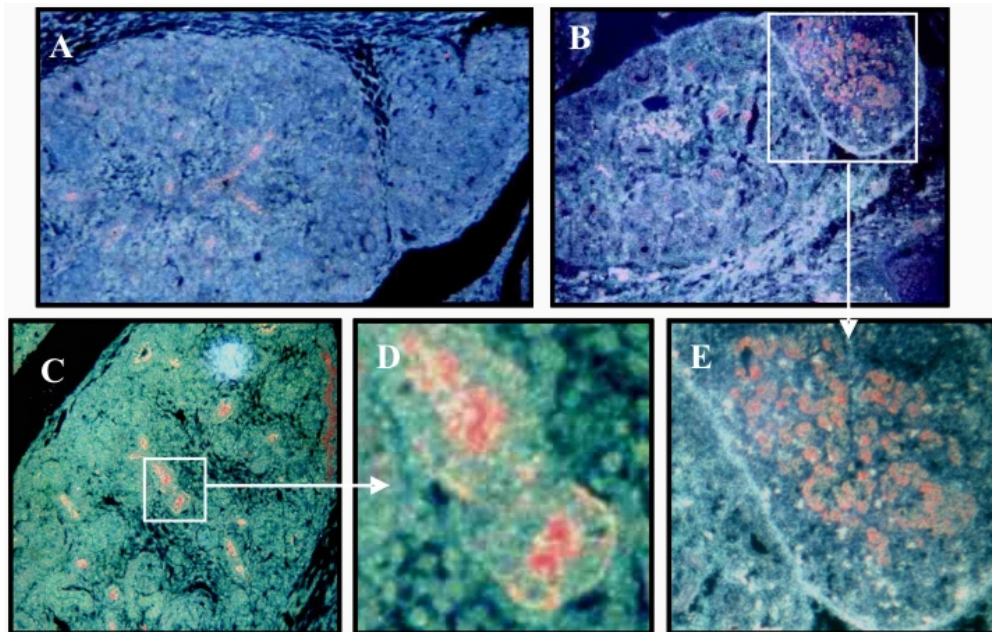


Abb. 11: Aktivität des Antikörper PK6 auf Gewebeschnitten von Mausembryonen E13,5

A: Aktivität von PK6 im Bereich der Niere, die Nebennierenrinde zeigt keine Färbung; **B:** Aktivität im Mark der Nebenniere; **C:** Blutgefäße der Niere sind positiv für PK6; **D:** Ausschnittsvergrößerung, Hauptaktivität ist zum Lumen gerichtet **E:** Ausschnittsvergrößerung der Nebenniere. Alle Bilder sind Dunkelfeldaufnahmen.

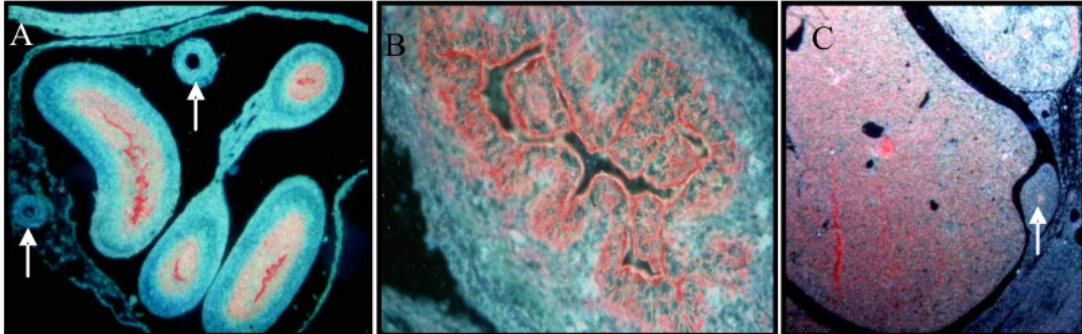


Abb. 12: Aktivität des Antikörper PK6 auf Gewebeschnitten von Mausembryonen E13,5
A: Aktivität von PK6 in der Nabelschnur. Die venösen Blutgefäße zeigen keine Färbung (Pfeile). B: Vergrößerung eines Ausschnitts einer Arterie der Nabelschnur. Hauptaktivität ist auf der dem Lumen der Gefäße zugewendeten Seite der Endothelzellen. C: Übersicht über einen Ausschnitt der Leber mit massiver Aktivität. Deutliche Färbung im arteriellen Blutgefäß (Pfeil). Alle Bilder sind Dunkelfeldaufnahmen

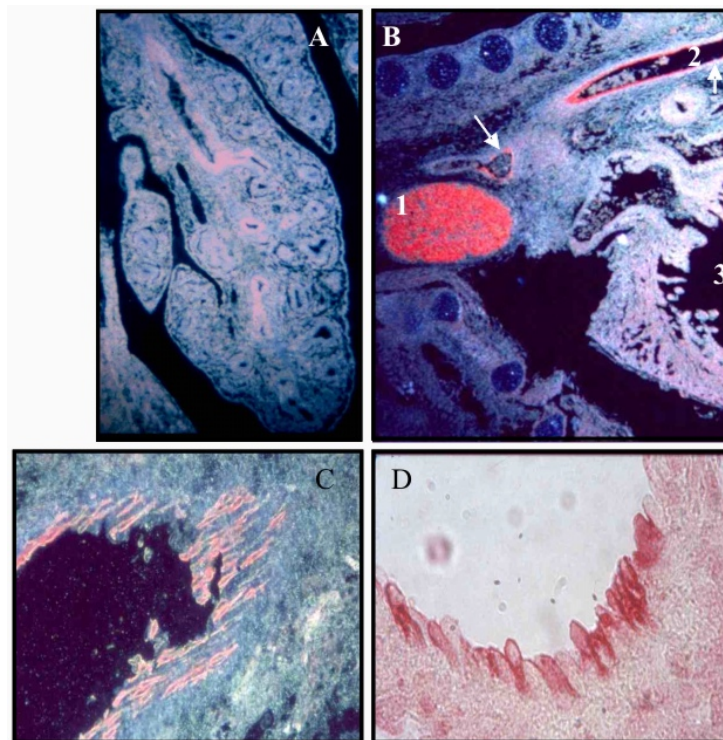


Abb.13: Aktivität des Antikörper PK6 auf Gewebeschnitten von Mausembryonen E13,5
A: Aktivität auf Lungengewebe; B: Aktivität im Thymus (1), der Aorta (2) und dem Herzen (3). Auffällig ist, dass nicht alle Bereiche der Aorta gleichmäßig gefärbt sind (Pfeile). C: Bildvergrößerung bei der Pk6-Aktivität in der Aorta. Nicht alle Endothelzellen weisen eine Färbung auf. D: Vergrößerung eines Aortenausschnitts im Hellfeld.

3.2 Screening einer murinen, genomischen DNA-Bank auf Pkd 1-Fragmente

Die murine Sequenz von Pkd1 war nur als cDNA-Sequenz bekannt. Deshalb wurde eine BAC- (bacterial artificial chromosome) Bibliothek vom California Institute of Technology (jetzt bei Invitrogen) durchsucht, um genomische Abschnitte des murinen Pkd1 Gens, insbesondere die um Exon 1, zu isolieren. Diese Bibliothek CT7 enthält genomische Abschnitte des Mausstammes 129Sv aus einer männlichen Stammzelllinie (CJ7) in einem F-Plasmid mit Fragmenten von durchschnittlich ca. 130 kb pro Klon. Ein PCR Format für das Exon 45 des murinen Pkd1-Gens wurde dabei zur Identifikation eingesetzt. Auf diese Weise konnten vier verschiedene Klone als Träger des Exons 45 identifiziert werden:

1. 178 P 15
2. 294 K 19
3. 305 M 24
4. 423 D 1

3.2.1 Subklonierung und partielle Sequenzierung des BACs 423D1

Zur Identifikation des Exons 1 vom Pkd1 Gen wurde eine cDNA Sonde, die das Exon1 und 2 sowie einen Teil des Exons 3 der humanen Sequenz enthält, in Hybridisierungsexperimenten eingesetzt. Der so hybridisierte *Hind* III-restringierte Klon 423D1 zeigte ein positives Fragment mit einer Größe von ca. 12 kb (s. Abb 14). Dieses Fragment wurde isoliert und im Vektor pZErO 1.1 kloniert (Klon IV.13).

Auf *Sst*I-Subklonen von IV.13 konnte das gesamte Exon 1 auf einem ca 1,6kb großem Fragment (S2_7) mit der humanen cDNA-Sonde identifiziert werden. Das Fragment IV.13 beinhaltet neben dem Exon 1 noch ca. 1,2 kb vom Intron 1. Der Großteil besteht jedoch aus dem Bereich vor dem Startcodon. Die Sequenz von S1_4 (s. Abb. 15) wurde später als Sonde eingesetzt, um den ca. 5,5 kb großen Klon S23 zu identifizieren, der ca. 750 bp mit dem Klon IV.13

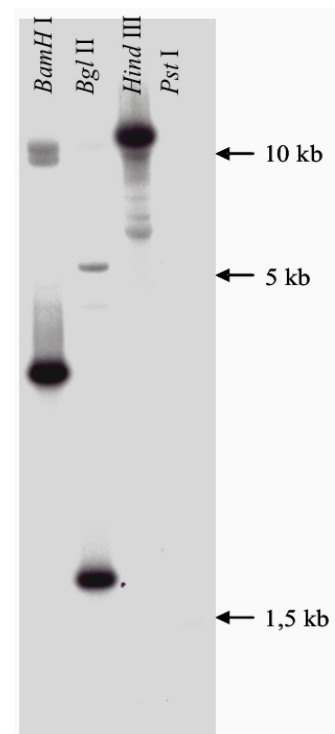


Abb. 14: Hybrdisierung des BACs 423D1 mit einer hu_manen cDNA- Sonde, sText

überlappt.

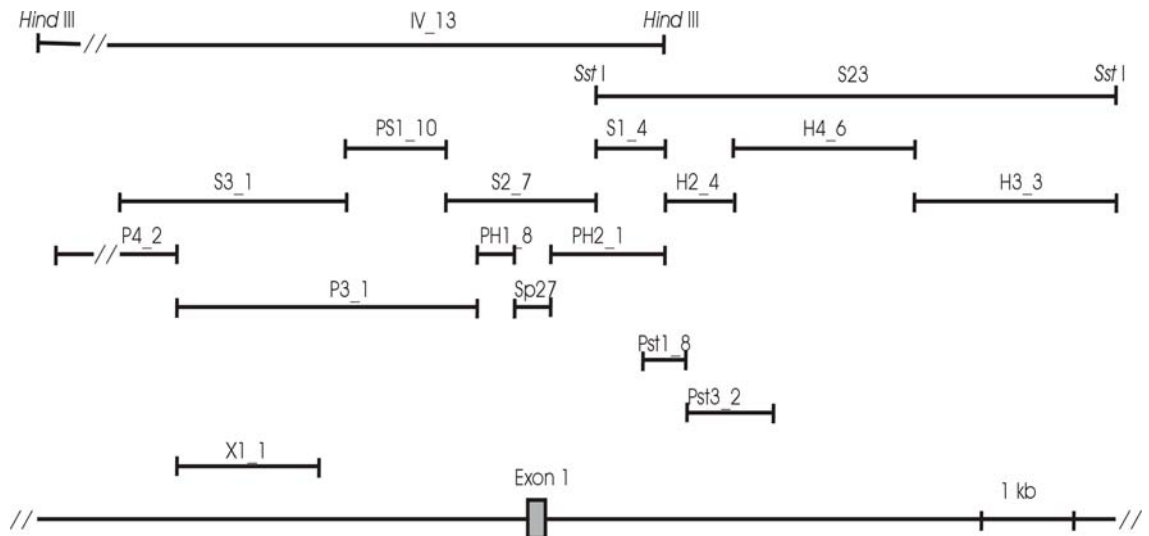


Abb.15: Subklonierung des BAC 423D1 im Bereich um Exon des murinen Pkd1-Gens

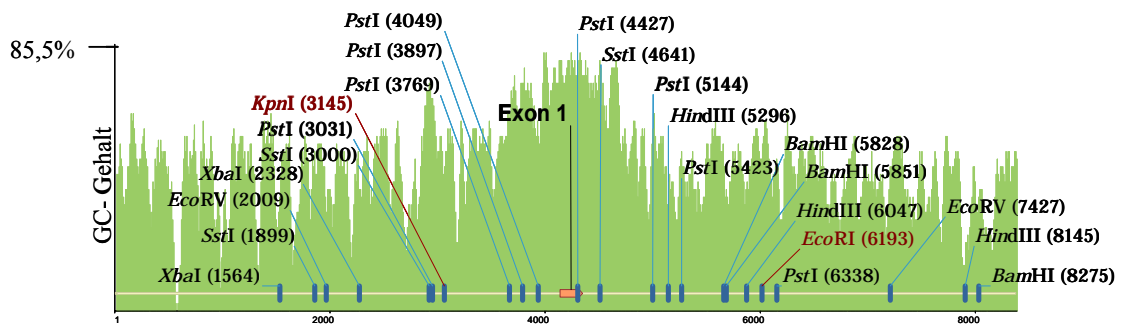


Abb. 16: Umgebung vom Exon1 des Pkd1-Gens (8633 bp)

Der Hintergrund gibt den GC- Gehalt der Sequenz wieder (Gap 40, Vector NTI 8)

Von 8633 bp um das Startcodon herum wurde die Sequenz bestimmt (s. Anhang). Sie hat einen GC-Gehalt von 47,8% und besteht zu 36,5% aus repetitiven Elementen (Repeatmasker, EMBL; <http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/>, s. Anhang). Die unmittelbare Umgebung von Exon 1 ist sehr GC-reich, wie Abbildung 16 zeigt. Die codierende Sequenz in diesem Abschnitt hat einen GC-Gehalt von 76,3%.

3.3 Konstruktion eines genomischen Pkd1-Fragments mit Markergen

Im gesamten analysierten Bereich gab es keine Fragmente bzw. Schnittstellen, die für eine konventionelle Klonierung des Transgens geeignet gewesen wären. Da auch der Promotorbereich nicht bekannt war, sollte ein Fragment mit möglichst großen 5'-Bereich vor dem Gen verwendet werden. Daher sollte das Fragment IV.13 per „ET-Cloning“ (Zhang et al., 1998) manipuliert werden. Mit diesem Verfahren können DNA-Fragmente mit homologen Bereichen auf Plasmiden in *E. coli* rekombiniert werden.

Das Startcodon des murinen Pkd1-Gens wird von zwei *Pst*I-Schnittstellen flankiert, die sich ca. 210 bp in 5'-Richtung, bzw. ca. 170 bp in 3'-Richtung vom Startcodon des Pkd1-Gens befinden (s. Abb. 17). Dieses Fragment sollte, nach Manipulation per „ET-Cloning“, in das Fragment IV.13 inseriert werden.



Abb. 17: Ausschnitt Aus dem Bereich um das Start- Codon des murinen Pkd1- Gens
 grün: Startcodon des Pkd1- Gens; gelb: *Nco*I- Schnittstelle im Oligonukleotid 4673 (das komplementäre Oligonukleotid wurde für die PCR- Reaktion verwendet).

Um das LacZ-Gen im Leserahmen des Pkd1-Gens in das Fragment einzubringen, musste zunächst eine *Nco*I-Schnittstelle geschaffen werden. Hierzu wurde die Sequenz mittels eines nicht vollständig komplementären Oligonukleotides (4673) in einer PCR-Reaktion manipuliert. Zusammen mit dem Oligonukleotid 4672 wurde ein PCR Produkt amplifiziert, das die gewünschte Schnittstelle enthält (s.

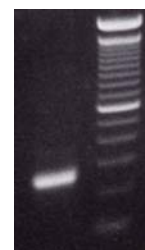


Abb.: 18 Erzeugung einer *Nco*I Schnittstelle
 Amplifikation eines Pkd1-Abschnitts mit dem Primer-paar 4672/4673 (249 bp)

Abb.17). Das Produkt wurde im PCR2.1-Vektor kloniert und die neue Schnittstelle per Sequenzierung bestätigt. Das klonierte PCR-Produkt wurde aus dem pCR2.1 Vektor über die flankierenden *EcoRI*-Erkennungsstellen ausgeschnitten und in die *EcoRI*-Schnittstelle des pThioHisA Vektors inseriert. Die Insertion des LacZ-Gens mit SV40 Polyadenylierungsstelle erfolgte in die *XhoI/NcoI*-Stellen des pThioHisA. Da die Restriktionsstellen des pThioHisA die weitere Bearbeitung des Kontrukts in diesem Vektor unmöglich machten, wurde das gesamte Fragment in den pUC18 eingebracht. Zusätzlich wurde das *StuI/PstI*-Fragment von Exon 1 eingefügt.

Hinter dem LacZ-Gen wurde eine von „lox-P“-Stellen flankierte („gefloxt“) Zeocinsistenz unter der Kontrolle des LacZ-Promotors nach Klenow-Auffüllung in die *KpnI* Schnittstelle inseriert, welche auf diese Weise verloren ging. Diese Resistenz diente dem Zweck der positiven Selektion der Rekombinationsereignisse in *E. coli*, bei denen das ursprüngliche *PstI*-Fragment durch das manipulierte *PstI*-Fragment ersetzt wurde. Danach sollte die Zeocinresistenz mit Hilfe der Cre-Rekombinase deletiert werden. Dieser Schritt war notwendig, um die für das Transgen-tragende Fragment nicht essentiellen DNA-Abschnitte weitestgehend zu entfernen, damit diese möglichst wenig Einfluss auf die Expression des Transgens nehmen.

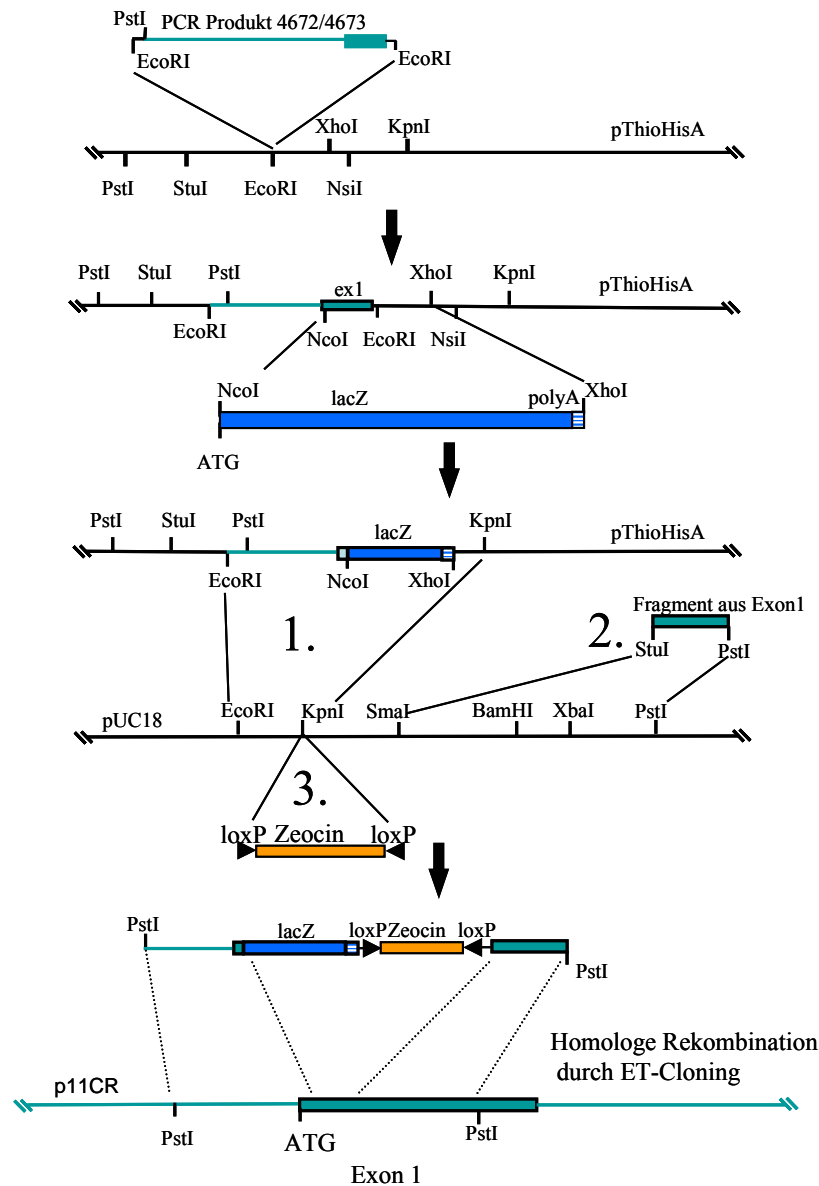


Abb. 19: Schematische Konstruktion des Transgens

3.3.1 Erzeugung des Pkd1-Transgen-Konstruktes durch homologe Rekombination in *E. coli* mittels „ET-Cloning“

Das manipulierte *PstI*-Fragment sollte mit dem *HindIII*-Fragment aus dem Klon IV.13 rekombinieren. Um positive Rekombinationsereignisse selektieren zu können, wurde zunächst das ca. 12 kb große *HindIII*-Fragment aus dem pZErO1.1, der u.a. für eine Zeocinresistenz codiert, in den pCR2.1-Vektor kloniert, der eine Ampicillin-Resistenz trägt. Der erhaltene Klon wurde p11CR genannt.

Für die Rekombination wurden elektro-kompetente, pBAD-ET γ -tragende *E. coli* TOP 10 F'-Zellen verwendet. Bei der Herstellung elektrokompeter Zellen wurden diese

in einem Arabinose-haltigen Medium angezogen, um die für die Rekombination benötigten Enzyme zu induzieren. Die Zellen wurden mit einem Gemisch aus p11CR und dem manipulierten und zuvor linearisierten *PstI*-Fragment transformiert. Die Selektion erfolgte auf einem Zeocin-LB_{LowSalt}-Medium. Bei zwölf isolierten Klonen konnte in allen das rekombinierte Fragment nachgewiesen werden.

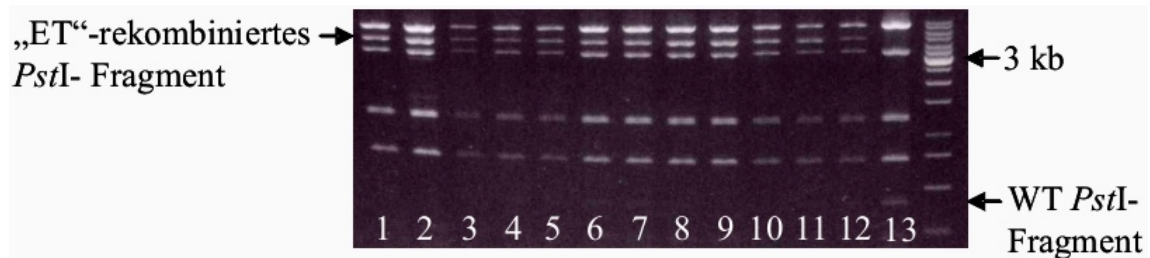


Abb. 20: Homologe Rekombination durch ET-Cloning, PstI Restriktion

1-12: *PstI*-Restriktion „ET“-rekombinierter Klone. Bei einigen Klonen ist schwach das nicht-rekombinierte *PstI*-Fragment zu erkennen. 13: *PstI*-Restriktion des Klons p11CR (Wildtypsequenz)

Da kein Selektionsdruck auf pBAD-ET γ und dem ursprünglichen p11CR lag, bestand für die Zellen keine Notwendigkeit, diese Plasmide weiter zu replizieren. Trotzdem konnte bei fast allen untersuchten Klonen das nicht modifizierte *PstI*-Fragment entdeckt werden. Um sicher zu gehen, dass keine nicht rekombinierten Plasmide verschleppt wurden, erfolgte eine weitere Transformationsrunde der rekombinierten Plasmide mit Selektion auf Zeocinresistenz. Die Klone, bei denen das ursprüngliche Exon1 nun nicht mehr nachzuweisen war, wurden zusammen mit dem Plasmid p705Cre transformiert. p705Cre codiert u.a. die Cre-Rekombinase, welche loxP-flankierte DNA-Elemente je nach Orientierung der loxP-Stellen entweder invertiert oder deletiert. Zudem ist das Plasmid temperatursensitiv und wird bei 37°C nicht mehr repliziert. Die Zeocinresistenz des manipulierten *PstI*-Fragments wurde durch die Cre-Rekombinase deletiert (Abb.21). Bei sieben von acht untersuchten Klonen wurde die Zeocinresistenz erfolgreich deletiert, bei einem Klon wurde zusätzlich noch ein weiteres Fragment verändert, das aber nicht näher untersucht wurde. Auch diese Klone wurden erneut transformiert, damit es keine Verschleppung unerwünschter Plasmide gab. Das gesamte Konstrukt wurde einer *HindIII*-Restriktion unterzogen, um sicherzustellen, dass so nur ein Fragment, das später zur Injektion in die Pronuclei benutzt werden sollte, sowie der Vektor zu sehen waren. In den acht Klonen konnte jeweils ein *HindIII*-Fragment gezeigt werden. Der Klon, der per

Sequenzierung nochmals bestätigt und weiterverwendet wurde, erhielt den Namen p11L3A.

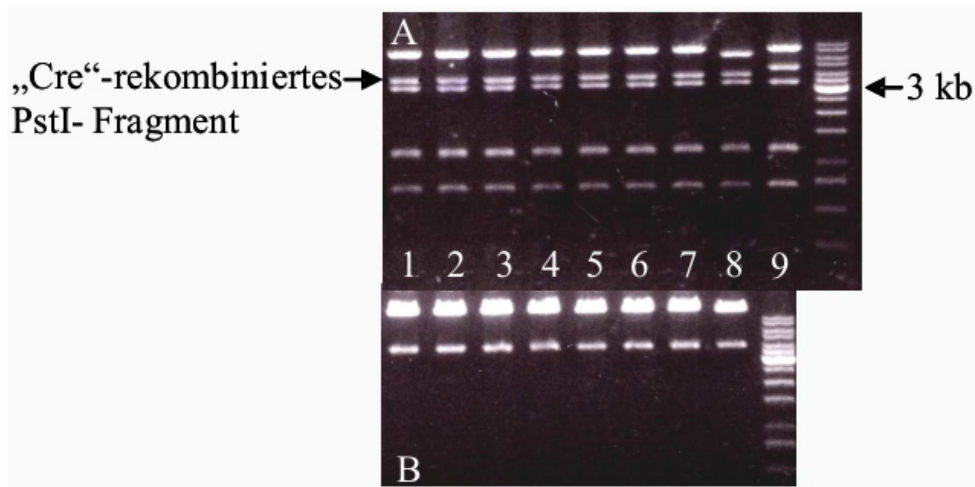


Abb.21: Deletion der „geflochten“ Zeocinresistenz durch die Cre- Rekombinase
A: 1-7 PstI- Restriktion korrekt deletierter Klone. 8: Zwei veränderte PstI- Fragmente im Vergleich zum Ausgangsklon aus der „ET“- Rekombination (9).
B: *HindIII*- Restriktion der Klone 1-8. Das größere linearisierte Fragment wurde später zur Erzeugung einer transgenen Mauslinie eingesetzt.

Parallel wurde ein analoges Konstrukt erstellt, welches an Stelle des LacZ-Gens das EGFP-Gen als Marker trug.

3.4 Test der transgenen Konstrukte im Zellkulturexperiment

Das Plasmid p11L3A sollte zunächst im Zellkulturexperiment überprüft werden. Dazu wurde die Zelllinie mIMDCK2 gewählt, die, analog zur caninen MDCK-Zelle, dem Nierenepithel der Maus entstammt. Obwohl ein Plasmid verwendet wurde, das nur in Bakterien repliziert werden kann, gelang es eine spezifische Färbung transfizierter Zellen zu erzeugen.

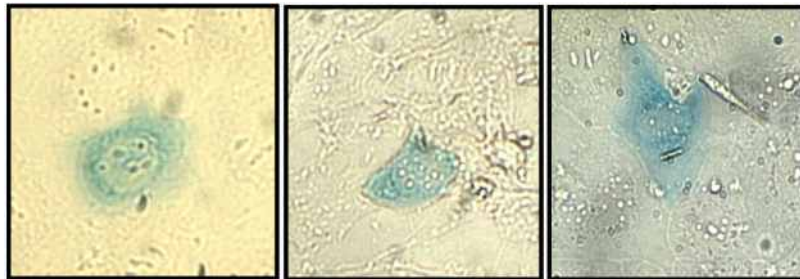


Abb. 22: X-Gal-Färbung p11L3A-transfizierter mIMDCK-2 Zellen

3.5 Analyse der Transgenen Mäuse

Die Injektion der linearisierten DNA in die Pronuclei befruchteter Oozyten von FVB/N-Mäusen und die anschließende Implantation in pseudoschwangere Mäuse wurde von Herrn Dr. Boris Skryabin, Institut für Experimentelle Pathologie, ZMBE Münster, durchgeführt. Beim ersten Versuch wurde nur eine männliche Maus geboren, die zwar transgen war, aber direkt nach der Geburt verstarb.

Beim zweiten Durchgang wurden insgesamt sechs Mäuse geboren, von denen ein Weibchen das Transgen trug. Alle transgenen Mäuse der folgenden Generationen zeigten weder im Verhalten noch in der Anatomie krankheitsassoziierte oder auffällige Phänotypen.

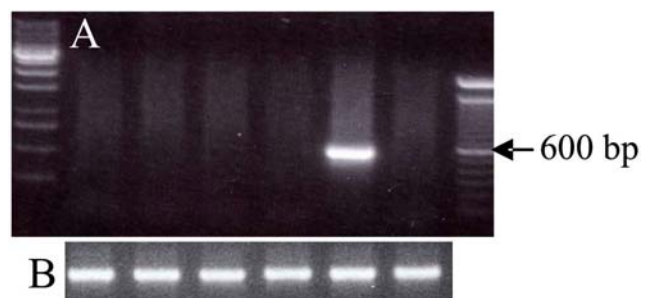


Abb. 23: Analyse der neugeborenen Mäuse nach Pronucleusinjektion

A: Amplifikation eines Bereichs des Transgens (Primer 4672/ 4833, ca 570bp). **B:** Amplifikation der GAPDH-Kontrolle (Primer 4568/4569)

3.5.1 Bestimmung der Kopienzahl des Transgens

Um einen Überblick zu bekommen, ob sich das Transgen nur einmal oder mehrfach ins Genom integriert hatte, wurde Southern-Blot Analyse angewendet. In dem inserierten Fragment war nur eine *KpnI*-Schnittstelle vorhanden, die sich in der Wildtypsequenz etwa 1 kb vor dem Startcodon befindet. Das LacZ-Gen hat eine Größe von ca 3,1 kb, die Pkd1-Intronsequenz 1,2 kb. Bei einem Southern Blot mit *KpnI*-hydrolysiertes DNA muss das detektierte Fragment also mindestens 5,3 kb haben. Sollte sich das Fragment mehrfach an verschiedenen Loci ins Genom integriert haben, so müssten bei dieser Hybridisierung unterschiedliche Fragmentgrößen zu sehen sein. Wenn mehr als eine Kopie in gleicher Orientierung hintereinander ins Genom integriert worden wäre, so müsste das *KpnI*-Fragment die gleiche Größe haben wie das *HindIII*-Fragment, das linearisiert in die Pronuclei injiziert worden war. Zudem müsste mit extrem hoher Wahrscheinlichkeit in dieser Spur ein weiteres Signal andere Größe erscheinen, bei dem es sich um das letzte Fragment der Tandeminsertion handelt. Bei Insertion von zwei Fragmenten mit entgegengesetzter Orientierung, sollte dieses Fragment bei der Hybridisierung als ca. 10,6 kb Bande zu sehen sein.

Die Hybridisierung auf *KpnI*-hydrolysiertes DNA ergab nur ein Fragment mit einer Größe von über 10 kb (s. Abb. 17). Das *HindIII*-Fragment hat eine Größe von über 15 kb, was es wahrscheinlich macht, dass die *KpnI*-Bande größer als 10,6 kb ist. Das Transgen wurde also vermutlich nur einmal ins Genom integriert.

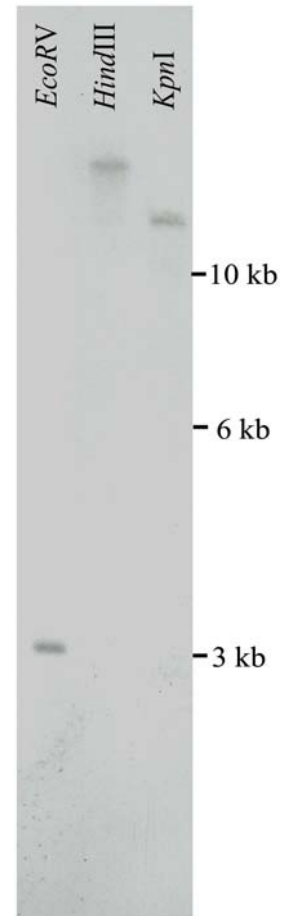


Abb. 24: Southern Blot -Analyse

6µg transgener, genomischer DNA wurden restringiert und

3.5.2 Expression des Pkd1-Transgens in Mäusen

Aus transgenen Tieren der F2-F4-Generationen wurden Embryonen (ca. 16 p.c.) isoliert und diese zwischen 4-24h in einer X-Gal-Lösung inkubiert. Trotz mehrerer verschiedener Ansätze gelang es nicht, eine spezifische Färbung der Embryonen zu erzielen. Alle Tiere, ob transgen oder nicht, zeigten bei Inkubationsdauer bis 4 h keine Färbung, nach 24 h waren alle Tiere gleich gefärbt. Auch Gewebe neugeborener und adulter Mäuse, insbesondere die Nieren, ließen sich nicht spezifisch färben. Um zu überprüfen, ob grundsätzlich eine Expression des Transgens stattfand, wurde aus Embryonen der F3-Generation DNA und RNA isoliert, um zunächst deren Genotyp per PCR zu ermitteln und anschließend die DNaseI-behandelte RNA-Fraktion auf Anwesenheit des exprimierten Transgens zu untersuchen. Das gleiche Procedere wurde mit Nieren aus neugeborenen und adulten Mäusen vollzogen. In keiner Generation konnte eine Expression des Transgens auf RNA-Ebene festgestellt werden. Die zur Kontrolle amplifizierte GAPDH-cDNAs konnten in allen Fällen nachgewiesen werden.

3.5.3 Methylierung des Pkd1-Transgens

Eine häufige Ursache für die Inaktivierung von Transgenen ist eine Methylierung im Promotorbereich des Gens (Matzke et al., 2000). Mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsenzyme (z.B. *ApaI*) und anschließender PCR sollte überprüft werden, ob das Transgen im Promotorbereich methyliert ist. *ApaI* spaltet die DNA nur an Erkennungssequenzen, in denen keine methylierten Cytosine enthalten sind. Ca. 70 bp vor dem Startcodon des Pkd1-Gens liegt eine solche *ApaI*-Schnittstelle (s. Abb 17). Da dieser Bereich identisch mit dem Abschnitt vor dem Startcodon im Transgen, gab es hier die Möglichkeit zu testen, ob die Sequenz bereits im Wildtyp methyliert ist, oder ob sie erst bei der Integration des Transgens methyliert wurde. Die DNA aus transgenen Tieren wurde mit *ApaI* restringiert. Anschließend wurden die Bereiche des Transgens und des Pkd1-Gens amplifiziert.

Die Wildtypsequenzen von Pkd1 ließen sich auf diese Weise nicht amplifizieren, was darauf hinweist, dass die DNA an diesem Locus nicht methyliert vorliegt. Im Gegensatz dazu ließen sich die analogen Abschnitte auf dem Transgen amplifizieren, was

auf eine Methylierung schließen lässt (s. Abb.25). Diese Methylierung ist vermutlich die Ursache dafür, dass das Pkd1-Transgen nicht exprimiert wurde.

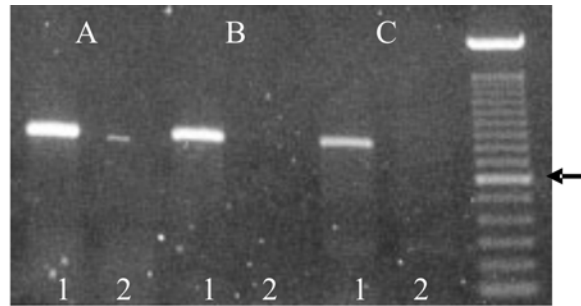


Abb. 25: Nachweis des methylierten Transgens

Amplifikation transgener Abschnitte mit den Primern 4672/4834, ca. 830bp (1) und Amplifikation genomischer Bereiche des Pkd1- Gens mit den Primern 4672/4673, ca 250 bp (2) nach vorhergehender Restriktion der zu amplifizierenden DNA mit *Apa*I. A und B: F1-Generation, C: F2- Generation. Pfeil zeigt auf 600 bp des Größenstandards.

Veröffentlichungen neueren Datums geben Hinweise, dass die erstellten Konstrukte wahrscheinlich nicht ideal für die Erzeugung transgener Mäuse sind, da die Wahrscheinlichkeit einer Methylierung sehr hoch ist (s. Diskussion). Durch Modifikationen sollte es aber möglich sein, ein aktives Pkd1-Transgen zu erhalten. Diese transgene Mauslinie könnte dann zur Untersuchung des putativen Einflusses von Pkd2-Nullallelen auf die Pkd1-Expression dienen und somit zur weiteren Aufklärung der ADPKD beitragen. Außerdem wäre sie ein Werkzeug, um die Aktivität von Antikörpern gegen Polycystin-1 zu klassifizieren, die wiederum auch Informationen über subzelluläre Lokalisation von Polycystin-1 geben können.

4 Ergebnisse (Teil 2)

Spleißvarianten der humanen PKD2- und des murinen Pkd2-Gens

4.1 Alternative Transkripte des humanen PKD2- und des murinen Pkd2-Gens

Verschiedene PCR-Formate, die zur Vervielfältigung von Abschnitten des murinen Pkd2-Gens eingesetzt wurden, ergaben trotz stringenter Bedingungen häufig noch Produkte, die nicht erwarteten Fragmentgrößen entsprachen. Bei näherer Untersuchung stellte sich heraus, dass es sich um Spleißvarianten des Transkripts handelte. Untersuchungen an verfügbaren humanen, fötalen cDNAs aus einer kommerziell erhältlichen cDNA Bank, sowie an cDNAs aus Zellkulturen bestätigten die gefundenen Spleißvarianten. Auch in MDCK-Zellen (eine Zelllinie vom Hund), konnte erfolgreich eine Spleißvariante nachgewiesen werden.

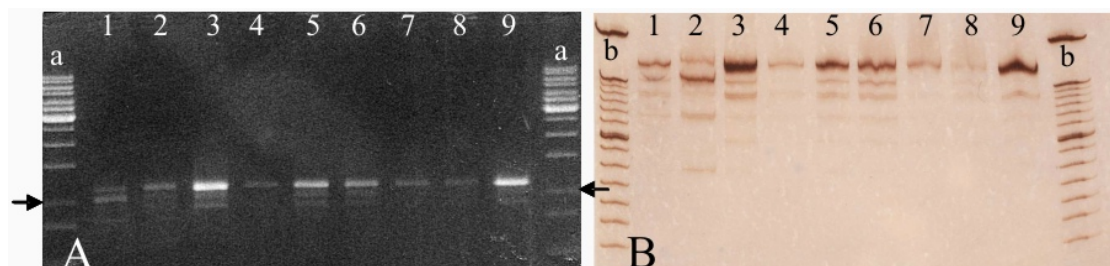


Abb.26: Amplifikation eines Bereichs von PKD2 aus einer Fötalen cDNA Bank

Der Bereich vom 2. „G“ des Codons Gly³⁷⁶ (in Exon 5) bis zum „A“ des Codons Ala⁷⁵⁷ (Exon 12) des PKD2-Transkripts wurde aus einem „Human Fetal cDNA Panel“ (Clontech) mit den Oligonukleotiden 4006 und 4010 amplifiziert. Reaktionsbedingungen: 95°C 2min, ([95°C 30s, 62°C 30s, 72°C 80 s]x32) 72°C 5 min

A: Elektrophoretische Trennung im Agarosgel; **B:** Elektrophoretische Trennung im Acrylamidgel; **a:** 1 kb Leiter; **b:** 100 bp Leiter; Pfeil: 1kb

1. Hirn; 2. Herz; 3. Niere; 4. Leber; 5. Lunge; 6. Skelettmuskel; 7. Milz; 8. Thymus; 9 Kontrolle

4.1.1 Amplifikation des codierenden Bereichs des PKD2/ Pkd2-Gens

Zur Bestimmung potentiell relevanter mRNAs wurden PCR-Formate erarbeitet, die die ca. 3 kb lange Sequenz des codierenden Bereichs PKD2/-Pkd2 vervielfältigten. Wie sich herausstellte, waren die fast alle kommerziell verfügbaren Polymerasen nicht in der Lage

diese Formate zu amplifizieren. Nur durch einen PCR-Protokoll mit einer Taq Polymerase, die im Institut für Molekulare Pathologie (Dr. Skryabin, ZMBE Münster) produziert wird, konnte der gesamte codierende Bereich vervielfältigt werden. Allerdings besitzt dieses Enzym keine „proofreading“-Aktivität und da die erhaltenen Produkte auch potentiell für Expressionsanalysen verwendet werden sollten, wurde ein Mix aus Pfu und der oben genannten Polymerase im Verhältnis 1:10 hergestellt. Für eine erfolgreiche Amplifikation mussten die Ansätze strikt auf Eis gehalten und mit Mineralöl überschichtet werden, bevor sie in auf mindestens 90°C vorgeheizte PCR-Maschinen eingesetzt wurden.

In allen Reaktionen ließen sich alternative Spleißformen nachweisen. Die zusätzlichen Banden der PCR-Produkte wurden aus dem Gel ausgeschnitten, die Produkte isoliert und kloniert. Da die Pfu-Polymerase aufgrund ihrer „proofreading“-Eigenschaften die durch die terminale Transferasen -Aktivität angefügten A-Überhänge der Taq Polymerase wieder entfernte, wurden die Produkte im *EcoRV*-hydrolysierten pZErO 1.0 kloniert. Nach einer Restriktionsanalyse wurden die Klone, die Spleißvarianten trugen, sequenziert.

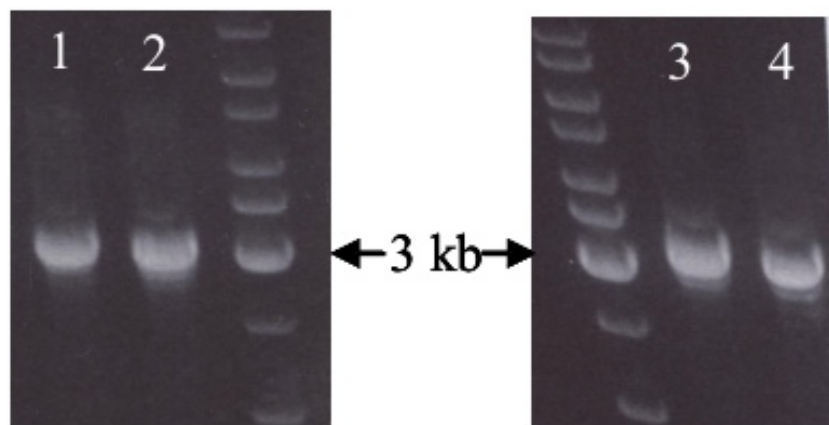


Abb. 27: Amplifikation der murinen und humanen codierenden Bereiche der Pkd2/PKD2 cDNA

Amplifikation mit den Primern 3294 und 4093: Herz (1) und Hirn (2) eines Mausembryos E16,5. Amplifikation mit den Primern 4007 und 4072: HMEC-1 (3) und A549 (4). In allen Spuren sind dezente Banden unter dem Hauptprodukt zu sehen

4.1.2 Spleißvarianten des murinen und humanen PDK2/ Pkd2

Insgesamt wurden vier Varianten gefunden:

1. Pkd2 Δ 6 (partielle Deletion von Exon 6),
2. Pkd2 Δ 7, (Deletion des Exons 7),
3. Pkd2 Δ 9 (Deletion des Exons 9)
4. Pkd2 Δ 12-13 (Deletion der Exons 12 und 13)

Von den drei ersten Spleißvarianten konnten Transkripte mir der gesamten codierenden Sequenz isoliert werden, sowie ein humanes Transkript, bei dem die Varianten 2 und 3 gemeinsam auftraten. Die vierte Variante wurde nur als Fragment amplifiziert.

4.1.3 PKD2 Δ 6 und Pkd2 Δ 6

Als einzige der identifizierten Varianten ist bei der Δ 6-Varianten nicht ein gesamtes Exon deletiert, sondern nur ein Teil davon. Nach dem Codon Ala⁴⁷³/ Ala⁴⁷⁵ (murin/ human) ist das erste „T“ des folgenden Codons in der cDNA-Sequenz mit dem ersten Codon des Exon 7 verbunden, wodurch eine Leserasterverschiebung entsteht. Diese Verschiebung mündet in eine vorzeitige Termination der Translation und würde eine Verkürzung des translaierten Proteins auf 481/ 483 Aminosäuren bewirken.

```

Exon 5
gcaaacattaacctgttctgtgtggtcaggttattggcggagttcccagcaacgggtggc
gtggtaccctcttggcagtttcagcctgtaaaactgatccgctatgtcacagcctttgat
ttcttctgtggcagcctgtgagatcatcttttgtttctttatcatttactatgtggtggaa
gagatattggaaattcggattcacagactgagctatctcaggagtttctggaattgtctg
Exon 7
gatgttgatggtcgtgttatctgtagtagctatgggtga
    
```

Abb. 28: Bereich um das murine Exon 6 der Pkd2-mRNA (cDNA)

Grau unterlegt: Exon 5, bzw. Exon 7; rote Buchstaben: deletierter Bereich in der Variante Pkd2 Δ 6

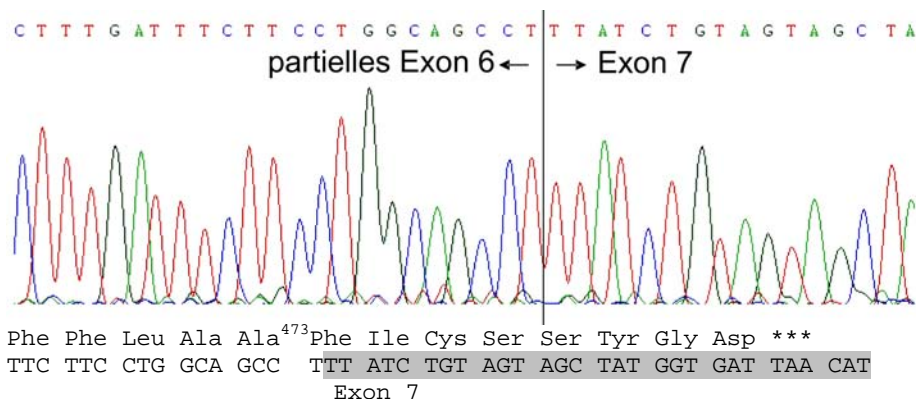


Abb.29: Sequenzanalyse der murinen Pkd2 Δ 6 Variante

Nach dem Codon für Ala⁴⁷³ kommt es zur Leserasterverschiebung. Die ersten drei Nukleotide von Exon 7 (grau unterlegt) codieren im normalen Transkript für Leu⁵¹⁵.

4.1.4 PKD2 Δ 7 und Pkd2 Δ 7

Die vollständige Deletion von Exon 7 verursacht weder in der murinen Pkd 2-noch in der humanen PKD2-mRNA eine Verschiebung des Leserasters. Durch Translation dieses Transkripts sollte ein funktionelles Protein mit einer Länge von 910 (murin), bzw. 912 (human) Aminosäuren entstehen. Diese Variante konnte auch in totaler RNA aus MDCK-Zellen mit den gleichen Primern, die zur Amplifikation der murinen Sequenz benutzt wurden, nachgewiesen werden.

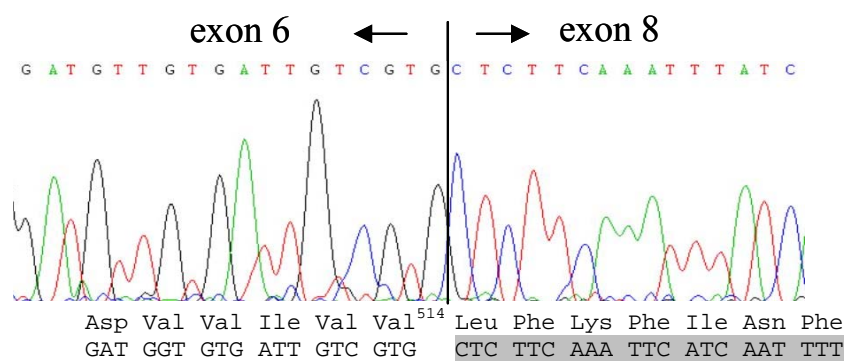


Abb.30: Sequenzanalyse der murinen Pkd2 Δ 7 Variante

Die Deletion von Exon 7 verursacht keine Verschiebung des Leserasters

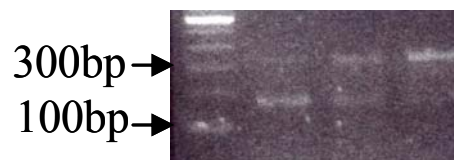


Abb. 31: Amplifikation von Pkd 2 Exon 7 auf cDNA aus MDCK-Zellen (Hund)

Zur Amplifikation wurden die Primer 3208 und 3259 aus der murinen Sequenz eingesetzt. Die Größe der erwarteten Produkte sind 327 bp bzw. 159 bp bei der Variante

4.1.5 PKD2 Δ 9 und Pkd2 Δ 9

Die Deletion von Exon 9 bewirkt eine Leserasterverschiebung nach der Position Cys⁶³⁰ (murin), bzw. Cys⁶³² (human) und würde durch eine vorzeitige Translationstermination für ein Protein mit einer Länge von 644 (murin), bzw. 646 (human) Aminosäuren codieren.

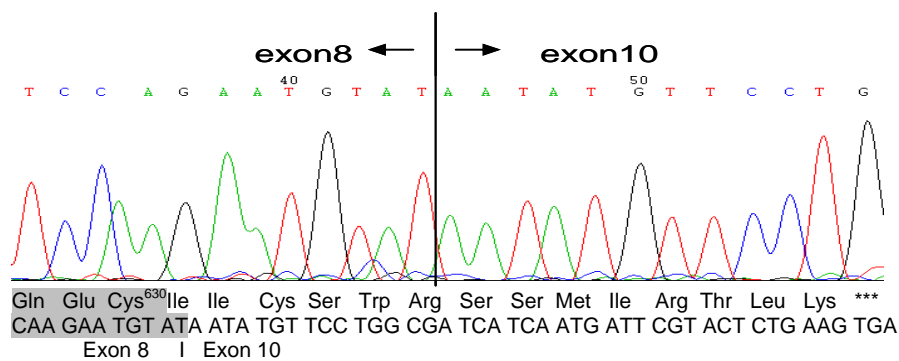


Abb. 32: Ausschnitt aus dem Elektropherogramm der murinen Pkd2 Δ 9-Variante

Nach Cys⁶³⁰ kommt es zur Verschiebung des Leseraters (Exon 8 grau unterlegt). Die ersten drei Nucleotide von Exon 10 codieren im normalen Transkript für Asn⁶⁷².

4.1.6 PKD2 Δ 12-13 und Pkd2 Δ 12-13

Die Deletion der beiden Exons 12 und 13 wurde bisher nur in PCR-Produkten gefunden, die nicht den gesamten Teil des codierenden Bereiches abdecken, weshalb anzunehmen ist, dass es sich wahrscheinlich um eine seltene Form handelt. Diese Deletionen führen nicht zu einer Leserasterverschiebung. Das resultierende Protein hätte eine Länge von 872 (murin), bzw. 874 (human) Aminosäuren.

4.2 Charakterisierung der PKD2/ Pkd2 Δ 7 Spleißvarianten

4.2.1 Nachweis der PKD2 Δ 7-Spleißvariante in membrangebundenen Polysomen

Da die PKD2 Δ 7- und PKD2 Δ 9-Varianten zahlenmäßig am häufigsten in den klonierten PCR-Produkten vorgefunden wurden, wurde zunächst untersucht, ob diese Varianten potentiell translatiert sein könnten. Dazu wurden zuerst verschiedene humane Zelllinien auf das Vorhandensein der beiden Spleißvarianten überprüft. Nach Isolierung der RNA und deren reversen Transkription in cDNA wurde das Primerpaar 4993/ 4997 für die Amplifikation eines Bereichs um Exon 7 herum eingesetzt. Die regulär erwartete Produktgröße liegt bei 390 bp, die Varianten mit deletiertem Exon 7 haben eine Größe von 222 bp. Der Bereich um Exon 9 wurde mit dem Primerpaar (4995/ 4997) amplifiziert. Die regulär erwartete Produktgröße beträgt 301 bp, die der Variante mit deletiertem Exon 9 eine Größe von 180 bp. Die Deletionen wurden per Klonierung und anschließender Sequenzierung bestätigt.

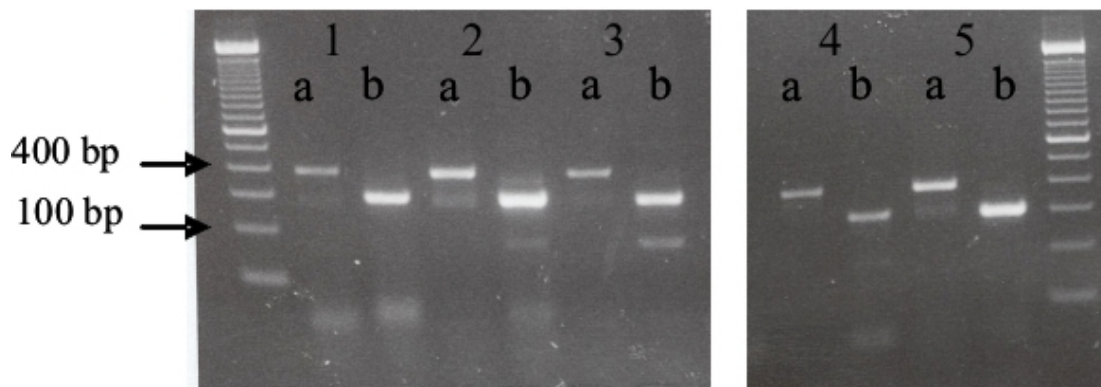


Abb. 33: Amplifikation von PKD 2 im Bereich um Exon 7 und Exon 9 auf cDNA humaner Zelllinien

1 = IHKE, 2 = HMEC-1, 3 = CD4, 4 = Jurkart, 5 = A549, a) Amplifikation von Exon 7; b) Amplifikation von Exon 9

In diesem Pilotexperiment konnten nicht in allen Zelllinien beide Spleißvarianten nachgewiesen werden. Beispielsweise waren die Δ 9-Varianten in IHKE und A549 fast nicht zu sehen. Die Δ 7-Varianten waren überall, wenn auch zum Teil nur sehr schwach, zu sehen.

Die Wahl fiel deshalb auf HMEC-Zellen (s. Abb. 33), um mRNA aus den membrangebundenen Polysomen zu isolieren (Mechler, 1987). Der Nachweis von mRNAs in membrangebundenen Polysomen gilt als starker Hinweis auf deren Translation, da so genannte „Nonsense“-Transkripte (Transkripte mit verfrühtem Translationsstopp) in der Regel via NMD degradiert werden (Frischmeyer und Dietz, 1999) und daher in den membrangebundenen Polysomen nicht auffindbar sind.

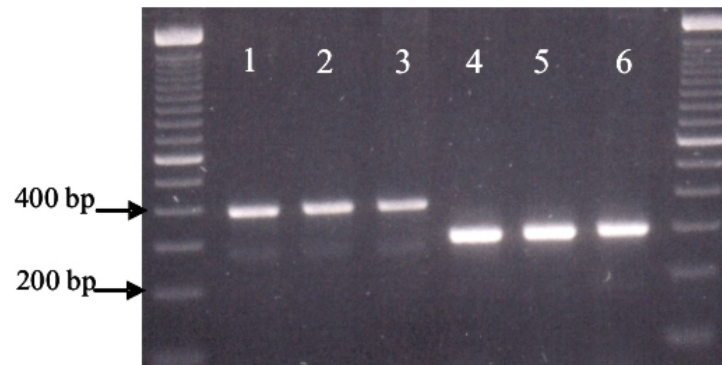


Abb. 34: Amplifikation von PKD 2 im Bereich um Exon 7 und Exon 9 auf cDNA aus den membrangebundenen Polysomen von HMEC-1 Zellen

1-3: Amplifikation von Exon 7 mit dem Primerpaar 4993/4997

4-6: Amplifikation von Exon 9 mit dem Primerpaar 4995/4999

Das Produkt der PKD2 Δ 9-Variante konnte nicht nachgewiesen werden. Die PKD2 Δ 7-Variante konnte amplifiziert werden, was auf die potentielle Translation dieses Transkripts hinweist.

4.2.2 Die Pkd2 Δ 7-Spleißvariante in verschiedenen Geweben

Aus verschiedenen Geweben von Mausembryonen (ca. 16,5 pc) wurde die RNA isoliert, um anschließend eine cDNA-Synthese durchzuführen. Die Amplifikation eines flankierenden Bereichs von Exon 7 sollte Aufschluss darüber geben, in welchen Geweben die Spleißvariante vorzufinden ist. Das verwendete PCR-Format hat eine reguläre Größe von 327 bp und amplifiziert einen Bereich von Exon 6 (Oligonukleotid 3208) bis Exon 8 (Oligonukleotid 3259). Amplikons, bei denen das Exon 7 fehlt haben eine Größe von 159 bp. Beide Produkte wurden zuvor per Klonierung und Sequenzierung bestätigt.

In allen Geweben des Mausembryos ließ sich die Pkd2 Δ 7-Variante per PCR nachweisen (s. Abb. 35). Um einen genaueren Überblick über die Verteilung zu bekommen, wurde eine quantitative Untersuchung der Transkripte durchgeführt.

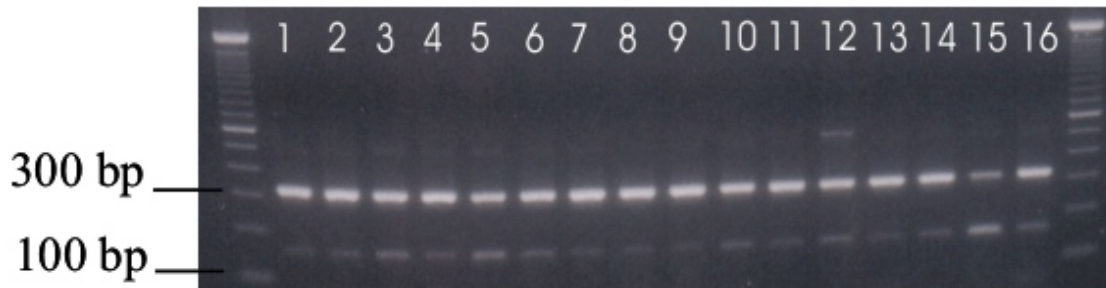


Abb. 35: Amplifikation eines Bereichs um Exon 7 des murinen Pkd2-Gens

RNA wurde aus folgenden Geweben isoliert und in cDNA revers transkribiert:

1 = Skelettmuskel, 2 = Darm, 3 = Milz, 4 = Niere, 5 = Haut, 6 = Lunge, 7 = Testis, 8 = Pankreas, 9 = Auge, 10 = Nebenniere, 11 = Herz, 12 = Gehirn, 13 = Magen, 14 = Thymus, 15 = Leber, 16 = totales Embryo

Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide 3208 und 3259 verwendet.

4.2.3 Quantitative Charakterisierung der Pkd2- und Pkd2 Δ 7-Transkripte

Zunächst wurden zwei spezifische PCR-Formate entworfen, die entweder nur Transkripte mit Exon 7 oder nur Transkripte ohne Exon 7 amplifizieren. Beide Produkte wurden unter denselben Bedingungen amplifiziert und unterschieden sich nur im „Forwärts-Primer“ (s. Abb. 36). Für die Quantifizierung wurde eine Taqman-Sonde entworfen, die für beide Formate benutzt werden konnte. Die Größe der PCR-Produkte von Transkripten mit Exon 7 beträgt 174 bp, die der Δ 7-Varianten 169 bp.

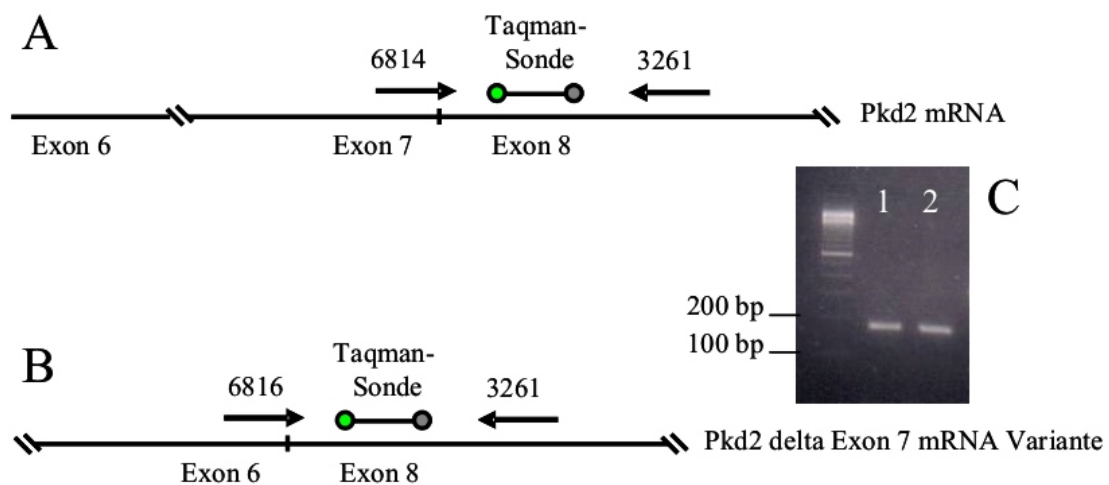


Abb.36: Spezifische Amplifikation von Pkd2-mRNAs mit, bzw. ohne Exon 7

A: Schema der Amplifikation der cDNA mit Exon 7; **B:** Schema der Amplifikation der cDNA ohne Exon 7;

C: Spezifische Amplifikation von Pkd2 Exon 7 (1, 174 bp) und der Δ 7-Variante (2, 169bp) auf muriner, embryonaler (16,5 pc) cDNA. Die Taqman-Sonde wurde in der Quantitativen PCR verwendet.

Totale RNA wurde aus verschiedenen Geweben von jeweils drei Tieren drei verschiedener Entwicklungsstadien isoliert. Die erste Gruppe bestand aus drei Embryonen, die ca. 16,5 pc Tage alt waren. Die zweite Gruppe bildeten drei einen Tag alte Neugeborene, die dritte Gruppe bestand aus drei acht Wochen alten Mäusen. Es wurden nur männliche Tiere untersucht.

Alle Daten wurden zur Darstellung normalisiert, indem bei jedem Tier die Werte der Nieren als „1“ definiert wurden. Alle anderen Gewebe sind relativ zu dem Nierenwert (Expression in Niere = 1) dargestellt.

4.2.4 Quantifizierung der Pkd2- und Pkd2 Δ 7-Expression am Embryonaltag 16,5

Die erste untersuchte Gruppe waren Mausembryonen im Alter von ca. 16,5 Tagen nach Befruchtung (16,5 pc/ E16,5). Das Fehlen von Polycystin-2 führt zum Sterben der meisten Pkd2^{-/-} Embryonen bis zu diesem Zeitpunkt (Wu et al., 2000). Kardiale Störungen sind in all diesen Mäusen ab Tag E13,5 in Form von Defekten des interventriculären Septums vorzufinden, Defekte des atrialen Septums sind häufig. Ab Tag E14,5 zeigen sich zystische Erweiterungen der Pankreaskanäle, erste sichtbare, renale Defekte in diesen Mäusen treten ab Tag 15,5 der embryonalen Entwicklungsphase in Form von beginnender Zystenbildung auf. Eine Pkd-2 Expression ist zum Zeitpunkt E16,5 also zu erwarten.

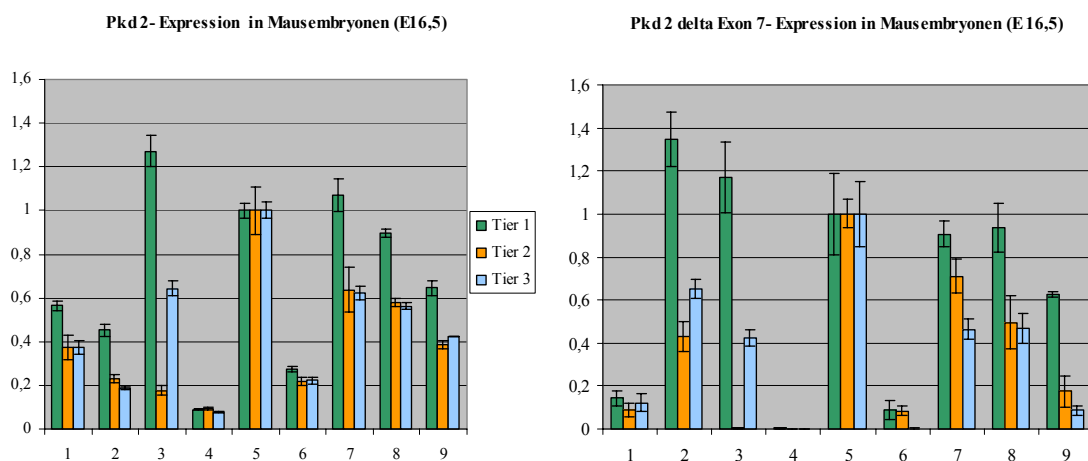


Abb. 37: Relative Darstellung der quantitativen Analyse der Pkd2-, bzw Pkd2 Δ 7-Expression in verschiedenen Geweben von Mausembryonen (16.5 pc)

1 = Herz, 2 = Gehirn, 3 = Lunge, 4 = Leber, 5 = Niere, 6 = Thymus, 7 = Skelettmuskel, 8 = Magen, 9 = Haut. Der Wert der Nieren (5) wurde als „1“ definiert, alle anderen Werte in Relation dazu angegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Aufgrund der Normalisierung ist ein direkter, quantitativer Vergleich der Expressionen in diesen Diagrammen nicht möglich.

Trotz individueller Unterschiede lassen sich Tendenzen der Pkd2-Expression erkennen. Die stärkste Expression findet man in diesem Stadium in den Nieren und mit in dieser Reihenfolge abnehmenden Mengen in Skelettmuskel, Magen, Haut, Herz, Gehirn, Thymus, Leber. Die Werte der Lunge sind relativ schwer einzuordnen, da hier die größten Schwankungen zwischen den einzelnen Tieren vorzufinden sind. Verglichen mit der des normalen Transkripts verläuft die relative Expression des Pkd2 Δ 7-Variante in diesem Stadium in vielen Geweben sehr ähnlich. Auffällige Gewebe sind das Gehirn mit überdurchschnittlich hoher Expression, das Herz und Thymus mit verringerter und die Leber mit fast keiner Expression der Variante.

Absolut gesehen zeigt Tier 1 die höchste Expression der Spleißvariante. Der Spitzenwert wurde hier im Gehirn mit 6,35% verzeichnet. Die absolute Quantität der Transkripte mit Exon 7 in der Niere betrug bei Tier (1) $1,09 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA, bei Tier (2) $3,74 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA und bei Tier (3) $3,58 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA.

Gewebe	Tier 1	Tier 2	Tier 3
Herz	0,55	0,19	0,26
Gehirn	6,35	1,49	2,79
Lunge	1,97	0,02	0,53
Leber	0,09	0,00	0,00
Niere	2,14	0,80	0,80
Thymus	0,70	0,31	0,01
Skelettmuskel	1,81	0,89	0,60
Magen	2,23	0,68	0,67
Haut	2,08	0,36	0,16

Tabelle 11: Häufigkeit von Pkd2 Δ 7 Transkripten pro Transkripten mit Exon 7 am Embyonaltag 16,5
Angaben in Prozent

4.2.5 Quantifizierung der Pkd2- und Pkd2 Δ 7-Expression in neugeborenen Mäusen

Als zweite Gruppe wurden einen Tag alte Mäuse untersucht.

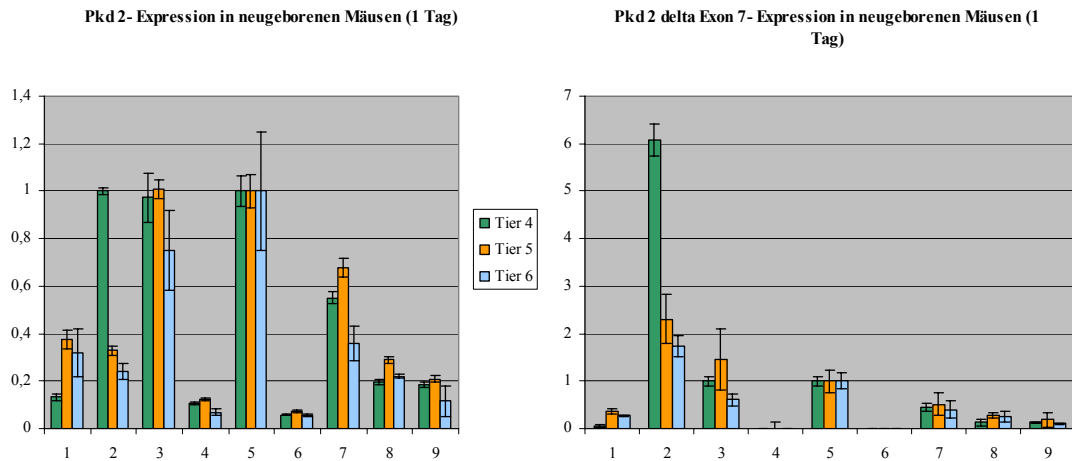


Abb. 38: Relative Darstellung der quantitativen Analyse der Pkd2-, bzw Pkd2 Δ 7-Expression in verschiedenen Geweben von einem Tag alten Mäusen

1 = Herz, 2 = Gehirn, 3 = Lunge, 4 = Leber, 5 = Niere, 6 = Thymus, 7 = Skelettmuskel, 8 = Magen, 9 = Haut. Der Wert der Nieren (5) wurde als „1“ definiert, alle anderen Werte in Relation dazu angegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Aufgrund der Normalisierung ist ein direkter, quantitativer Vergleich der Expressionen in diesen Diagrammen nicht möglich.

Als wesentliche Veränderung gegenüber den Embryonen 16,5 pc steigt die Pkd2-Expression in der Lunge deutlich an und erreicht fast das gleiche Expressionsniveau wie die Niere. Verglichen mit E16,5 bleibt der relative Expressionslevel im Gehirn und Leber etwa konstant, in Skelettmuskel, Magen und Haut findet man einen leichten Rückgang, im Thymus ist nur ca. die Hälfte vorhanden.

Die Lunge erreicht ca. das gleiche Expressionsniveau der Δ 7-Transkripte wie die Niere. Die relativen Unterschiede der Pkd2 Δ 7-Expression von Skelettmuskel, Magen, Haut und Herz zur Niere bleiben in etwa so wie am Embryonaltag 16,5. Wie bei E16,5 ist auch im Neugeborenen in der Leber die Δ 7-Variante kaum nachzuweisen, im Thymus findet man keine bedeutsame Expression. Am auffälligsten ist die Veränderung im Gehirn. Hier ist ein deutlicher Anstieg der Δ 7-Expression relativ zur Niere zu verzeichnen.

Absolut gesehen geht der Anteil der Δ 7-Transkripte gegenüber Transkripten mit Exon 7 in fast allen Geweben zurück. Ein maximaler Wert wird im Gehirn von Tier 4 mit 3,08% erreicht. Die absolute Menge an Transkript mit Exon 7 in der Niere betrug bei Tier (4) $2,69 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA, bei Tier (5) $2,61 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA und bei Tier (6) $3,59 \times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA.

Gewebe	Tier 4	Tier 5	Tier 6
Herz	0,23	0,25	0,22
Gehirn	3,08	1,75	1,90
Lunge	0,52	0,36	0,21
Leber	0,01	0,01	0,02
Niere	0,51	0,25	0,26
Thymus	0,01	0,00	0,00
Skelettmuskel	0,41	0,19	0,30
Magen	0,34	0,24	0,31
Haut	0,37	0,23	0,23

Tabelle 12: Häufigkeit von Pkd2 Δ 7 Transkripten pro Transkripten mit Exon 7 neugeborenen Mäusen (1 Tag)

Angaben in Prozent

4.2.6 Quantifizierung der Pkd2- und Pkd2 Δ 7-Expression in adulten Mäusen

Die dritte untersuchte Gruppe bestand aus drei acht Wochen alten Mäusen. Bei der Messung der Δ 7-Transkripte wurden nur zwei Datensätze erzeugt.

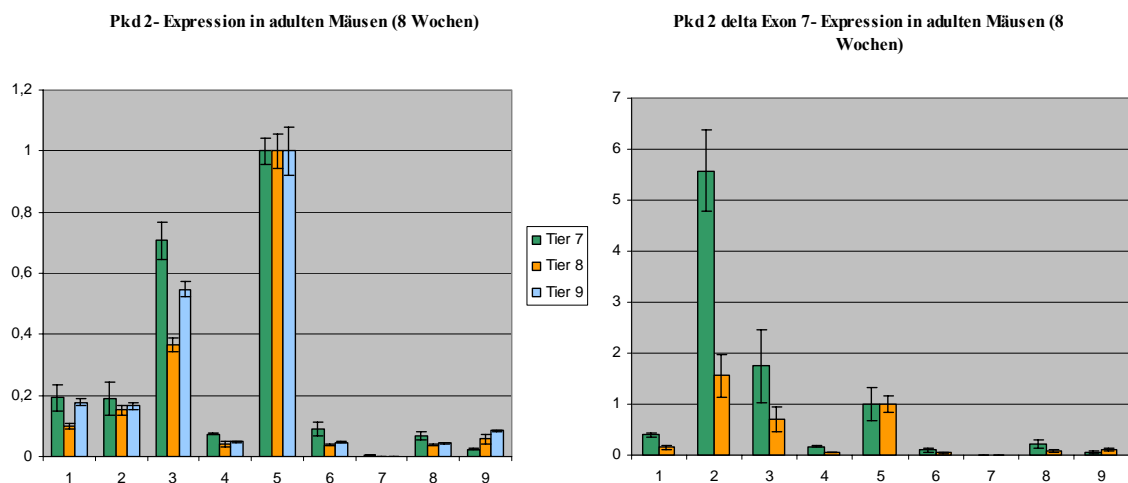


Abb. 39: Relative Darstellung der quantitativen Analyse der Pkd2-, bzw Pkd2 Δ 7-Expression in verschiedenen Geweben von acht Wochen alten Mäusen

1 = Herz, 2 = Gehirn, 3 = Lunge, 4 = Leber, 5 = Niere, 6 = Thymus, 7 = Skelettmuskel, 8 = Magen, 9 = Haut. Der Wert der Nieren (5) wurde als „1“ definiert, alle anderen Werte in Relation dazu angegeben. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Aufgrund der Normalisierung ist ein direkter, quantitativer Vergleich der Expressionen in diesen Diagrammen nicht möglich.

In adulten Mäusen ist die Pkd2-Expression der untersuchten Gewebe ebenfalls in der Niere am höchsten, die der Lunge geht etwas zurück, bleibt aber deutlich auf einem Niveau über den anderen Geweben. In Herz und Gehirn ist die Expression etwa gleich stark, im Vergleich zu den Neugeborenen aber reduziert. Die Pkd2-Expression in Leber und Thymus hat etwa das gleiche Niveau wie in Neugeborenen, die von Magen und Haut ist dagegen reduziert, die im Skelettmuskel kaum noch vorhanden.

Die Expression der $\Delta 7$ -Varianten ist in adulten Mäusen im Großen und Ganzen sehr ähnlich der von Neugeborenen. Am auffälligsten ist auch hier wieder die Expression im Gehirn, die deutlich über dem Niveau der Niere liegt. Der Expressionslevel der Lunge liegt wie bei neugeborenen Mäusen etwa auf dem Niveau der Niere. Auffällig ist auch hier der Expressionsmangel im Skelettmuskel. Leber und Thymus exprimieren in den adulten Mäusen etwas mehr $\Delta 7$ -Transkript als Neugeborene.

Absolut betrachtet bleibt die Expression von $\Delta 7$ -Transkripten relativ zu Transkripten mit Exon 7 auf dem gleichen Niveau wie bei den Neugeborenen. Der maximale Wert liegt wiederum im Gehirn mit 3,02% bei Tier 7. Die absolute Menge an Transkript mit Exon 7 in der Niere betrug bei Tier (7) $3,57 \times 10^{-3} \text{pg}/\mu\text{g RNA}$, bei Tier (8) $5,51 \times 10^{-3} \text{pg}/\mu\text{g RNA}$ und bei Tier (9) $3,46 \times 10^{-3} \text{pg}/\mu\text{g RNA}$.

Gewebe	Tier 7	Tier 8	Tier 9
Herz	0,22	0,28	-
Gehirn	3,03	1,78	-
Lunge	0,26	0,34	-
Leber	0,24	0,22	-
Niere	0,10	0,17	-
Thymus	0,11	0,22	-
Skelettmuskel	0,00	0,00	-
Magen	0,34	0,36	-
Haut	0,23	0,33	-

Tabelle 13: Häufigkeit von Pkd2 $\Delta 7$ Transkripten pro Transkripten mit Exon 7 acht Wochen alter Mäusen
Angaben in Prozent

4.3 Zellkulturexperimente mit Pkd2, Pkd2 Δ 7

Von Pkd2 und Pkd2 Δ 7 wurde der codierende Bereich per PCR mehrfach unabhängig amplifiziert und kloniert. Die Klone wurden auf Mutationen hin untersucht, die während der Synthese durch die Fehlerrate der Polymerasen entstanden waren. Durch Subklonierung verschiedener Klone konnte der gesamte codierende Bereich beider Transkripte in einem Fragment zusammengefügt werden.

Der fehlerfreie codierende Bereich des humanen PKD2-Transkript konnte nicht erzeugt werden, da bei allen untersuchten Klone überdurchschnittlich viele Basenaustausche in den PCR-Produkten gefunden wurden. Der Grund dafür ist unklar, da die Produkte auf die gleiche Weise wie die murinen erzeugt wurden.

4.3.1 Fusionsproteine in „Living-Color“-Vektoren

Da zunächst keine Antikörper gegen Polycystin-2 vorhanden waren, sollten fluoreszierende Fusionsproteine eingesetzt werden, um erste Zellkulturexperimente durchzuführen. Dazu wurden die codierenden Sequenzen in „Living-Color“-Vektoren der Fa. Clontech inseriert. Die codierende Sequenz von Pkd2 wurde in pEYFP_N-1, pEYFP_C-1 und pDsRed_N-1, die von Pkd2 Δ 7 in pEYFP_N-1 und pDsRed_N-1 eingebracht. Per Sequenzierung wurde bestätigt, dass das Leseraster für die Fusionsproteine korrekt war. Für die Fusion des EYFP an den C-Terminus von Pkd2 konnte dessen Sequenz über eine *EcoRI*-Restriktion inseriert werden. Bei N-terminalen Fusionen an Polycystin-2, bzw. der Δ 7-Variante wurden die *NcoI*-Schnittstelle am Startcodon, sowie die *PstI*-Schnittstelle um Codon Ser⁹⁴⁹ verwendet. Dadurch wurden die Polycystin-Proteine mit N-terminaler Fusion um 17 Aminosäuren verkürzt.

Des Weiteren war ein Plasmid (pCI-CMV) vorhanden, das die gesamte PKD1-cDNA trägt und am C-terminalen Ende eine Modifikation in Form eines Flag-Epitops trägt (PKD1-F, Hanaoka et al., 2000)

Bei der ektopischen Expression von Pkd2 und Pkd2 Δ 7 als EYFP-/ DsRed-Fusionsproteine in HeLa-Zellen, ohne dass Polycystin-1 zusätzlich exprimiert wird, findet man eine Anhäufung der Proteine in Zellkompartimenten, die nicht näher bestimmt wurden. Die Lokalisation der Δ 7-Variante scheint räumlich stärker begrenzt zu sein, als die des Pkd2-Fusionsproteins. In beiden Fällen sieht man aber recht deutlich, dass die Proteine nicht

(oder nur sehr schwach) über die gesamte Zelle verteilt sind. Polycystin-1 dagegen ist bei alleiniger, transientser Expression mehr oder weniger über die gesamte Zelle verteilt, zeigt aber auch lokale Anhäufungen.

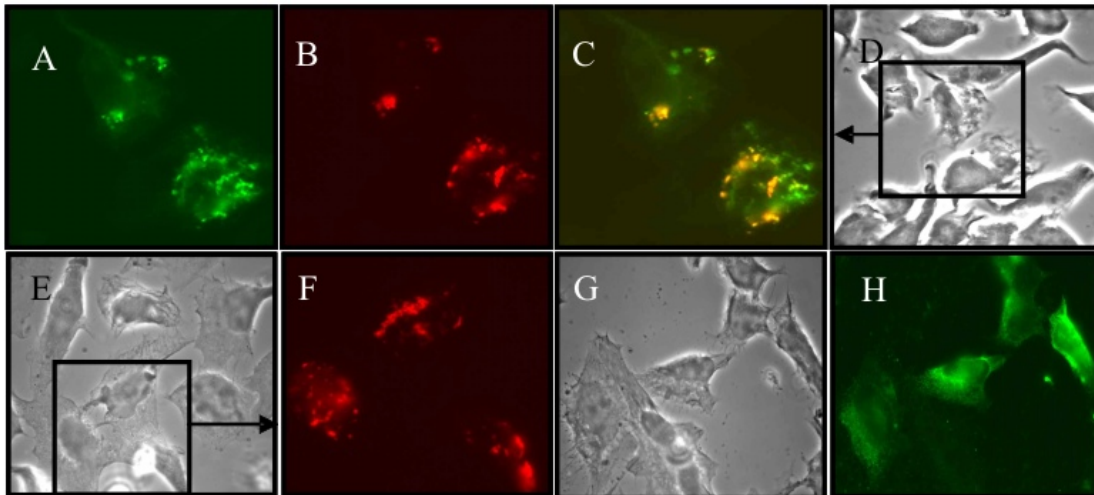


Abb. 40: Expression von Pkd2/Pkd2 Δ 7-Fusionsproteinen in HeLa-Zellen

A: EYFP-Pkd2; B: Pkd2 Δ 7-DsRed; C: Überlagerungsbild von A und B; D: Durchlichtbild

E: Durchlichtbild; F: Pkd2-DsRed; G: Durchlichtbild; H: Polycystin-1, Nachweis über FLAG-Epitop

Bei der Coexpression von Polycystin-1 und den Fusionsproteinen ändert sich das Bild. Das Pkd2-Fusionsprotein ist nun ansatzweise über die gesamte Zelle verteilt, allerdings sind auch noch deutliche Ansammlungen zu sehen. Auch Polycystin-1 scheint sich zu einem an diesen Orten zu befinden. Bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass es zwar Bereiche gibt, bei denen sich die Lokalisationen im Großen und Ganzen überlagern, jedoch auch vereinzelte exklusive Lokalisationen zu beobachten sind. Exprimiert man die Pkd2 Δ 7-Fusionsproteine zusammen mit Polycystin-1 so ist ebenfalls fast die gesamte Zelle mit dem Fusionsprotein bedeckt. Die Verteilung von Polycystin-1 erstreckt sich auch hier scheinbar über die gesamte Zelle.

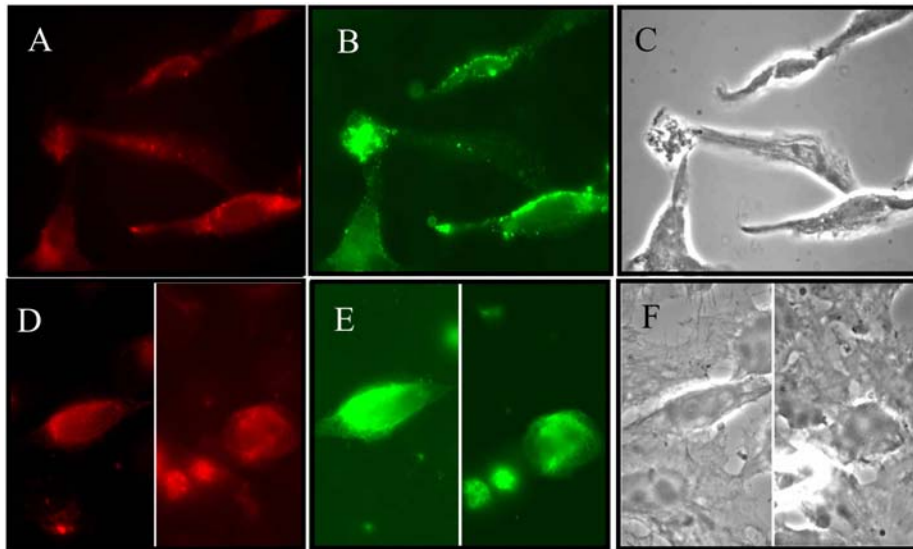


Abb. 41: Coexpression von Polycystin-1 und Pkd2/Pkd2 Δ 7-Fusionsproteinen In HeLa-Zellen
A-C: Pkd2-DsRed und Polycystin-1; D-F: Pkd2 Δ 7-DsRed und Polycystin-1

4.3.2 Antikörper gegen Polycystin-2 und Polycystin-2 Δ 7

Die letzten 279 Aminosäuren des Pkd2 C-Terminus wurden von Herrn Dr. Arseni Markoff (Institut für Medizinische Biochemie, ZMBE Münster) in den Vektor pGEX-4T (Amersham Biosciences) kloniert, um eine Fusionsprotein mit der Gluthation-S-Transferase zu bilden. Das in Bakterien exprimierte und anschließend gereinigte Fusionsprotein wurde als Antigen in „New Zealand White Rabbits“ eingesetzt (Imgenex, San Diego, USA) Das Serum der Kanninchen wurde gereinigt, positiv für das Fusionsprotein und negativ gegen die Gluthation-S-Transferase getestet. Das Antiserum erhielt den Namen Pkd2-CT.

Für den direkten Nachweis der Spleißvariante wäre ein spezifischer Antikörper wünschenswert gewesen, der gegen das Epitop gerichtet ist, das am Übergang von Exon 6 zu Exon 8 codiert ist und die potentielle Membrandomäne bildet. Aufgrund der großen Hydrophobizität ist dieser Bereich jedoch nicht als Antigen zur Immunisierung einsetzbar.

4.3.3 (Co-) Immunopräzipitationsexperimente

Co-Immunopräzipitationen sollten Aufschluss darüber geben, ob die gefundene Wechselwirkung von Polycystin-1 und -2 über deren „coiled-coil“-Domäne auch für die $\Delta 7$ -Variante gilt (Hanaoka et., 2000; Tsiokas, 1997). Dazu wurden die codierenden Sequenzen von Pkd2 und Pkd2 $\Delta 7$ in einen modifizierten pCI-CMV-Vektor kloniert, so dass sie bei Expression ein „c-myc“-Epitop am C-Terminus aufweisen (Pkd2-M, Pkd2 $\Delta 7$ -M). HeLa-Zellen wurden mit diesen Plasmiden (PKD1-F, PKD1-F+ Pkd2-M, PKD1-F+ Pkd2 $\Delta 7$ -M) transfiziert.

Durch Immunopräzipitation mit PKD1-LRR-Antikörpern (Dr. Arseni Markoff, Institut für Medizinische Biochemie, ZMBE Münster), die gegen die leucinreichen Wiederholungen gerichtet sind, aus den Zelllysaten und anschließendem Western Blot konnte die Expression Polycystin-1 in allen Ansätzen gezeigt werden (Abb.42 A). Zwei Banden repräsentieren zum einen das vollständige Polycystin-1 und zum anderen den proteolytisch abgespaltenen Teil der extrazellulären, N-terminalen Domäne (PKD1-NTF, Qian et al., 2002).

Durch Immunopräzipitation mit dem Pkd2-CT Antikörpern konnten die Pkd2-, bzw. Pkd2 $\Delta 7$ Proteine gefällt und im Anschluss auf einem Western Blot mit monoklonalen c-myc-Antikörpern nachgewiesen werden (s Abb. 42 B). Die 110 kDa Bande entspricht dem Pkd2-Protein (2. Spur), die ca. 103 kDa große Bande zeigt das verkürzte Produkt mit fehlendem Exon 7 an (Spur 3). Die beiden Proteine werden auf einem ähnlichen Niveau exprimiert.

Für die Charakterisierung der Interaktion zwischen ektopisch exprimiertem Pkd2 und Pkd2 $\Delta 7$ mit Polycystin-1 wurde mit den gleichen Zelllysaten Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Pkd2-, bzw. Pkd2 $\Delta 7$ -Proteine mit dem c-myc-Antikörper immunopräzipitiert. Die Detektion von Polycystin-1 erfolgte mit den PKD1-LRR-Antikörpern. In Spur 1 von Abb 42 C ist keine Bande zu sehen, wie es von der Negativkontrolle zu erwarten war. In Spur 2 sieht man eine Bande bei ca. 460 kDa, was dem Molekulargewicht von Polycystin-1 entspricht und die spezifische Interaktion von ektopisch exprimierten Pkd2 und Polycystin-1 widerspiegelt. Sollte das Protein der Spleißvariante ebenfalls mit Polycystin-1 interagieren, so müsste in Spur 3 eine Bande auf der gleichen Höhe wie in Spur 2 zu sehen sein. Da dieses nicht der Fall ist, scheint die Interaktion hier nicht stattgefunden zu haben.

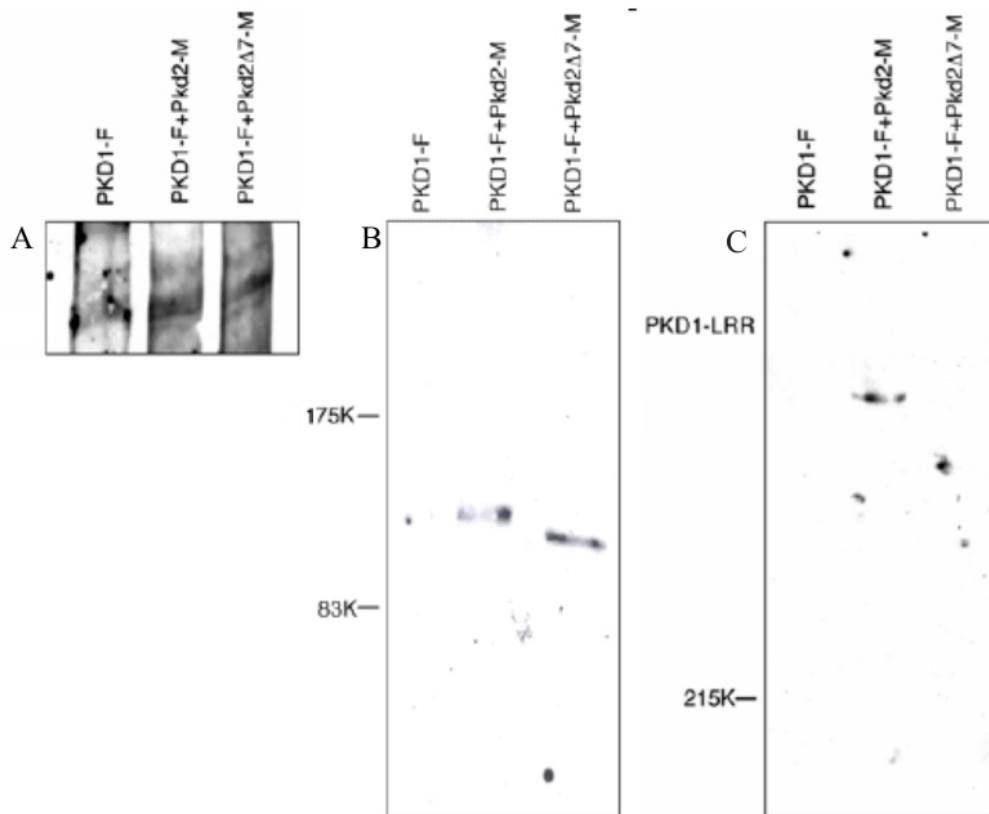


Abb. 42: Immunopräzipitationen aus Zelllysaten transfizierter HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit PKD1-F, PKD1-F + Pkd2-M und PKD1-F + Pkd2Δ7-M Plasmiden (co-) transfiziert

A: Immunopräzipitation und Detektion von Polycystin-1 mit PKD1LRR-Antikörpern. **B:** Immunopräzipitation mit Pkd2-CT Antikörpern und anschließender Detektion mit monoklonalem c-myc-Antikörper. **C:** Immunopräzipitation mit c-myc monoklonalem Antikörper und Detektion mit PKD1-LRR Antikörpern.

4.4 Computergestützte Analyse der PKD2/ Pkd2 Δ 7-Varianten

Die Proteinsequenz, für die Exon 7 codiert, beginnt in der dritten Transmembrandomäne von Polycystin2, bildet einen Loop und endet in dem vierten Membrandurchgang, ausgehend vom Polycystin2-Modell mit sechs Transmembrandomänen (Hayashi et al., 1997). Die Deletion von Exon 7 führt dazu, dass der Anfang von Membranübergang 3 (Ende von Exon 6) mit dem Ende von Membranübergang 4 (Anfang von Exon 8) verbunden wird.

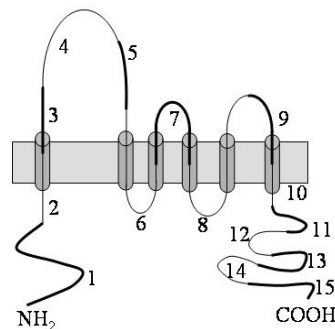


Abb. 43: Schematische Darstellung von Polycystin-2
Die Zahlen korrespondieren mit den entsprechenden Exons

Unter der Annahme Polycystin 2-Modells mit sechs Transmembrandomänen deuten Computer-basierte Proteinvorhersagen auf fünf Transmembranbereiche in den Δ 7-Varianten hin. Die Lokalisation der C- und N-Termini wird von verschiedenen Programmen unterschiedlich bewertet:

Das Ergebnis des TMHMM (Version 2.0, Krogh et al., 2001 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) sagt für die murine Δ 7-Variante fünf Membrandurchgänge mit nicht-cytosolischem N-Terminus und cytosolischem C-Terminus voraus. Im Fall vom normalen humanen Polycystin 2 werden sieben Membrandurchgänge, bei der humanen Δ 7-Variante aber nur fünf identifiziert. Jedoch wird auch hier der Übergang von Exon 6 nach Exon 8 als membrandurchspannend bewertet. Eine für das normale Polycystin 2 als transmembran angesehen Domäne ist es in der Variante nicht mehr (s. Abb. 44).

Ein anderes Programm („DAS“-Transmembrane Prediction Server, Cserzo et al, 1997 <http://www.sbc.su.se/%7Emiklos/DAS/>), das für Polycystin 2 sieben Transmembrandomänen vorhersagt, reduziert im Fall der Δ 7-Varianten die Anzahl auf

sechs, was wiederum auf einen Transmembranübergang des hydrophoben Bereichs zwischen den von Exon 6 und Exon 8 codierten Aminosäuren in den $\Delta 7$ -Varianten hinweist. Das Programm gibt keine Hinweise auf die Lokalisation der C- und N-Termini (s. Abb. 45).

Das PSORT II-Programm (Nakai and Horton, 1999 <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) sagt die N-Termini der $\Delta 7$ -Varianten als intrazellulär vorher, wodurch die C-Termini im Falle von fünf Transmembranomänen keine cytosolische Lokalisation hätten.

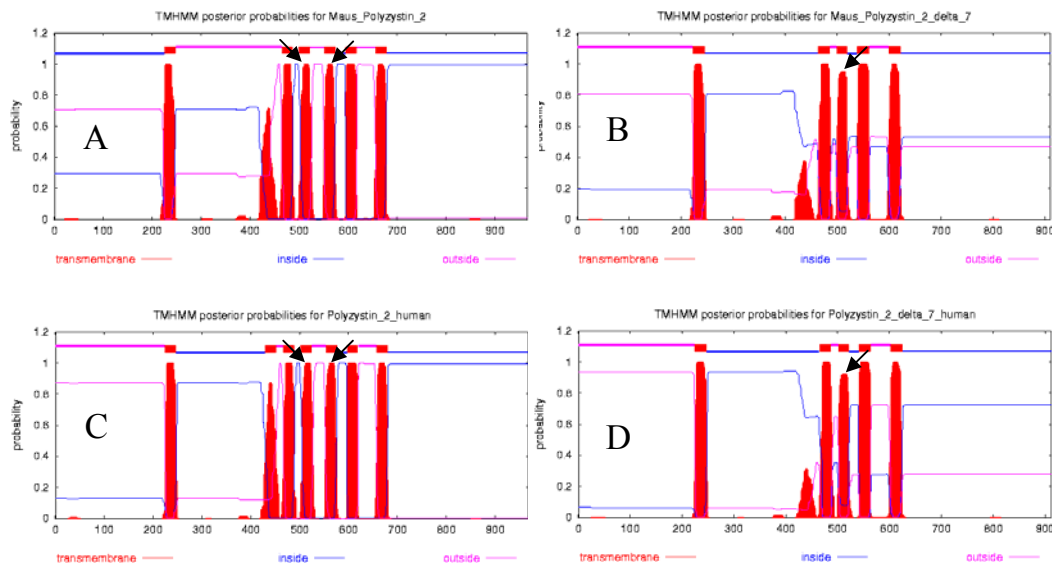


Abb. 44: TMHMM Server 2.0 Vorhersagen für Transmembranomänen im humanen und murinen Polycystin 2 und deren $\Delta 7$ -Varianten

A: Murines Polycystin-2; B: Murine $\Delta 7$ -Variante; C: Humanes Polycystin-2; D: Humane $\Delta 7$ -Variante. Die Pfeile in A und C zeigen auf die Transmembranomänen 3 und 4. Der Pfeil in B und D zeigt auf die neue Transmembranomäne in den $\Delta 7$ -Varianten

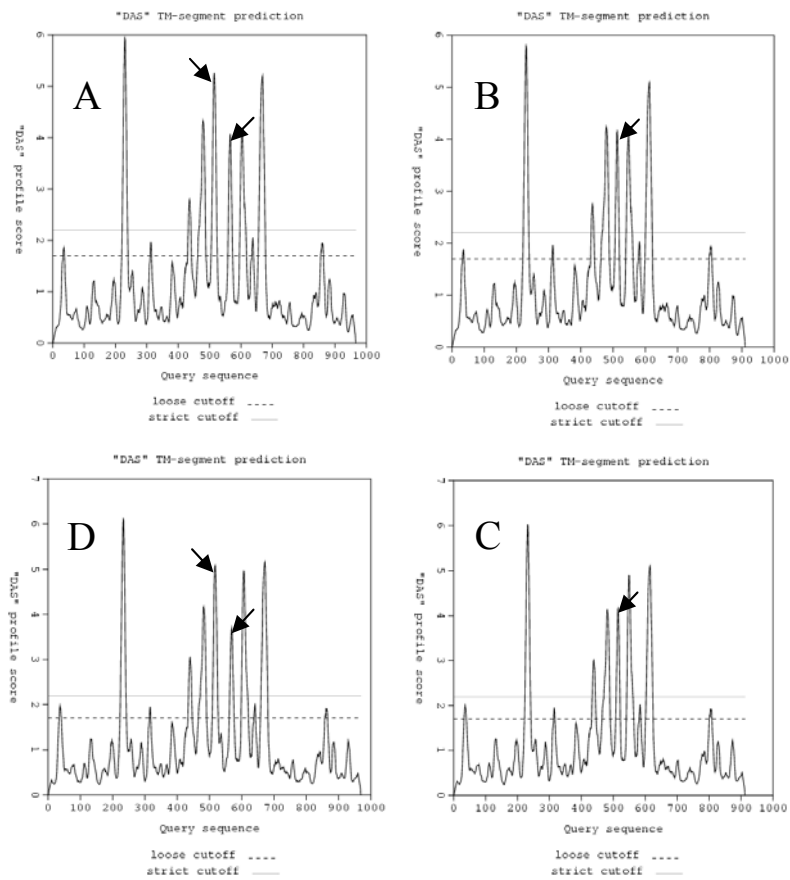


Abb. 45: „DAS“-Transmembrane Prediction Server Vorhersagen für Transmembrandomänen im humanen und murinen Polycystin 2 und deren $\Delta 7$ -Varianten

A: Murines Polycystin 2; **B:** Murine $\Delta 7$ -Variante; **C:** Humanes Polycystin 2; **D:** Humane $\Delta 7$ -Variante. Die Pfeile in A und C zeigen auf die Transmembrandomänen 3 und 4. Der Pfeil in B und D zeigt auf die neue Transmembrandomäne in den $\Delta 7$ -Varianten.

5 Diskussion (Teil 1)

5.1 Reportergene unter der Promotorkontrolle von Pkd1/ Expression von Polycystin-1 in Mäusen

In dieser Arbeit standen gereinigte, polyklonale Antikörper, die gegen verschiedene Epitope des humanen Polycystin-1 gerichtet waren, zur Verfügung. Mit diesen Antikörpern sollten u.a. an Geweben von Pkd2-Knockout-Mäusen, die im Institut für Humangenetik erzeugt worden sind, die Expression von Polycystin-1 vor dem Hintergrund einer veränderten Pkd2-Expression untersucht werden. Beim Test auf Sektionen von Mausembryonen (E13,5) konnte nur der Antikörper PK6 Ergebnisse liefern, die Ergebnissen veröffentlichter Arbeiten ähnelten. Allerdings standen weder Präimmunsereen noch Polycystin-1-freie Gewebe zur Verfügung, die die Detektion hätten bestätigen können. Klarheit darüber hätten Mauslinien mit der Expression eines Markergens unter der Kontrolle der Pkd1-Promotors geben sollen, die sich zur der Zeit bereits in Arbeit befanden.

Es konnten zuvor BACs der männlichen ES Zelllinie CJ7 des Stammes 129 SV (California Institute of Technology bzw. Invitrogen) identifiziert werden, die das Pkd1-Gen tragen. Der BAC 423D1 wurde subkloniert, das Exon1 gefunden, die Umgebung sequenziert und manipuliert. Neben einem Konstrukt, welches das bakterielle LacZ-Gen unter der Pkd1-Promotorkontrolle trägt, wurde ein zweites mit einem EGFP-Markergen erstellt. Der Aufbau beider Konstrukte war bis auf das Markergen identisch. Der Vergleich dieser transgenen Mauslinien hätte, neben der Kontrolle des PK6 Antikörpers, auch die Stärken und Schwächen der jeweiligen Reportergene gegenüber stellen können.

In Experimenten mit mIMDCK2-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression des LacZ-Gens sogar von einem Plasmid aus erfolgte, welches nur in Prokaryonten repliziert werden kann. Die regulatorischen Sequenzen, die in dem Plasmid enthalten waren, sollten demnach ausreichend für eine Expression des Transgens gewesen sein.

Erst beim zweiten Durchgang von Pronucleusinjektion und Implantation der Oozyten in eine scheinchwangere Maus überlebte ein weiblicher, transgener Nachkomme. In Tieren aus folgenden Generationen konnte keine Aktivität des Transgens festgestellt

werden. Alle Versuche einer spezifischen LacZ-Färbung scheiterten. Wie sich herausstellte, wurde das Transgen schon auf RNA-Ebene nicht exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass im Promotorbereich des Transgens eine Methylierung stattgefunden hatte und möglicherweise verantwortlich für die Inaktivierung ist. Diese Methylierung wurde auch an spätere Generationen weitergegeben. Die Integration des Transgens hatte keine phänotypische Erscheinung. Alle transgenen Mäuse erschienen gesund und zeigten keine auffälligen Veränderungen der Organe oder des Verhaltens.

Die Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden, eine epigenetische Modifikation des Säugetier-Genoms, nimmt Einfluss auf die Genexpression (Holiday, 1987). Dieser Mechanismus ist involviert bei der Inaktivierung des X-Chromosoms (Beard et al., 1995), der Karzinogenese (Chuang et al., 1997; Laird, 1997; Ramchandani et al., 1997), der Embryonalentwicklung (Li et al., 1992) und dem Imprinting von Genloci (Li et al., 1993; Neumann und Barlow, 1996).

Eine weitere wichtige Funktion der Methylierung ist die Inaktivierung von Fremd-DNA, die ins Genom integriert wurde. Sie dient in Vertebraten und Pflanzen als Schutz vor parasitären Sequenzen, wie z.B. Transposons, DNA- und RNA-Viren und bakterieller DNA (Matzke et al., 2000). Die chemische Modifikation betrifft häufig den Promotor der Fremd-DNA, verhindert deren Transkription und wird mitotisch und meiotisch vererbt. Neben der transkriptionellen Inaktivierung gibt es auch eine posttranskriptionelle, bei der Methylierung ebenfalls häufig eine Rolle spielt. Allerdings wird diese Inaktivierung gewöhnlich nicht meiotisch vererbt.

Ob ein Transgen inaktiviert wird, scheint zunächst einmal von dem Locus der Integration abhängig zu sein, wie bei Experimenten mit transgenen Zelllinien und Mäusen gezeigt werden konnte (Jähner und Jaenisch, 1985; Guy et al., 1997; Sasaki et al., 1993; Koetsier et al., 1996). Die zufällige Integration von vielen Transgenen fördert deren *de novo* Methylierung (Herzt et al., 1999).

Neben dem Insertionslocus spielen andere Faktoren eine Rolle, wie kürzlich gezeigt werden konnte. Die Dichte von CpG-Inseln eines Transkriptes scheint eine kausale Rolle bei der Unterdrückung der Transkription ins Genom integrierter Elemente zu spielen (Chevalier-Mariette et al., 2003). Bakterielle Gene sind in der Regel CpG-reich. Das LacZ-Gen hat beispielsweise einen CpG-Gehalt von 9,5 % (291 CpG/ 3076 Nukleotide). Wenn diese Reportergene unter der Kontrolle von Promotoren mit weit verbreiteter Aktivität stehen, kommt es fast immer zu einer Verfälschung des Expressionsmusters. Wie

Chevalier-Mariette et al. zeigten, ist die Methylierung der Promotorsequenzen grundsätzlich abhängig von der Häufigkeit von CpGs im Reportergen. Dieses wird zuerst methyliert und verändert dadurch die Konformation des Chromatins. Je mehr modifizierte Cytosine in der codierenden Sequenz vorhanden sind, desto häufiger werden auch CpGs in den umliegenden Sequenzen methyliert. Daraus resultiert eine Veränderung der Promotoraktivität bzw. sogar die völlige Inaktivierung. Sind keine, bzw. sehr wenig CpG-Inseln im Transgen vorhanden, so kann eine Inaktivierung nicht stattfinden. Eine Veränderung der bakteriellen Gensequenz hin zu weniger CpGs wirkte sich auch in anderen Experimenten positiv auf deren Expression in transgenen Mäusen aus (Scrabble und Stambrook, 1997).

Die Analyse des sequenzierten Bereichs um Exon 1 herum offenbart, dass in unmittelbarer Umgebung der codierenden Sequenz eine sehr hohe Dichte von CpG-Inseln vorliegt (10,3%). Betrachtet man nur den Bereich vor dem Startcodon, so liegt er sogar bei 11,4 % (s. Abb. 46). Polycystin-1 wird außerdem in sehr vielen Geweben exprimiert (Nauta et al., 2000). Zusammen mit den genannten Beobachtungen ist die Wahrscheinlichkeit einer Inaktivierung des Transgens hoch, es sei denn das LacZ-Konstrukt wird an einem Locus inseriert, der grundsätzlich nicht methyliert wird. Das Gleiche gilt für das zweite Konstrukt. Zwar handelt es sich bei EGFP nicht um eine bakterielle Sequenz, jedoch enthält die codierende Sequenz ebenfalls viele CpG-Inseln (6,5%; 65 CpG/ 1008 bp). Der durchschnittliche CpG-Gehalt liegt bei der Maus bei ca. 1%, wobei diese nicht gleichmäßig über das Genom verteilt sind, sondern gehäuft in relativ kurzen Regionen auftreten (Chevalier-Mariette et al., 2003)

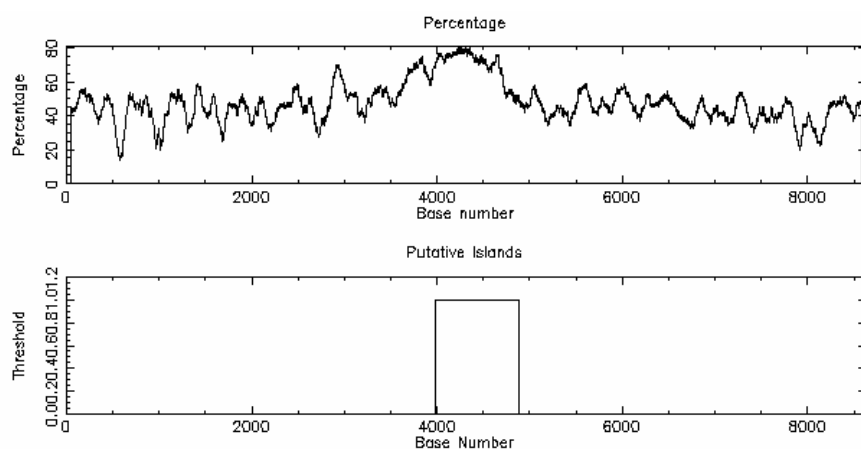


Abb. 46: EMBOSS CpG Plot (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>)
 Abgebildet ist ein Bereich von 8633 bp um Exon 1 (Position 4257-4471) des Pkd1-Gens. Das Programm findet eine ungewöhnliche CG-Komposition von 3986 bis 4880. Von 895 Nukleotiden entfallen 92 auf CpGs (10,3%). Oben: GC-Gehalt, darunter Ansammlungen häufiger CpG-Inseln.

Neben der Inaktivierung des Transgens können andere positionsabhängige Faktoren dessen Expression beeinflussen, wie z.B. die Nähe von regulatorischen Elementen. Die Anzahl der inserierten Reportergene in Verbindung mit deren möglicherweise unterschiedlichen Aktivitäten kann die Ergebnisse entscheidend beeinflussen. In neueren Arbeiten wird deshalb häufig eine gezielte Insertion von Transgenen vorgenommen. Im Gegensatz zur Pronukleusinjektion, bei der eine zufällige Integration erfolgt, kann in embryonalen Stammzellen eine Integration durch homologe Rekombination erfolgen. Dabei bietet sich aber nicht das zu untersuchende Gen selber an, denn dabei könnte es zu einer Inaktivierung durch eine Unterbrechung des Leserasters kommen. Dadurch könnte es zu einem Gen-Dosis-Effekt kommen, der wiederum eine verfälschte Darstellung auslöst.

Es konnte ein Locus gefunden werden, der wenig Einfluss auf die Expression des Transgens nimmt, nämlich der *Hprt*-Locus (Bronson et al., 1996; Misra et al., 2001; Evans et al., 2000; Guillot et al., 2000). Die gewebespezifische Aktivität der inserierten Promotoren war in diesen Experimenten festgestellt worden. Die Vorteile des *Hprt*-Locus werden wie folgt beschrieben (Heany et al., 2003):

1. X-chromosomale Lokalisation.

Nicht alle Transgene sind „problemlose“ Reporter von Genaktivitäten. Transgene mit schädlicher Auswirkung können in diesen Locus eingebracht werden. Die zufällige Inaktivierung des X-Chromosoms in Weibchen kann zur mosaikartigen Expression des Transgens führen, dadurch die Überlebensrate steigern und erst so eine Untersuchung ermöglichen.

2. Selektion in Embryonalen Stammzellen.

Es konnten embryonale Stammzellen etabliert werden, die einen partiell deletierten *Hprt*-Locus aufweisen. Bronson et al. (1996) entwickelten einen Zielvektor, der diese Deletion durch homologe Rekombination komplementieren kann. Die Selektion positiver Rekombinationsereignisse kann direkt auf HAT-Medium (hypoxanthine-aminopterin-thymidine) erfolgen.

3. *Hprt* ist ein „housekeeping“-Gen

Promotoren mit weit verbreiteter Aktivität erzeugen oft eine nicht vorhersehbare Expression, wenn sie zufällig ins Genom integriert sind. Inseriert man diese in den *Hprt*-Locus, so findet man eine Expression, die der eigentlichen Promotoraktivität

weitestgehend entspricht. Als Ursache wird die Chromatinstruktur an diesem Locus angesehen, die cis-aktiven, regulatorischen Elementen den Zugang ermöglicht.

Die Autoren geben allerdings zu bedenken, dass die korrekte Aktivität entwicklungs-spezifischer Gene bzw. Promotoren abhängig von Veränderungen der Chromatinorganisation sind. Diese sei am *Hprt*-Locus wahrscheinlich nicht gewährleistet. Mögliche Abhilfe könnte die Insertion eines transgenen BACs bringen, der die benötigte Chromatinumgebung beherbergt.

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten ET-Cloning, das eine Konstruktion des Transgens erst ermöglichte, ist auch die exakte Manipulation eines BACs möglich (Muyrers et al., 1999). Das erstellte Transgen bzw. das *Pst*I-Fragment könnte damit in den BAC423D1 integriert werden. Die von Heany et al. (2003) beschriebene Veränderung des Vektortanteils des BACs ermöglicht eine homologe Rekombination in den *Hprt*-Locus. Durch zwei Rekombinationsereignisse in *E. coli* könnten die erstellten Konstrukte für eine homologe Rekombination in den *Hprt*-Locus vorbereitet werden.

BACs sind auch noch in einem anderen Zusammenhang für die Expression von Transgenen sehr interessant. Basu et al. (2005) stellten eine Methode vor mit der BACs in HACs (human artificial chromosomes) umgewandelt werden. Durch ein modifiziertes Tn5 Transposon wurden die notwendigen Elemente in einen BAC integriert, die für eine erfolgreiche Replikation als eigenständiges Chromosom notwendig sind. Bisher wurden diese Experimente nur in Zellkulturversuchen durchgeführt. Frühere Experimente mit Transchromosomen in transgenen Mäusen hatten gezeigt, dass diese selten durch die männliche Keimbahn übertragen werden und die Effizienz der Übertragung in der weiblichen Keimbahn mit zunehmender Größe der Fragmente abnimmt (Tomizuka et al., 1997 und 2000). Der Vorteil der Transchromosomen liegt in ihrer Selbstständigkeit und die damit verbundene Eliminierung der Probleme, die bei zufälliger Integration auftreten. Aktuell scheint die Verwendung von Transchromosomen für die Erzeugung transgener Mäuse noch nicht ausgereift, um über Generationen das Transgen zu erhalten.

6 Diskussion (Teil 2)

6.1 Alternative Spleißformen der Pkd2/PKD2-Transkripte

Bei der Klonierung der codierenden Sequenz des murinen Pkd2-Gens wurden vier alternative Spleißformen des Transkripts entdeckt. Zwei Varianten münden in eine vorzeitige Termination der Translation: die Deletion eines Teils von Exon 6 ($\Delta 6$) und die vollständige Deletion von Exon 9 ($\Delta 9$). Bei der Deletion von Exon 7 ($\Delta 7$) und der Deletion von Exon 12 und 13 ($\Delta 12-13$) bleibt das Leseraster erhalten. Bis auf die letzt genannte konnten alle alternativen Spleißprodukte mit der gesamten codierenden Sequenz amplifiziert und isoliert werden. Auch von einer humanen cDNA-Bank aus embryonalen Geweben und aus diversen Zelllinien konnten diese Transkripte amplifiziert werden. Die $\Delta 7$ -Variante ließ sich mit denselben Oligonukleotiden, die zur Amplifikation der Mausequenzen verwendet wurden, auch in der cDNA aus MDCK-Zellen (Hund) nachweisen. Insgesamt scheinen die $\Delta 7$ - und $\Delta 9$ -Varianten besonders häufig zu sein. Bei der Isolierung membrangebundener Polysomen aus HMEC-1-Zellen konnte nur die $\Delta 7$ -Variante amplifiziert werden, weshalb sich die weiteren Untersuchungen auf dieses Transkript beschränkten.

Aus 15 verschiedenen Geweben eines Mausembryos (E16,5) wurde die RNA isoliert und das Exon 7 per RT-PCR amplifiziert. In allen Geweben ließ sich neben der Hauptform auch die Spleißvariante vervielfältigen. Da eine einfache PCR-Reaktion keinen Aufschluss über die Menge der Transkripte gibt bzw. leicht falsche Schlüsse gezogen werden können, wurden die Transkripte mit Hilfe einer Quantitativen PCR untersucht. In neun Geweben drei unterschiedlicher Entwicklungsstufen (E16,5, 1 Tag und 8 Wochen) wurden die Transkripte quantisiert. Die gemessene Expression von Transkripten mit Exon 7 korreliert mit den Daten, die zuvor aus immunhistologischen Untersuchungen und *in situ* Hybridisierungen gewonnen wurden (Wu et al., 1997; Guillaume und Trudel, 2000; Markowitz et al., 1999). Pkd2 wird abhängig von der Entwicklungsstufe exprimiert. Die höchste Expression wurde in allen Tieren in den Nieren gefunden. Die höchste Expression von Pkd2 $\Delta 7$ wurde im Gehirn detektiert und bewegt sich in der Größenordnung von 3-6,4% der Transkripte mit Exon 7.

Grundsätzlich ist die Expression des Pkd2-Gens individuell. Betrachtet man beispielsweise die Pkd2-Expression der Niere, so sind die Schwankungen innerhalb einer Altersstufe größer als der durchschnittliche Unterschied der Gruppen (s. Tabelle 14)

Altersstufe	Tier A	Tier B	Tier C	Durchschnitt
E16.5	1,09	3,74	3,58	2,55
1 Tag	2,69	2,61	3,59	2,96
8 Wochen	3,57	5,51	3,46	4,18

Tab. 14: Menge an Transkripten mit Exon 7 in der Niere (angegeben in $\times 10^{-3}$ pg/ μ g RNA)

Die durchschnittliche Pkd2-Expression in der Niere nimmt laut Tabelle 14 mit zunehmendem Alter der Tiere zu, was sich mit bekannten Daten deckt (Delmas et al., 2004).

WICHTIG: Die Werte der Nieren wurden sowohl bei den Messungen der Transkripte mit Exon 7 als auch bei denen ohne Exon 7 in jedem Tier als „1“ definiert. Die Ab- bzw. Zunahme von Transkriptmenge wird deshalb im Folgenden immer in Relation zur Expression der Niere („1“) betrachtet. Die absoluten Werte werden nicht verglichen.

Betrachtet man nicht-renale Gewebe stellt man fest, dass die Expression von Transkripten mit Exon 7 in diesen mit zunehmendem Alter abnimmt. Ausnahme sind Gehirn und Lunge bei den einen Tag alten Mäusen im Vergleich zu Embryonen E16,5. Hier nimmt die Expression zu.

Bei der $\Delta 7$ -Variante ist die exprimierte Menge der Embryonen E16,5 und der einen Tag alten Mäuse in etwa gleich. Nur ein Organ fällt heraus. Im Gehirn nimmt die Expression der $\Delta 7$ -Variante in diesem Zeitraum deutlich zu. In den erwachsenen Mäusen geht die Expression der Variante in den nicht renalen Geweben insgesamt etwas zurück., die des Gehirns bleibt jedoch auf dem hohen Niveau wie bei den einen Tag alten Mäusen.

In einer Mauslinie mit einem manipuliertem Pkd2-Gen, treten Leberzysten in Pkd2^{+/-}-Mäusen (62 bis 88 Wochen) mit 53% der untersuchten Tiere häufiger auf als Nierenzysten mit 29% (Wu et al., 2000). 33% der Tiere zeigten in keinem der beiden Organe Zystenbildung. Das könnte die hier gefundene, individuelle Expression des Pkd2-Gens unterstreichen. Bei ADPKD, ausgelöst durch Mutationen im PKD1-Gen, spielen „Modifier“-Gene eine große Rolle (Fain et al., 2005). Ob dieses auch für PKD2-Patienten gilt bleibt abzuwarten. Hier fallen die transheterozygoten Mutationen in einigen Zysten auf

(Watnick et al., 2000; Wu et al., 2002). Offensichtlich reicht jeweils eine Mutation in beiden Genen, um Zystenbildung hervor zu rufen. Dieser Befund würde der „second hit“-Theorie für eines der beiden Gene widersprechen (Germino, 1997). Möglich wäre es aber, dass es verschiedene Haploypen des PKD2/Pkd2-Gens gibt, die mit unterschiedlicher Aktivität des Locus korrelieren könnten. Das könnte auch die individuellen Unterschiede der Mäuse mit mutiertem Pkd2-Gen begründen.

Zusätzliche Information gibt die Arbeit von Wu et al. (2000). Leberzysten treten in heterozygoten Pkd2-Mäusen offenbar häufiger auf als Nierenzysten. Bei der Quantisierung der Transkripte wurde für die Leber konstant ein sehr niedriger Wert gemessen. Dieses Organ scheint auf den Verlust eines Pkd2-Allels besonders empfindlich zu reagieren. Die Gründe sind jedoch unklar. Der Mechanismus der Zystenentstehung könnte sich entweder von dem in der Niere unterscheiden oder die Transkription der „schwachen“ Allele fällt in der Leber besonders gering aus, was die oben genannte Hypothese stärken würde. Sollte es jedoch zum „second hit“ kommen, liegt der Grund vielleicht in einer höheren Mutationsrate des Pkd2-Gens in der Leber. Leider gibt es keine Daten über den Genotyp der Leberzysten in den Pkd2^{+/-}-Mäusen.

Erwähnenswert ist auch noch, dass die Expression von Pkd2 im Skelettmuskel der erwachsenen Tiere (fast) völlig verschwunden ist.

Zwei voneinander unabhängige Computeranalysen der Aminosäuresequenz weisen darauf hin, dass die $\Delta 7$ -Varianten nur fünf Transmembrandomänen haben im Gegensatz zu sechs beim normalen Polycystin-2. Die codierende Sequenz von Exon 7 beginnt im Transmembranübergang drei und endet im vierten Übergang. Die hydrophoben Aminosäuren, die am Ende von Exon 6 und am Anfang von Exon 8 codiert sind, könnten eine neue Transmembrandomäne bilden. Das hätte zur Folge, dass sich die Lokalisation eines Terminus des Proteins ändern muss. Die berechneten Lokalisationen fallen je nach Programm unterschiedlich aus. Ein Programm sieht den N-Terminus eindeutig intrazellulär wie im normalen Polycystin-2. Ein anderes sagt den C-Terminus als intrazellulär vorher, sieht aber beispielsweise auch sieben Transmembrandomänen beim humanen Polycystin-2. Sollte der C-Terminus nicht ins Cytoplasma ragen, so hätte das Auswirkungen auf die Lokalisation von verschiedenen funktionellen Abschnitten des Proteins (s.u.).

In Zellkulturexperimenten ließ sich die cDNA der $\Delta 7$ -Variante auf etwa gleichem Niveau wie die des normalen Transkriptes transient exprimieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass das normale Polycystin-2 zusammen mit Polycystin-1 bei transientser

Expression co-immunopräzipitiert werden kann, das Protein der Variante jedoch nicht. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass sich der C-Terminus der $\Delta 7$ -Variante nicht im Cytoplasma befindet. Die „coiled-coil“-Domänen von Polycystin-1 und -2 sind normalerweise cytoplasmatisch lokalisiert, wo sie miteinander interagieren können. Diese Interaktion ermöglicht die Co-Immunopräzipitation (Hanaoka et al., 2000).

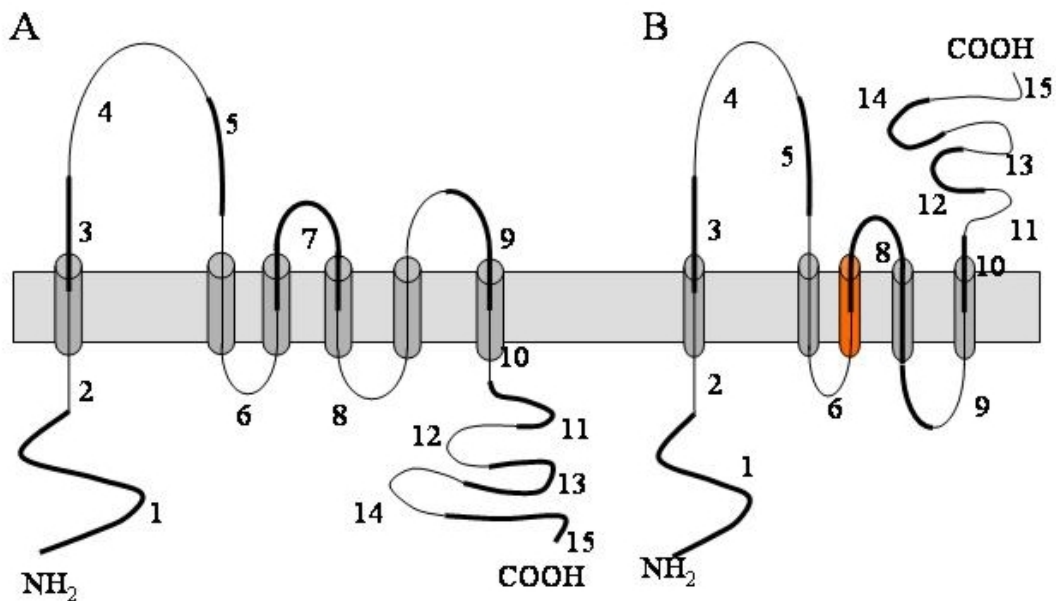


Abb. 47: Schematische Darstellung der putativen Membrantopologie von Polycystin-2 (A) und Polycystin-2 $\Delta 7$ (B)

Die Zahlen korrespondieren mit den entsprechenden Exons. Die neue Transmembrandomäne in Polycystin-2 $\Delta 7$ ist hervorgehoben. Die „coiled-coil“-Domäne und das „ER retention“-Signal werden von Exon 12 codiert. Beide Termini des normalen Polycystin-2 (A) sind cytoplasmatisch lokalisiert.

Andere Zellkulturexperimente mit Fusionsproteinen, bei dem Pkd2 und Pkd2 $\Delta 7$ mit N-bzw.-C-terminalem EYFP oder DsRed exprimiert werden, zeigen überraschende Ergebnisse. Während der Expression ohne Co-Expression von Polycystin-1 in HeLa-Zellen sind die Fusionsproteine (größtenteils) auf einige Strukturen innerhalb der Zelle örtlich beschränkt. Die räumliche Verteilung der Proteine der $\Delta 7$ -Variante scheint dabei noch restriktiver zu sein als die des normalen Polycystin-2. Bei gleichzeitiger transienter Expression mit Polycystin-1 ändert sich das Bild. Zwar kann man noch Ansammlungen der Fusionsproteine innerhalb der Zelle beobachten, aber die Proteine sind räumlich nicht mehr auf einige Strukturen beschränkt. Sie verteilen sich wie Polycystin-1 annähernd über die gesamte Zelle. Auch ist das Verteilungsmuster dem von Polycystin-1 in beiden Fällen sehr ähnlich.

Dieser Befund ist etwas überraschend, wurde doch bisher angenommen, dass Polycystin-2 von Polycystin-1 durch Interaktion über die „coiled-coil“ Domäne zur Zellmembran geleitet wird (Hanaoka et al., 2000). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Polycystin-2 bei alleiniger Expression in CHO-Zellen eine intrazelluläre Lokalisation aufweist. Erst bei Co-Expression von Polycystin-1 und -2 findet man beide Proteine in der Zellmembran, wo sie einen Ionenkanal bilden.

Cai et al., (1999) fanden ein Motiv, das für eine intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2 verantwortlich sein soll. Das „ER retention“ Signal, das sich von Glu⁷⁸⁷ bis Ser⁸²⁰ (in der humanen Sequenz; Glu⁷⁸⁵ bis Ser⁸¹⁸ in der murinen Sequenz) erstreckt, ist für die Lokalisation von Polycystin-2 im Endoplasmatischen Reticulum verantwortlich. Eine andere Arbeit findet Interaktionen von Polycystin-2 mit PIGEA-14 über deren „coiled-coil“ Domänen. Hier wird spekuliert, dass PIGEA-14 eine wichtige Rolle bei der Regulation der intrazellulären Verteilung von Polycystin-2 spielt. Die Coexpression beider Proteine hat deren Umverteilung zum Trans-Golgi-Netzwerk zur Folge (Hidaka et al., 2004). Diese Abschnitte liegen bei der $\Delta 7$ -Variante in dem Teil, der von der Relokalisation betroffen wäre.

Köttgen et al (2005) konnten zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-2 allein abhängig ist vom Ser⁸¹² (human bzw. Ser⁸¹⁰ bei der Maus). Nur im unphosphorylierten Zustand dieser Aminosäure kann Polycystin-2 zur Zellmembran gelangen. Wie Cai et al (2004) zuvor gezeigt hatten, findet die Phosphorylierung meistens statt. Daher müsste der Großteil von Polycystin-2 intrazellulär vorliegen. Das Serin^{810/812} (murin/human) ist von sauren Aminosäuren umgeben, die einer Bindung von PACS-1 und -2 ermöglichen und im oben genannten „ER retention“ Signal liegen. Diese Adaptorproteine halten in Verbindung mit anderen Proteinen das Polycystin-2 in der Zelle zurück, wenn der Serinrest phosphoryliert ist. Dennoch kann Polycystin-2 zwischen verschiedenen intrazellulären Kompartimenten hin und her wandern.

Betrachtet man die Experimente mit den Fusionsproteinen in dieser Arbeit, so fällt auf, dass sich die Pkd2 $\Delta 7$ -Variante scheinbar so wie die normale verhält. Der C-Terminus der Variante interagiert aber offenbar nicht mit Polycystin-1 wie die Co-Immuno-präzipitationen gezeigt haben. Dies könnte durch eine veränderte Lokalisation des C-Terminus begründet werden, bedingt durch den quantitativen Verlust einer Transmembrandomäne (qualitativ sind zwei Domänen verloren gegangen und eine neue ist entstanden). Zwar wäre eine Interaktion der $\Delta 7$ -Variante mit Polycystin-1 möglich, denn

die notwendige Domäne ist vorhanden. Diese Wechselwirkung wäre direkt nach der Synthese denkbar, findet aber offensichtlich nicht statt.

Der Sortierungsmechanismus über das Ser^{810/812} (murin/human) bleibt aber wie es scheint beim Pkd2 Δ 7-Produkt trotz veränderter Membrantopologie funktionsfähig. Die Gegenwart von Polycystin-1 führt dazu, dass beide Polycystin-2-Formen ihre Lokalisation verändern. Da aber die Δ 7-Variante nicht mit Polycystin-1 interagiert, kann es auch nicht zu der bis vor kurzem angenommenen aktiven Relokalisierung durch Polycystin-1 kommen. Es wäre möglich, dass Polycystin-1 über Signalwege Einfluss auf den Phosphorylierungszustand des Ser^{810/812} (murin/human) nehmen könnte. So könnte erklärt werden, dass Polycystin-2 in Gegenwart von Polycystin-1 zumindest zu einem Teil zur Zellmembran wandert. Erst dort würde dann die Interaktion über die „coiled coil“-Domänen stattfinden können.

Verstärkt wird die Annahme noch durch einen Befund aus der Arbeit von Köttgen et al (2005). Es wurde zunächst vermutet, dass Polycystin-1 durch die Interaktion über die „coiled coil“-Domäne die Bindestellen der PACS-Proteine blockieren könnte. Jedoch konnten weder das gesamte Polycystin-1 noch ein C-terminaler Abschnitt davon die Interaktion der PACS-Proteine mit Polycystin-2 beeinflussen.

Von Polycystin-1 wurde bisher angenommen, dass es ein Protein der Zellmembran sei, da es über ein Führungspeptid verfügt, was möglicherweise für diese Lokalisation ursächlich sein könnte (The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995; Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1997; Aguiari et al., 1998). Grimm et al. (2003) fanden heraus, dass transient exprimiertes Polycystin-1 in Zelllinien mit zwei Pkd2-Nullallelen in der Zellmembran und dem ER zu finden ist. Werden Polycystin-1 und Polycystin-2 in diesen Zellen transient co-exprimiert, so findet man abhängig vom quantitativen Verhältnis der Proteine eine veränderte Lokalisation. Wird Polycystin-1 in größerem Maße exprimiert, so findet man es in der Zellmembran und ER-assoziiert. Wird dagegen mehr Polycystin-2 exprimiert, so findet man beide Proteine co-lokalisiert im ER. Per Immunopräzipitation konnte hier die Interaktion der Proteine nachgewiesen werden. Eine Lokalisation der Proteinkomplexe in der Zellmembran konnte zwar nicht gefunden, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Diese Arbeit zeigt, dass die Lokalisation von Polycystin-1 in diesem Modell von Polycystin-2 abhängig ist. Das lässt sich mit dem Modell von Köttgen et al. erklären, schließt aber gleichzeitig aus, dass Polycystin-2 aktiv von Polycystin-1 zur Zellmembran geführt wird.

In anderen bereits genannten Experimenten wie auch in dieser vorliegenden Arbeit verändert sich die Lokalisation von Polycystin-2 scheinbar abhängig von der Polycystin-1 Expression. Ein großer Unterschied in den Untersuchungen von Grimm et al. zu allen anderen ist der, dass sie die einzigen sind, die eine Zelllinie mit Pkd2-Nullallelen verwendet haben. Man könnte spekulieren, dass es hier eine unbekannte Ursache gibt, die mit der Aktivität des Pkd2-Locus tun haben könnte. Da Grimm et al. Polycystin-2 per cDNA komplementierten, die keine Intron-Exon-Struktur aufweist, kann es auch kein alternatives Spleißen der mRNA geben, womit die Spleißvarianten als potentielle Kandidaten für die unbekannte Ursache in Frage kämen.

Bhunia et al. (2002) fanden heraus, dass die Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges durch Polycystin-1 als essentiellen Co-Faktor Polycystin-2 benötigt. Erst dann kann durch das phosphorylierte STAT1 die Induktion von p21^{waf1} erfolgen und den Zellzyklus in der G0/G1-Phase arretieren. Die Kinase-Aktivität, die STAT1 phosphoryliert, wurde als Polycystin-1/Polycystin-2 assoziierte Kinase vermutet, aber nicht identifiziert. Vielleicht gibt es einen Mechanismus, der in Abhängigkeit des quantitativen Verhältnisses von exprimiertem Polycystin-1 zu Polycystin-2 Einfluss auf die Phosphorylierung des Ser^{810/812} in Polycystin-2 nimmt. In dieser Hinsicht kämen bei den Pkd2 Nullallel Komplementation-Experimenten fehlende Eigenschaften des Pkd2-Locus in Frage, wie Transkriptionsregulation mittels Alternativtranskripte oder durch die klassischen Signaltransduktionswegen und/oder Anwesenheit anderer Polycystin-2 Isoformen, Produkte der Pkd2-Spleißvarianten. So könnte die intrazelluläre Lokalisation von Polycystin-1 und-2 in PKD2-defizienten Zellen erklärt werden. Diese Überlegungen sind allerdings hochspekulativ.

6.2 Kritische Betrachtung der Zellkulturexperimente

Das Hauptproblem, was vielen Zellkulturexperimenten anhängt, ist deren artifizielle Natur, bedingt durch die ektopische Überexpression. Die Expressionsvektoren sind in der Regel mit sehr aktiven Promotoren ausgestattet, was zur Überbelastung der Proteinverkehrswege führen und so künstlich verursachte Zustände hervorrufen kann. Die Verwendung von Fusionsproteinen könnte ein verändertes Verhalten der zu untersuchenden Proteine bewirken. Wie Unikala et al. (2001) zeigten, ist die Verwendung von EGFP-Fusionsproteinen nicht in allen Experimenten sinnvoll bzw. kann sogar falsche

Ergebnisse herbeiführen. Die hier erzielten Ergebnisse mit den Fusionsproteinen sollten deshalb in erster Linie als Tendenz interpretiert werden. Die verwendeten Zellen haben keine PKD1-bzw. PKD2-Defizienz, weshalb eine Interaktion von endogenen Proteinen mit den transient exprimierten sehr wahrscheinlich ist. Alle transient exprimierten Proteine standen unter der Kontrolle des CMV-Promotors, der explizit eine der höchsten Aktivitäten hat (Zarrin et al., 1999).

Bei den Immunopräzipitationen sieht es dagegen etwas anders aus. Aufgrund der hohen Translationsrate sollte die Interaktion von Polycystin-1 und der Polycystin-2 Δ 7-Variante eher fälschlicherweise zustande kommen. Die nicht gefundene Interaktion ist also mit aller Wahrscheinlichkeit nicht möglich.

6.3 Spleißformen der Polycystin-ähnlichen Gene und der NMD-Stoffwechselweg

Die in dieser Arbeit gefundenen Spleißvarianten sind die ersten, die für die PKD2/Pkd2-Gene entdeckt worden sind. Bei anderen Mitgliedern der Polycystin-Familie sind Spleißformen bekannt, insbesondere bei den PKD2-ähnlichen Genen. PKDL (polycystic kidney disease 2-like) ist sehr ähnlich zu PKD2 aufgebaut (s. Einleitung). Von diesem Gen wurden bisher drei Spleißformen identifiziert (Guo et al., 1999). Zum einen wurde die Deletion von Exon 5 gefunden, die das Leseraster nicht verschiebt, das Protein aber um 75 Aminosäuren verkürzen würde. Bei der zweiten Variante sind Exon 4 und 6 zur Hälfte deletiert, Exon 5 vollständig. Auch diese Deletion zerstört das Leseraster nicht, sondern verursacht eine Verkürzung des Proteins um 120 Aminosäuren. Die dritte gefundene Deletion betrifft das Exon 15 und verursacht eine Leserasterverschiebung mit vorzeitigem Stoppcodon. Im Gegensatz zu PKD2 wird PKDL streng gewebespezifisch, genau wie dessen Spleißvarianten, exprimiert.

Bei einem anderen Gen der Polycystin-2-Ähnlichen konnten auch Spleißformen identifiziert werden. PKD2L2 wird ebenfalls gewebespezifisch exprimiert (Guo et al., 2000). Auch hier konnten bisher drei Spleißformen identifiziert werden. Bei der Form PKD2L2a wird ein alternativer Spleißakzeptor in Exon 3 verwendet, was zu einer Leserasterverschiebung führt. Die Variante PKD2L2b führt durch die Deletion von Exon 2 zu einem verkürzten Protein, aber nicht zur vorzeitigen Termination der Translation. Die dritte Form PKD2L2c, in der Exon 2 und ein Teil von Exon 3 deletiert sind, verursacht wieder eine Leserasterverschiebung.

In der Regel werden mRNAs mit vorzeitigem Terminationscodon vom NMD-Stoffwechselweg (nonsense mediated RNA decay) vor dem Verlassen des Zellkerns abgebaut. Davon ausgenommen sind mRNAs, bei denen das letzte Exon deletiert ist, oder bei denen das vorzeitige Stoppcodon weniger als 55 Nukleotide vor dem letzten Exon liegt (Maquat 2004; Frischmeyer und Dietz, 1999). Die PKD2/Pkd2 Δ 6 und PKD2/Pkd2 Δ 9-Formen sollten demnach Substrate des NMD sein. Wie für die Δ 9-Variante gezeigt werden konnte, ist sie nicht in der membrangebundenen Polysomenfraktion zu finden, was darauf hinweist, dass sie nicht translatiert wird (Mechler, 1987). Auch das Vorhandensein der nicht translatierten Spleißformen als Transkript voller Länge scheint nicht ungewöhnlich zu sein. Eines durch den NMD als „falsch“ erkanntes Transkript wird von beiden Seiten abgebaut. Sowohl die CAP-Funktion am 5'-Ende, wie auch die Polyadenylierung am 3'-Ende werden zunächst entfernt und die RNA anschließend sowohl in 5'-3' als auch in umgekehrter Richtung abgebaut wird (Maquat, 2004).

Die PKD2 Δ 9-Variante ließ sich in allen Geweben einer humanen fötalen cDNA-Bank nachweisen (Daten nicht gezeigt). Ob diese Form womöglich eine Funktion innerhalb des Zellkerns erfüllt oder ob sie nur aufgrund einer strukturellen Eigenschaft des PKD2-Transkripts besonders häufig gebildet wird, bleibt eine vorerst unbeantwortete Frage. Hirotsune et al. (2003) konnten zeigen, dass die Abwesenheit eines Pseudogens in einer manipulierten Mauslinie zur Instabilität des normalen Transkripts führten. Sie vermuten eine regulatorische Funktion der nicht codierenden RNAs. Obwohl es sich bei den Δ 6- und Δ 9-Spleißvarianten nicht um Pseudogene handelt, könnten sie eine regulatorische Rolle im Zellkern übernehmen.

Was die Spleißvarianten der Polycystin-2-Ähnlichen gemeinsam haben, ist dass alle Varianten verkürzte Formen des normalen Transkripts darstellen. Für andere Formen des alternativen Spleißens (Ladd und Cooper, 2002), wie alternative terminale Exons, alternative(s) Promotoren/ Exon 1 oder die Integration eines Abschnitts (Exon-Cassette), gibt es bisher keine Hinweise.

6.4 Funktionelle Relevanz von PKD2 Δ 7/Pkd2 Δ 7 und PKD2 Δ 12-13/Pkd2 Δ 12-13

Über die funktionelle Relevanz der Polycystin-2 Δ 7-Variante können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Fest steht, dass sie nicht über die bekannte

Wechselwirkung der „coiled-coil“-Domänen mit Polycystin-1 interagiert. Für Polycystin-2 wurden eigenständige Funktionen als ciliärer, flussinduzierter Sensor (McGrath et al., 2003) und als kalziumpermeabler Ionenkanal in der Plasmamembran gefunden (Luo et al., 2003). Intrazellulär kann es einen Ionenkanal bilden, der Kalzium freisetzt (Koulen et al., 2002). Ähnliche Funktionen könnten auch für die $\Delta 7$ -Variante vorstellbar sein. Der quantitative Verlust einer Transmembrandomäne hat eine topologische Veränderung zwingend zur Folge. Im Gegensatz zum normalen Polycystin-2 befinden sich C- und N-Terminus auf unterschiedlichen Seiten einer Membran. Daraus könnten sich potentielle Interaktionen mit extrazellulären Proteinen oder Proteindomänen ergeben, aber auch intrazellulär wären andere Interaktionen möglich. Von einem veränderten C-Terminus wäre auch der hydrophobe Teil im letzten extrazellulären bzw. nicht-cytoplasmatischen Bogen von Polycystin-2 betroffen, der putativ als porenbildend bei der Kanalfunktion angesehen wird (Sandford et al., 1999). Spekulativ könnte Polycystin-2 $\Delta 7$ also einen Kationenkanal mit entgegengesetzter Durchlässigkeit zu Polycystin-2 bilden.

Betrachtet man die Verteilung der Variante in den Geweben, so fällt die hohe Expression im Gehirn auf. Das Nervensystem hat allgemein die höchste Expression an Spleißvarianten (Grabowski und Black, 2001). Ob die Variante nun in Nervenzellen vorkommt oder mit den zerebralen Blutgefäßen assoziiert ist, bleibt offen. Es gibt jedoch einen Zusammenhang von intracranialen Aneurismen und Mutationen im PKD2-Gen (van Dijk et al., 1995).

Die Untersuchung der $\Delta 7$ -Variante auf Proteinebene wird dadurch erschwert, dass es nicht möglich ist, spezifische Antikörper gegen das neu gebildete Epitop zu richten. Dieses ist sehr hydrophob und weist kaum Antigenizität auf. Zudem liegen die isoelektrischen Punkte von Polycystin-2 und $-\Delta 7$ sehr dicht beisammen (5,51 und 5,47 bei der Maus, 5,53 und 5,49 beim Menschen) und die Variante liegt nur zu einem Bruchteil des Hauptprodukts vor.

Eine nicht so häufige Variante ist die mit einer Deletion von Exon 12/13. Das Leseraster wird durch diese Deletion nicht beeinträchtigt. Auch eine veränderte Membrantopologie ist nicht zu erwarten. Allerdings würden diesem Protein das „ER retention“-Signal, die „coiled-coil“-Domäne und das EF-Hand-Motiv, dem kalziumbindende Eigenschaften zugesprochen werden, fehlen. Demnach sollte das Protein nur in der Zellmembran zu finden sein, da das entscheidende Ser^{810/812} (murin/ human) nicht vorhanden und folglich die Sortierung über PACS-1 und -2 nicht möglich wäre. Außerdem würden bei dieser Form

die bekannten Interaktionen mit Polycystin-1 und PIGEA-14 nicht möglich sein. Der Verlust des EF-Hand-Motivs könnte zum Verlust der Kanalaktivität führen, wie Chen et al. (2001) vermuten.

7 Literaturverzeichnis

Aguiari G, Manzati E, Penolazzi L, Micheletti F, Augello G, Vitali ED, Cappelli G, Cai Y, Reynolds D, Somlo S, Piva R, del Senno L.: Mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease 2 gene: Reduced expression of PKD2 protein in lymphoblastoid cells. *Am J Kidney Dis.* 1999 May;33(5):880-5.

Aguiari G, Campanella M, Manzati E, Pinton P, Banzi M, Moretti S, Piva R, Rizzuto R, del Senno L.: Expression of polycystin-1 C-terminal fragment enhances the ATP-induced Ca²⁺ release in human kidney cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Feb 14;301(3):657-64.

Aguiari G, Piva R, Manzati E, Mazzoni E, Augello G, Chiari E, Moretti S, Neri LM, del Senno L.: K562 erythroid and HL60 macrophage differentiation downregulates polycystin, a large membrane-associated protein. *Exp Cell Res.* 1998 Oct 10;244(1):259-67.

Babich V, Zeng WZ, Yeh BI, Ibraghimov-Beskrovnya O, Cai Y, Somlo S, Huang CL.: The N-terminal extracellular domain is required for polycystin-1-dependent channel activity. *J Biol Chem.* 2004 Jun 11;279(24):25582-9. Epub 2004 Apr 1.

Barr MM, DeModena J, Braun D, Nguyen CQ, Hall DH, Sternberg PW.: The *Caenorhabditis elegans* autosomal dominant polycystic kidney disease gene homologs *lov-1* and *pkd-2* act in the same pathway. *Curr Biol.* 2001 Sep 4;11(17):1341-6.

Barr MM, Sternberg PW.: A polycystic kidney-disease gene homologue required for male mating behaviour in *C. elegans*. *Nature.* 1999 Sep 23;401(6751):386-9.

Basu J, Stromberg G, Compitello G, Willard HF, Van Bokkelen G.: Rapid creation of BAC-based human artificial chromosome vectors by transposition with synthetic alpha-satellite arrays. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 26;33(2):587-96. Print 2005.

Beard C, Li E, Jaenisch R.: Loss of methylation activates Xist in somatic but not in embryonic cells. *Genes Dev.* 1995 Oct 1;9(19):2325-34.

Bell PE, Hossack KF, Gabow PA, Durr JA, Johnson AM, Schrier RW: Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1988;34:683-690.

Bhunja AK, Pointek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG: PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 2002;109:157-168.

Blom N., Gammeltoft, S., and Brunak, S.: Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites *Journal of Molecular Biology*: 294(5): 1351-1362, 1999.

Bogdanova N, Dworniczak B, Dragova D *et al*: Genetic heterogeneity of polycystic kidney disease in Bulgaria. *Hum Genet* 95:645-650, 1995

Bogdanova N, Markoff A, Dworniczak B, McCluskey M, Gerke V, Horst J: Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 2001;74:333-341.

Bogdanova N, Markoff A, Gerke V *et al*: Homologues to the first gene for autosomal dominant polycystic kidney disease are pseudogenes. *Genomics* 74:333-341, 2001

Bogdanova N, Markoff A, Horst J.. Autosomal dominant polycystic kidney disease - clinical and genetic aspects. *Kidney Blood Press Res.* 2002;25(5):265-83. Review.

Bogdanova N, McCluskey M, Sikmann K, Markoff A, Todorov V, Dimitrakov D, Schiavello T, Thomas M, Kalaydjieva L, Dworniczak B, Horst J: Screening the 3' region of the polycystic kidney disease 1 gene in 41 Bulgarian and Australian kindreds reveals a prevalence of protein truncating mutations. *Hum Mutat* 2000;16:166-174.

Bogdanova N, Schempp W, Markoff A, Dworniczak B, Horst J, , EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 10: 168-169 Suppl. 1, MAY 2002.

Boulter C, Mulroy S, Webb S, Fleming S, Brindle K, Sandford R.: Cardiovascular, skeletal, and renal defects in mice with a targeted disruption of the Pkd1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Oct 9;98(21):12174-9. Epub 2001 Oct 2.

Bukanov N, Husson H, Dackowski WR, Lawrence BD, Clow PA, Roberts BL, Klinger KW, Ibraghimov-Beskrovnaya O.: Functional polycystin-1 expression is developmentally regulated during epithelial morphogenesis in vitro: downregulation and loss of membrane localization during cystogenesis. Hum Mol Genet. 2002 Apr 15;11(8):923-36.

Bycroft M, Bateman A, Clarke J, Hamill SJ, Sandford R, Thomas RL, Chothia C.: The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. EMBO J. 1999 Jan 15;18(2):297-305.

Cai Y, Anyatonwu G, Okuhara D, Lee KB, Yu Z, Onoe T, Mei CL, Qian Q, Geng L, Witzgall R, Ehrlich BE, Somlo S.: Calcium dependence of polycystin-2 channel activity is modulated by phosphorylation at Ser812. J Biol Chem. 2004 May 7;279(19):19987-95. Epub 2004 Jan 22.

Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, Torres VE, Wu G, Hayashi T, Mochizuki T, Park JH, Witzgall R, Somlo S.: Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product. J Biol Chem. 1999 Oct 1;274(40):28557-65.

Calvet JP.: New insights into ciliary function: kidney cysts and photoreceptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5583-5. Epub 2003 May 5. .

Calvet JP: Polycystic kidney disease: Primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? Kidney Int 1993;43:101-108.

Carone FA, Jin H, Nakamura S, Kanwar YS: Decreased synthesis and delayed processing of sulfated glycoproteins by cells from human polycystic kidneys. Lab Invest 1993;68:413-418.

Chapman AB, Rubinstein D, Hughes R, Stears JC, Earnest MP, Johnson AM, Gabow PA, Kaehny WD: Intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1992;327:916-920.

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):1433-43. Erratum in: *J Clin Invest.* 2005 Mar;115(3):788. Hiesberger, Thomas [corrected to Hiesberger, Thomas].

Chen XZ, Segal Y, Basora N, Guo L, Peng JB, Babakhanlou H, Vassilev PM, Brown EM, Hediger MA, Zhou J.: Transport function of the naturally occurring pathogenic polycystin-2 mutant,R742X. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Apr 20;282(5):1251-6.

Chen XZ, Vassilev PM, Basora N *et al*: Polycystin-L is a calcium-regulated cation channel permeable to calcium ions. *Nature* 401:383-386, 1999

Chevalier-Mariette C, Henry I, Montfort L, Capgras S, Forlani S, Muschler J, Nicolas JF.: CpG content affects gene silencing in mice: evidence from novel transgenes. *Genome Biol.* 2003;4(9):R53. Epub 2003 Aug 14.

Chuang LS, Iannelli J, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF.: Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):1996-2000.

Cogswell C, Price SJ, Hou X, Guay-Woodford LM, Flaherty L, Bryda EC.: Positional cloning of jcpk/bpk locus of the mouse. *Mamm Genome.* 2003 Apr;14(4):242-9.

Cohen-Kupiec R, Broglie KE, Friesem D, Broglie RM, Chet I.: Molecular characterization of a novel beta-1,3-exoglucanase related to mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. *Gene.* 1999 Jan 21;226(2):147-54.

Cowley BD, Gudapaty S, Kraybill AL, Barash BD, Harding MA, Calvet P, Gattone VH: Autosomal-dominant polycystic kidney disease in the rat. *Kidney Int* 1993;43:522-534.

Cserzo M, Wallin E, Simon I, von Heijne G, Elofsson A.: Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method.

Daoust MC, Reynolds DM, Bichet DG, Somlo S: Evidence for a third genetic locus for autosomal dominant polycystic kidney disease. *Genomics* 25:733-736, 1995

de Almeida S, de Almeida E, Peters D *et al*: Autosomal dominant polycystic kidney disease: evidence for the existence of a third locus in a Portuguese family. *Hum Genet* 96:83-88, 1995

Delmas P.: The gating of polycystin signaling complex. *Biol Res.* 2004;37(4):681-91.

Delmas P.: Polycystins: from mechanosensation to gene regulation. *Cell.* 2004 Jul 23;118(2):145-8. Review.

Delmas P, Nomura H, Li X, Lakkis M, Luo Y, Segal Y, Fernandez-Fernandez JM, Harris P, Frischauf AM, Brown DA, Zhou J.: Constitutive activation of G-proteins by polycystin-1 is antagonized by polycystin-2. *J Biol Chem.* 2002 Mar 29;277(13):11276-83. Epub 2002 Jan 10.

Delmas P, Padilla F, Osorio N, Coste B, Raoux M, Crest M.: Polycystins, calcium signaling, and human diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 1;322(4):1374-83. Review.

Drickamer K, Taylor ME.: Biology of animal lectins. *Annu Rev Cell Biol.* 1993;9:237-64. Review. .

Ehara T, Carone FA, McCarthy KJ, Couchman JR: Basement membrane chondroitin sulfate proteoglycan alterations in a rat model of polycystic kidney disease. *Am J Pathol* 1994;144:612-621.

Fain PR, McFann KK, Taylor MR, Tison M, Johnson AM, Reed B, Schrier RW.: Modifier genes play a significant role in the phenotypic expression of PKD1. *Kidney Int.* 2005 Apr;67(4):1256-67.

Foggensteiner L, Bevan AP, Thomas R, Coleman N, Boulter C, Bradley J, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Sandford R.: Cellular and subcellular distribution of polycystin-2, the protein product of the PKD2 gene. *J Am Soc Nephrol.* 2000 May;11(5):814-27.

Frischmeyer PA, Dietz HC.: Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet.* 1999;8(10):1893-900. Review.

Gabius HJ.: Animal lectins. *Eur J Biochem.* 1997 Feb 1;243(3):543-76. Review.

Gabow PA, Johnson AM, Kaeny WD, Kimberling WJ, Lezotte DC, Duley IT, Jones RH: Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1992;41:1311-1319.

Gabow PA: Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 1993;329:332-342.

Gallagher AR, Cedzich A, Gretz N, Somlo S, Witzgall R.: The polycystic kidney disease protein PKD2 interacts with Hax-1, a protein associated with the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Apr 11;97(8):4017-22.

Geng L, Burrow CR, Li HP, Wilson PD.: Modification of the composition of polycystin-1 multiprotein complexes by calcium and tyrosine phosphorylation. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Dec 15;1535(1):21-35.

Germino GG.: Autosomal dominant polycystic kidney disease: a two-hit model. *Hosp Pract (Off Ed).* 1997 Mar 15;32(3):81-2, 85-8, 91-2 passim.

Grabowski PJ, Black DL.: Alternative RNA splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 2001 Oct;65(3):289-308.

Grantham JJ, Wallace DP.: Return of the secretory kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Jan;282(1):F1-9. Review.

Gregoire JR, Torres VE, Holley KE, Farrow GM: Renal epithelial hyperplastic and neoplastic proliferation in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1987;9:27-38.

Gretz N, Zeier M, Geberth S, Strauch M, Ritz E: Is gender a determinant for evolution of renal failure? A study in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1989;14:178-183.

Griffin MD, O'Sullivan DA, Torres VE, Grande JP, Kanwar YS, Kumar R.: Expression of polycystin in mouse metanephros and extra-metanephric tissues. *Kidney Int.* 1997 Nov;52(5):1196-205.

Griffin MD, Torres VE, Grande JP, Kumar R.: Immunolocalization of polycystin in human tissues and cultured cells. *Proc Assoc Am Physicians.* 1996 May;108(3):185-97.

Griffin MD, Torres VE, Grande JP, Kumar R.: Vascular expression of polycystin. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Apr;8(4):616-26.

Grimm DH, Cai Y, Chauvet V, Rajendran V, Zeltner R, Geng L, Avner ED, Sweeney W, Somlo S, Caplan MJ.: Polycystin-1 distribution is modulated by polycystin-2 expression in mammalian cells. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36786-93. Epub 2003 Jul 2.

Guay-Woodford LM, Green WJ, Lindsey JR, Beier DR. Germline and somatic loss of function of the mouse *cpk* gene causes biliary ductal pathology that is genetically modulated. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 769–778

Guay-Woodford LM.: Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Dec;285(6):F1034-49. Review.

Guay-Woodford LM.: RIP-ed and ready to dance: new mechanisms for polycystin-1 signaling. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1404-6.

Guillaume R, Trudel M: Distinct and common developmental expression patterns of the murine Pkd2 and Pkd1 genes. *Mech Dev* 93:179-83, 2000

Guo L, Chen M, Basora N, Zhou J.: The human polycystic kidney disease 2-like (PKDL) gene: exon/intron structure and evidence for a novel splicing mechanism. *Mamm Genome.* 2000 Jan;11(1):46-50.

Guo L, Schreiber TH, Weremowicz S, Morton CC, Lee C, Zhou J.. Identification and characterization of a novel polycystin family member, polycystin-L2, in mouse and human: sequence, expression, alternative splicing, and chromosomal localization. *Genomics.* 2000 Mar 15;64(3):241-51.

Guy LG, Kothary R, Wall L.: Position effects in mice carrying a lacZ transgene in cis with the beta-globin LCR can be explained by a graded model. *Nucleic Acids Res.* 1997 Nov 1;25(21):4400-7.

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

Harris PC, Thomas S, MacCarthy AB, Stallings RL, Breuning MH, Jenne DE, Fink TM, Buckle VJ, Ratcliffe PJ, Ward CJ: A large duplicated area in the polycystic kidney disease 1 region of chromosome 16 is prone to rearrangement. *Genomics* 1994;23:321-330.

Harris RA, Gray DW, Britton BJ, Toogood GJ, Morris PJ: Hepatic cystic disease in an adult polycystic kidney disease transplant population. *Aust NZ J Surg* 1996;66:166-168.

Hateboer N, van Dijk MA, Bogdanova N, Coto E, Saggari-Malik AK, San Millan JL, Torra R, Breuning M, Ravine D: Comparison of phenotypes of polycystic kidney disease types 1 and 2. *Lancet* 1999;353:103-107.

Hateboer N, Veldhuisen B, Peters D, Breuning MH, San-Millan JL, Bogdanova N, Coto E, van Dijk MA, Afzal AR, Jeffery S, Saggarr-Malik AK, Torra R, Dimitrakov D, Martinez I, de Castro SS, Krawczak M, Ravine D: Location of mutations within the PKD2 gene influences clinical outcome. *Kidney Int* 2000;57:1444-1451.

Hayashi T, Mochizuki T, Reynolds DM, Wu G, Cai Y, Somlo S.: Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2). *Genomics*. 1997 Aug 15;44(1):131-6.

Hertz JM, Schell G, Doerfler W.: Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):24232-40.

Hirotsune S, Yoshida N, Chen A, Garrett L, Sugiyama F, Takahashi S, Yagami K, Wynshaw-Boris A, Yoshiki A.: An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature*. 2003 May 1;423(6935):91-6.

Holliday R.: The inheritance of epigenetic defects. *Science*. 1987 Oct 9;238(4824):163-70. Review.

Hou X, Mrug M, Yoder BK *et al.* Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2002; 109: 533–540

Hu J, Barr MM.: ATP-2 interacts with the PLAT domain of LOV-1 and is involved in *Caenorhabditis elegans* polycystin signaling. *Mol Biol Cell*. 2005 Feb;16(2):458-69. Epub 2004 Nov 24.

Huan Y, van Adelsberg J: Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* 1999;104:1459-1468.

Hughes J, Ward CJ, Peral B, Aspinwall R, Clark K, San Millan JL, Gamble V, Harris PC: The polycystic kidney disease 1 gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains. *Nat Genet* 1995;10:151-159.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Bukanov NO, Donohue LC, Dackowski WR, Klinger KW, Landes GM: Strong homophilic interactions of the Ig-like domains of polycystin-1, the protein product of an autosomal dominant polycystic kidney disease gene, PKD1. *Hum Mol Genet* 2000;9:1641-1649.

Ibraghimov-Beskrovnaya O, Dackowski WR, Foggensteiner L, Coleman N, Thiru S, Petry LR, Burn TC, Connors TD, Van Raay T, Bradley J, Qian F, Onuchic LF, Watnick TJ, Piontek K, Hakim RM, Landes GM, Germino GG, Sandford R, Klinger KW.: Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 10;94(12):6397-402.

Igarashi P, Somlo S.: Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Sep;13(9):2384-98. Review. .

Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE: Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106:607-617, 2001

Jahner D, Jaenisch R.: Chromosomal position and specific demethylation in enhancer sequences of germ line-transmitted retroviral genomes during mouse development. *Mol Cell Biol.* 1985 Sep;5(9):2212-20.

Jurczyk A, Gromley A, Redick S, San Agustin J, Witman G, Pazour GJ, Peters DJ, Doxsey S.: Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol.* 2004 Aug 30;166(5):637-43.

Kim E, Arnould T, Sellin L, Benzing T, Comella N, Kocher O, Tsiokas L, Sukhatme VP, Walz G: Interaction between RGS7 and polycystin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6371-6376.

Kim E, Arnould T, Sellin LK, Benzing T, Fan MJ, Gruning W, Sokol SY, Drummond I, Walz G: The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* 1999;274:4947-4953.

Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Arnaout MA: Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1731-1736.

Klingel R, Dippold W, Storkel S, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H: Expression of differentiation antigens and growth-related genes in normal kidney, autosomal dominant polycystic kidney disease, and renal cell carcinoma. *Am J Kidney Dis* 1992;19:22-30.

Klingel R, Ramadori G, Schuppan D, Knittel T, Meyer zum Buschenfelde KH, Kohler H: Coexpression of extracellular matrix glycoproteins undulin and tenascin in human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nephron* 1993;65:111-118.

Kobe B, Deisenhofer J: A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 1995;374:183-186.

Kobe B, Deisenhofer J: The leucine-rich repeat: A versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 1994;19:415-421.

Kobe B, Kajava AV. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol.* 2001 Dec;11(6):725-32. Review.

Kottgen M, Benzing T, Simmen T, Tauber R, Buchholz B, Feliciangeli S, Huber TB, Schermer B, Kramer-Zucker A, Hopker K, Simmen KC, Tschucke CC, Sandford R, Kim E, Thomas G, Walz G.: Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J.* 2005 Feb 23;24(4):705-16. Epub 2005 Feb 3.

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.

Krieger M, Herz J: Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein. *Annu Rev Biochem* 1994;63:601-637.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL.: Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol*. 2001 Jan 19;305(3):567-80.

Ladd AN, Cooper TA.: Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol*. 2002 Oct 23;3(11):reviews0008. Epub 2002 Oct 23. Review.

Lager DJ, Qian Q, Bengal RJ, Ishibashi M, Torres VE. The pck rat: a new model that resembles human autosomal dominant polycystic kidney and liver disease. *Kidney Int* 2001; 59: 126–136

Laird PW.: Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol Med Today*. 1997 May;3(5):223-9. Review.

Lanoix J, D'Agati V, Szabolcs M, Trudel M: Dysregulation of cellular proliferation and apoptosis mediates human autosomal dominant polycystic kidney disease. *Oncogene* 1996;13:1153-1160.

Lehtonen S, Ora A, Olkkonen VM, Geng L, Zerial M, Somlo S, Lehtonen E.: In vivo interaction of the adapter protein CD2-associated protein with the type2 polycystic kidney disease protein, polycystin-2. *J Biol Chem*. 2000 Oct 20;275(42):32888-93.

Li A, Tian X, Sung SW, Somlo S.: Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics*. 2003 Jun;81(6):596-608. Erratum in: *Genomics*. 2003 Oct;82(4):498-500.

Li E, Beard C, Jaenisch R.: Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993 Nov 25;366(6453):362-5.

Li E, Bestor TH, Jaenisch R.: Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992 Jun 12;69(6):915-26.

Li Q, Dai Y, Guo L, Liu Y, Hao C, Wu G, Basora N, Michalak M, Chen XZ.: Polycystin-2 associates with tropomyosin-1, an actin microfilament component. *J Mol Biol*. 2003 Jan 31;325(5):949-62.

Li Q, Shen PY, Wu G, Chen XZ.: Polycystin-2 interacts with troponin I, an angiogenesis inhibitor. *Biochemistry*. 2003 Jan 21;42(2):450-7.

Liu S, Lu W, Obara T *et al*. A defect in a novel Nek-family kinase causes cystic kidney disease in the mouse and in zebrafish. *Development* 2002; 129: 5839–5846

Lodder AL, Lee TK, Ballester R.: Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1999 Aug;152(4):1487-99.

Lohning C, Nowicka U, Frischauf AM.: The mouse homolog of PKD1: sequence analysis and alternative splicing. *Mamm Genome*. 1997 May;8(5):307-11.

Lu W, Fan X, Basora N, Babakhanlou H, Law T, Rifai N, Harris PC, Perez-Atayde AR, Rennke HG, Zhou J: Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes. *Nat Genet* 1999;21:160-161.

Lu W, Peissel B, Babakhanlou H, Pavlova A, Geng L, Fan X, Larson C, Brent G, Zhou J: Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation. *Nat Genet* 1997;17:179-181.

Luo Y, Vassilev PM, Li X *et al*: Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol* 23:2600-2607, 2003

Luo Y, Vassilev PM, Li X, Kawanabe Y, Zhou J.: Native polycystin 2 functions as a plasma membrane Ca^{2+} -permeable cation channel in renal epithelia. *Mol Cell Biol*. 2003 Apr;23(7):2600-7.

Malhas AN, Abuknesha RA, Price RG.: Polycystin-1: immunoaffinity isolation and characterisation by mass spectrometry. *FEBS Lett.* 2001 Sep 14;505(2):313-6.

Maquat LE: Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:89-99, 2004

Markowitz GS, Cai Y, Li L, Wu G, Ward LC, Somlo S, D'Agati VD.: Polycystin-2 expression is developmentally regulated. *Am J Physiol.* 1999 Jul;277(1 Pt 2):F17-25.

Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JFE, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P: Effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 1996;334:939-945.

Matzke MA, Mette MF, Matzke AJ.: Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol.* 2000 Jun;43(2-3):401-15. Review.

McGrath J, Somlo S, Makova S *et al*: Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell* 114:61-73, 2003

Mechler, BM: Isolation of messenger RNA from membrane-bound polysomes. *Methods Enzymol* 152: 241-248, 1987

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 plasmamembrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney Int.* 2004 Oct;66(4):1345-55.

Mengerink KJ, Moy GW, Vacquier VD.: suREJ3, a polycystin-1 protein, is cleaved at the GPS domain and localizes to the acrosomal region of sea urchin sperm. *J Biol Chem.* 2002 Jan 11;277(2):943-8. Epub 2001 Nov 5.

Mochizuki T, Wu G, Hayashi T *et al*: PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 272:1339-1342, 1996

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;272:1339-1342.

Montell C: Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*:RE1, 2001

Moy GW, Mendoza LM, Schulz JR, Swanson WJ, Glabe CG, Vacquier VD.: The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J Cell Biol.* 1996 May;133(4):809-17.

Moyer JH, Lee-Tischler MJ, Kwon HY *et al.* Candidate gene associated with a mutation causing recessive polycystic kidney disease in mice. *Science* 1994; 264: 1329–1333

Nadasty T, Lasizik Z, Lajoie G, Blick KE, Wheeler DE, Silva FG: Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1462-1468.

Nakai K, Horton P.: PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* 1999 Jan;24(1):34-6

Nakayama S, Kretsinger RH: Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1994;23:473-507.

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, *et al.*: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33:129-137, 2003

Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J.: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 2003 Feb;33(2):129-37. Epub 2003 Jan 6.

Nauta J, Goedbloed MA, Luider TM, Hoogeveen AT, van den Ouweland AM, Halley DJ.: The Han:SPRD rat is not a genetic model of human autosomal dominant polycystic kidney disease type 1. *Lab Anim.* 1997 Jul;31(3):241-7.

Nauta J, Goedbloed MA, van den Ouweland AM, Nellist M, Hoogeveen AT.: Immunological detection of polycystin-1 in human kidney. *Histochem Cell Biol.* 2000 Apr;113(4):303-11.

Nauta J, Ozawa Y, Sweeney WE Jr, Rutledge JC, Avner ED.: Renal and biliary abnormalities in a new murine model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 1993 Apr;7(2):163-72.

Nauta J, Sweeney WE, Rutledge JC, Avner ED.: Biliary epithelial cells from mice with congenital polycystic kidney disease are hyperresponsive to epidermal growth factor. *Pediatr Res.* 1995 Jun;37(6):755-63.

Neumann B, Barlow DP.: Multiple roles for DNA methylation in gametic imprinting. *Curr Opin Genet Dev.* 1996 Apr;6(2):159-63. Review.

Nomura H, Turco AE, Pei Y *et al*: Identification of PKDL, a novel polycystic kidney disease 2-like gene whose murine homologue is deleted in mice with kidney and retinal defects. *J Biol Chem* 273:25967-25973, 1998

Obermuller N, Cai Y, Kranzlin B, Thomson RB, Gretz N, Kriz W, Somlo S, Witzgall R.: Altered expression pattern of polycystin-2 in acute and chronic renal tubular diseases. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jul;13(7):1855-64.

Ogborn MR, Sareen S.: Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor expression in experimental murine polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 1996 Apr;10(2):181-4.

Olbrich H, Fliegau M, Hoefele J *et al*. Mutations in a novel gene, *NPHP3*, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* 2003; 34: 455–459

Ozawa Y, Nauta J, Sweeney WE, Avner ED.: A new murine model of autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nippon Jinzo Gakkai Shi.* 1993 Apr;35(4):349-54.

Park JH, Li L, Cai Y, Hayashi T, Dong F, Maeda Y, Rubin C, Somlo S, Wu G.: Cloning and characterization of the murine *pkd2* promoter. *Genomics.* 2000 Jun 15;66(3):305-12.

Parnell SC, Magenheimer BS, Maser RL, Rankin CA, Smine A, Okamoto T, Calvet JP: The polycystic kidney disease-1 protein, polycystin-1, binds and activates heterotrimeric G-proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:625-631.

Pennekamp P, Bogdanova N, Wilda M *et al*: Characterization of the murine polycystic kidney disease (*Pkd2*) gene. *Mamm Genome* 9:749-752, 1998

Pennekamp P, Karcher C, Fischer A, Schweickert A, Skryabin B, Horst J, Blum M, Dworniczak B: The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol* 2002;12:938-943.

Ponting CP, Hofmann K, Bork P.: A latrophilin/CL-1-like GPS domain in polycystin-1. *Curr Biol.* 1999 Aug 26;9(16):R585-8.

Qian F, Boletta A, Bhunia A *et al*: Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16981-16986, 2002

Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG.

Qian F, Germino FJ, Cai Y *et al*: PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 16:179-183, 1997

Qian F, Germino FJ, Cai Y, Zhang X, Somlo S, Germino GG: PKD1 interacts with PKD2 through a probable coiled-coil domain. *Nat Genet* 1997;16:179-183.

Qian Q, Li M, Cai Y, Ward CJ, Somlo S, Harris PC, Torres VE.: Analysis of the polycystins in aortic vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Sep;14(9):2280-7.

Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG.: The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell*. 1996 Dec 13;87(6):979-87.

Qin H, Rosenbaum JL, Barr MM.: An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons. *Curr Biol*. 2001 Mar 20;11(6):457-61.

Ramchandani S, MacLeod AR, Pinard M, von Hofe E, Szyf M.: Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, antisense oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):684-9.

Reynolds DM, Hayashi T, Cai Y, Veldhuisen B, Watnick TJ, Lens XM, Mochizuki T, Qian F, Maeda Y, Li L, Fossdal R, Coto E, Wu G, Breuning MH, Germino GG, Peters DJ, Somlo S.: Aberrant splicing in the PKD2 gene as a cause of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 1999 Nov;10(11):2342-51.

Roitbak T, Ward CJ, Harris PC, Bacallao R, Ness SA, Wandinger-Ness A.: A polycystin-1 multiprotein complex is disrupted in polycystic kidney disease cells. *Mol Biol Cell*. 2004 Mar;15(3):1334-46. Epub 2004 Jan 12.

Rost B: PHD: predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. *Methods Enzymol* 266:525-539, 1996

Ryan MJ, Sigmund CD.: HPRT targeting: "Ets" a powerful tool for investigating endothelial-cellspecific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Nov 1;23(11):1960-2.

Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sandford R, Mulroy S, Foggensteiner L.: The polycystins: a novel class of membrane-associated proteins involved in renal cystic disease. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Nov 15;56(7-8):567-79.

Sandford R, Sgotto B, Aparicio S, Brenner S, Vaudin M, Wilson RK, Chissoe S, Pepin K, Bateman A, Chothia C, Hughes J, Harris P.: Comparative analysis of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene reveals an integral membrane glycoprotein with multiple evolutionary conserved domains. *Hum Mol Genet.* 1997 Sep;6(9):1483-9.

Scrabble H, Stambrook PJ.: Activation of the lac repressor in the transgenic mouse. *Genetics.* 1997 Sep;147(1):297-304.

Somlo S, Ehrlich B.: Human disease: calcium signaling in polycystic kidney disease. *Curr Biol.* 2001 May 1;11(9):R356-60. Review.

Somlo S, Markowitz GS.: The pathogenesis of autosomal dominant polycystic kidney disease: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000 Jul;9(4):385-94. Review.

Somlo S.: The PKD2 gene: structure, interactions, mutations, and inactivation. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1999;29:257-75. Review.

Stacey M, Lin HH, Gordon S, McKnight AJ.: LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors. *Trends Biochem Sci.* 2000 Jun;25(6):284-9. Review.

Streets AJ, Newby LJ, O'Hare MJ, Bukanov NO, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ong AC.: Functional analysis of PKD1 transgenic lines reveals a direct role for polycystin-1 in mediating cell-cell adhesion. *J Am Soc Nephrol.* 2003 Jul;14(7):1804-15.

Sullivan LP, Wallace DP, Grantham JJ.: Chloride and fluid secretion in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 1998 May;9(5):903-16. Review.

Sullivan LP, Wallace DP, Grantham JJ.: Epithelial transport in polycystic kidney disease.

Takahashi H, Calvet JP, Dittmore-Hoover D, Yoshida K, Grantham JJ, Gattone VH 2nd. A hereditary model of slowly progressive polycystic kidney disease in the mouse. *J Am Soc Nephrol* 1991; 1: 980–989

The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium): Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. *Hum Mol Genet* 1995;4:575-582.

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

The International Polycystic Kidney Disease Consortium: Polycystic kidney disease: The complete structure of the PKD1 gene and its protein. *Cell* 1995;81:289-298.

Torres VE, Cai Y, Chen X, Wu GQ, Geng L, Cleghorn KA, Johnson CM, Somlo S.: Vascular expression of polycystin-2. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Jan;12(1):1-9.

Tsiokas L, Kim E, Arnould T *et al*: Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6965-6970, 1997

Tsiokas L, Kim E, Arnould T, Sukhatme VP, Walz G: Homo- and heterodimeric interactions between the gene products of PKD1 and PKD2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6965-6970.

Upadhyaya P, Birkenmeier EH, Birkenmeier CS, Barker JE. Mutations in a NIMA-related kinase gene, *Nek1*, cause pleiotropic effects including a progressive polycystic kidney disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 217–221

Van Adelsberg J, Chamberlain S, D'Agati V: Polycystin expression is temporally and spatially regulated during renal development. *Am J Physiol* 1997;272:F602-F609.

van Dijk MA, Chang PC, Peters DJ, Breuning MH. Intracranial aneurysms in polycystic kidney disease linked to chromosome 4. *J Am Soc Nephrol* 6:1670-1673, 1995

Vandorpe DH, Chernova MN, Jiang L, Sellin LK, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Walz G, Alper SL: The cytoplasmic carboxy-terminal fragment of polycystin-1 (PKD1) regulates a Ca^{2+} -permeable cation channel. *Biol Chem* 2000;45:263-265.

Vandorpe DH, Wilhelm S, Jiang L, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Chernova MN, Stuart-Tilley AK, Alper SL.: Cation channel regulation by COOH-terminal cytoplasmic tail of polycystin-1: mutational and functional analysis. *Physiol Genomics*. 2002 Feb 28;8(2):87-98.

Vassilev PM, Guo L, Chen XZ, Segal Y, Peng JB, Basora N, Babakhanlou H, Cruger G, Kanazirska M, Ye Cp, Brown EM, Hediger MA, Zhou J: Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular $\text{Ca}(2+)$ homeostasis in polycystic kidney disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:341-350.

Veldhuisen B, Spruit L, Dauwerse HG *et al*: Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2) *Eur J Hum Genet* 7:860-872, 1999

Volk T, Schwoerer AP, Thiessen S *et al*: A polycystin-2-like large conductance cation channel in rat left ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 58:76-88, 2003

Wang G, Seidman MM, Glazer PM: Mutagenesis in mammalian cells induced by triple helix formation and transcription-coupled repair. *Science* 271:802, 1996

Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S *et al*. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nature Genet* 2002; 30: 259–269

Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Hefferton D, St George-Hyslop P, Germino G, Pei Y.: Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):143-4.

Weston BS, Bagneris C, Price RG, Stirling JL.: The polycystin-1 C-type lectin domain binds carbohydrate in a calcium-dependent manner, and interacts with extracellular matrix proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2001 May 31;1536(2-3):161-76.

Weston BS, Malhas AN, Price RG.. Structure-function relationships of the extracellular domain of the autosomal dominant polycystic kidney disease-associated protein, polycystin-1. *FEBS Lett*. 2003 Mar 13;538(1-3):8-13. Review.

Williams ME, Brust PF, Feldman DH, Patthi S, Simerson S, Maroufi A, McCue AF, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM: Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 1992;257:389-395.

Wilson PD.: Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Oct;36(10):1868-73. Review.

Wilson PD.: Polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):151-64. Review.

.

Wilson PD.: The genes and proteins associated with poly-cystic kidney diseases. *Minerva Urol Nefrol*. 2002 Dec;54(4):201-11. Review.

Wilson PD.: Polycystin: new aspects of structure, function, and regulation. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Apr;12(4):834-45. Review.

Wilson PD, Hreniuk D, Gabow PA: Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia. *J Cell Physiol* 1992;150:360-369.

Wilson PD, Devuyst O, Li X, Gatti L, Falkenstein D, Robinson S, Fambrough D, Burrow CR.: Apical plasma membrane mispolarization of NaK-ATPase in polycystic kidney disease epithelia is associated with aberrant expression of the beta2 isoform. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):253-68.

Wilson PD, Geng L, Li X, Burrow CR.: The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal clusters in adherent renal epithelia. *Lab Invest.* 1999 Oct;79(10):1311-23.

Wilson PD.: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the kidney: clues to its role? *Exp Nephrol.* 1999 Jul-Aug;7(4):284-9. Review.

Wilson PD, Hovater JS, Casey CC, Fortenberry JA, Schwiebert EM.: ATP release mechanisms in primary cultures of epithelia derived from the cysts of polycystic kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Feb;10(2):218-29.

Wilson PD, Burrow CR.: Cystic diseases of the kidney: role of adhesion molecules in normal and abnormal tubulogenesis. *Exp Nephrol.* 1999 Mar-Apr;7(2):114-24. Review.

Winyard PJ, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA, Woolf AS.: Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int.* 1996 Jan;49(1):135-46.

Winyard PJD, Nauta J, Lirenman DS, Hardman P, Sams VR, Risdon RA, Woolf AS: Deregulation of cell survival in cystic and dysplastic renal development. *Kidney Int* 1996;49:135-146.

Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int* 1993;35(suppl):100-107.

Woo D: Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases. *N Engl J Med* 1995;333:18-25.

Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S.: Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):177-88.

Wu G, Hayashi T, Park JH, Dixit M, Reynolds DM, Li L, Maeda Y, Cai Y, Coca-Prados M, Somlo S.: Identification of PKD2L, a human PKD2-related gene: tissue-specific expression and mapping to chromosome 10q25. *Genomics*. 1998 Dec 15;54(3):564-8.

Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S.: Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet*. 2000 Jan;24(1):75-8.

Wu G, Mochizuki T, Le TC, Cai Y, Hayashi T, Reynolds DM, Somlo S.: Molecular cloning, cDNA sequence analysis, and chromosomal localization of mouse Pkd2. *Genomics*. 1997 Oct 1;45(1):220-3.

Wu G, Somlo S.: Molecular genetics and mechanism of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Genet Metab*. 2000 Jan;69(1):1-15. Review.

Wu G, Tian X, Nishimura S, Markowitz GS, D'Agati V, Park JH, Yao L, Li L, Geng L, Zhao H, Edelmann W, Somlo S.: Trans-heterozygous Pkd1 and Pkd2 mutations modify expression of polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet*. 2002 Aug 1;11(16):1845-54.

Yoder BK, Richards WG, Sweeney WE, Wilkinson JE, Avener ED, Woychik RP. Insertional mutagenesis and molecular analysis of a new gene associated with polycystic kidney disease. *Proc Assoc Am Physicians* 1995; 107: 314–323

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.

Zarrin AA, Malkin L, Fong I, Luk KD, Ghose A, Berinstein NL.: Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and λ cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Jul 7;1446(1-2):135-9.

Zeier M, Fehrenbach P, Geberth S, Mohring K, Waldherr R, Ritz E: Renal histology in polycystic kidney disease with incipient and advanced renal failure. *Kidney Int* 1992;42:1259-1265.

Zerres K, Rudnik-Scoeneborn S: On genetic heterogeneity, anticipation and imprinting in polycystic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:7-9.

8 Anhang

8.1 Ermittelte Sequenz um das Exon 1 des murinen Pkd1-Gens

Die Sequenz wurde von Subklonen des BACs 423D1 des California Institute of Technology erstellt. Die genomischen Abschnitte dieser Bank stammen aus dem Mausstamm 129Sv und wurden aus der ES- Zelllinie CJ7 gewonnen.

```

1 agatctgacc ataggccatg tttacaatcc tcacatgcca taaacctgct ggcattgtggc
61 ttcttgccaa gtcttcattt caaaatgcct tctataaagg tcacttcttg acacctttcc
121 tttagcaatg cacagggttg catagtaagg gccagggccca gggccaggat gaccttgagg
181 aacctgtctc tctgggtctc tgacgaactt gagacaattg ctctgtctac agtagatggc
241 tggtaggtgt gtgtcctttc tcccactctc ctgggggtact catggccagt ggtttcaaat
301 tgtctctgga acgttctcca tctacaattc tatattagtt tgtagctttt ctcttttct
361 ccttttctct ctgtctgtct gacctttttt tcgagacagg gtttctctct gtngccctgg
421 ctgtcctaga acttactttg aggaccaggc tggccttgaa ctccagagatc tgtctgattc
481 tgcctcccaa gtactggaat taatggagta caccacacac ttgcaaatgt atacacatgc
541 acacacagaa ttaaaaagat attttatttt attttatttt attttatttt attttattta
601 tatatttttt gtttgtttgg ttttttcaag acaggggttc tctgtatagc cctggctgtg
661 ctggaactca ctctatagac caagctggcc ttgaacttag aaatttgctt gcctctgcct
721 cccaagtgtc gggattaaaag natgtgtgcc accacgcccg gcttanaaaa gatatttttt
781 gagagatgtc tcaactatata agccttggct ggccaggagt cagctatggt gaccagcctg
841 gctttaaact cacagagatc tttcctttgc ctccaccagt ttaggggtac agagtgtgcc
901 accactgtgc ctagccctat aaaataaatc atatatatat acatacacgc acacacgcac
961 acacacanat atatatatat gtgtgtatat atatatatat atatatatat atagagagag
1021 agagagagag agagagagag ttggtttttt taaatttatt tattttgggt ttttgagaca
1081 gggtttctct gtgtagccct ggctgtcctg gaactcactc tgtagaccag gctggctctt
1141 taactcataa atcctcctgc ctctgcctcc caagtgtctg gattaaaggc atgtgccacc
1201 attgcccgcc tgttgttttt caagacaggg tttcctttgt tagccaggct ggcctcaaac
1261 tcacagagat tcttctctgc tctgtctgga ttaaaggcat ataccaccat tcccagcaa
1321 taaaaatatt tttaaaaatt aaaaataaaa ctattaagtc ggacgtgtgt ggcgcacacc
1381 tttgatccca acacttggga ggcagaggca ggcggatttc tgagtttgag gccagcctgg
1441 tctacaaagt gaggcccagg acagcccagg gctatacaga gaaacctgt cctcaaaaaa
1501 acaaacaaaa caaaaacaaa actattgctg tgtgaagtgg tgtacacat tagttccagc
1561 actctagagg cagagggagg taggtttctg tgagttcaag gtcagcctgg ttcacatagg
1621 gatcagccag ggctacatgg tgaatattg tctaaaaatt aaaaaaaaaa aaacacaaaa
1681 cttgccttat ctgtaaagca taactgttaa tcagatatga tggtttaaac ctgtaacccc
1741 aacattcagg aggctgaggc aggaattgtc ttaagtctga ggccgagcct gggctacagt
1801 gtgagaaaaa tacaacaaaa caaaaaaccc caaatgagtt agatgtgggg gagagcatgc
1861 cttaaatctg gaggcaaaag caggttcata tctgagctcc aggccagta gggctactca
1921 gtgagatggt gtccgaacct gcatgcatga acatacacat gcacacacat actaacataa
1981 aattgagata cggttcccca agcgtgatat ctagtattgt ttttaagaat atttaagcca
2041 agcctgggtg cactactcat taatcccagc tctcaggagg cagaggtagg tagatgatct
2101 ctgtgagttt aaggccagcc tggctctacag aatgagttgt aggacatcca ggaccactat
2161 acagtcaaac ccttgctcag aaaattaaaa aaaaagtatt gttttttgta tgggtatttg
2221 ttattctcat ccatgaagga gctgagagag gttaaagggt tgccttgga agtcctgtga
2281 gaaattaatt aagtgtctg gtcaggagct tttaggaacc tctcactcta gagtactggc
2341 ctgagaagcg catgctacca tgcattgctc gtgagttggt tttgttgtt tgtttgtttt
2401 tcgagacagg gtttctctgt gtagccctgg ctttctctgga actcactctg tagaccaggc
2461 tgaccttgga ctccagaaatc tgcctgcccc tgcctcctga gtactgggat taaaggcgtg
2521 tgccacctca cccggcttct gtgcgtatca atatatataa taaggctgtt cattcactcg
2581 tctaattacg gaacaaacat gcttattggc cccaaagaac gccccacccc tttcctccag
2641 tctcaaggca ctcatcaact tctgtctttt gtggactttt ctctccctt ttaaatttaa
2701 atttttcttt ccttttttga atatttctct tttgagttct tggattttg acgtctaaac
2761 atttttttca aggattactc cccggtgcta tgggttggaa tcttttctct caattttatt
2821 ttttctttag ctctctgcga caaggatcta cagtacctgg agactgaagc ctgagatgga
2881 gctgcttggc ggggtggcgg gtggtaacag cgtctcccca gcacctccgc aggggtgtct
2941 gcgaggagtg gtggagggca cggcgctaaa ctgcacccac tccaggtgag ctgtgagctc
3001 aatctcatgc atcacttctg agcctctgca gcactctctg gcagaggtcc atgatatgac
3061 gcagcaagta tttattgact caggctcggc gtactctcca gggctcagaga agacttgcca

```

Anhang

3121 agtggaaagct cgcacagctg gtaccagaa actgtaggtc gcagggtttt ttgttttgtt
3181 ttgttttttt aatttattat cagtgtagag cgcattgctat ggccaggggtg ttgocggccag
3241 aggacaactt tgtataagtt ggattttgtt acgttgattt cgggagagga ctcagctgat
3301 taggctttgc atggcaagct cctttatccg ctaaccgacc cccacacctc acagggtttc
3361 tcggtataat cctagctgtc ctggaactca ctctgtagac caagctgggc tctgaactca
3421 gagatccacc tgcctctgcc acccgagtat tgggattaaa gtctttgcca ccaccacca
3481 gtgctgagcc ctctcttctg cacctactag tgttttcaat attgtgactg ttgattgcag
3541 aaggctagga gcgaagaaac ctactgactc caagaaggcc tcaacagcca gaggacttca
3601 agggggaaact cgggaaagca ggggtgaatag ccataagctc tccangccgt tgtgggtang
3661 ggacagccta agcgggcagc tgcctcaaacc gcagcctgac tccggggggtc cgaaacgccg
3721 cagcagaggn gggncgggag cttcctccac cttcaagcct ggtctgcagc agaccagcg
3781 gtcgagaagg cggggcctcc ggaggactcc cctcccgtga gaccccgcc accaaggctc
3841 acgctcactg ggcggagcct ctgagggcgc ccttccttca ggccccgcct actgcaggat
3901 ctgcaatgaa gagggcggag cctgtgaagg ccttctcttc atccagtccc acctacagcc
3961 aacttggaag cgcaggggagc gagtctgagg gcgccccgcc ccacgccgga ggtggggggg
4021 aggaggagga gctggcgctg ggtctgcagt gcagcgcgaa tgcgcgagca ggcggccaag
4081 gccctgaggt gcggcctgcc ccagagcgtc gagcagctgt cgcaccgcag acggggccagc
4141 gccgcccggc cattcagccc cgtgccgac catgaggtcc gcggggcctc cctgaactgc
4201 gctgcccggc gcaaggggac tgggggaaac gggggccatgc gcgggctgct ctgacgatgc
4261 cgcggggcgc gcctgctctc ctggcgctgg ccttaggcct gggcctgtgg ctcggagcgc
4321 tggccggaga cctggggcgc ggctgcgggc cttgcccgtc ccctgcttt tgcggccctg
4381 cgcggcagcgc cgcctgccgc gtcaattgct cggggcgtg gctgcagacg ctagggccga
4441 gtctgcgcat cccggctgac gccaccgcgc tgtgagtagc tgcgcccagc cagtgcagcc
4501 gggcagggcgc ttgccatggc ggccggggcgc ctggctagag catcatgact ggggtccggcg
4561 ggagcagggc tgaggtagat agagcccttc tggagccttg cggggcgtgc ggcggcagag
4621 cgtggggcgc gtccctgagct cggggcgcga gacgcagcgg ggcctggcgc ctcctaggcc
4681 gaggctccag cagggatgct ggcccgacta aataaggaaa acctgggacc tcagccggcg
4741 tgaccagaa gagtagcaa aaatcccagt tcctacgaag actgacgttt tacggtgcgg
4801 ggctcctcaa acaggagcta gaacagtgcg tggggcgtgg taggaggttg cggataaac
4861 gttaattaga gactaattga ggtgtatcct ggggttggag atttctgttg gggctcagag
4921 ctggcctca ggggaagagt ctgcagaaga attttatgga tgtgtaaga ttgactatgt
4981 ttaagggaca aaaagttggt ccagcggcct ggcctgaggt tggccacaca tagtactgc
5041 tggagaagtg ttagggagta gagggtgta tggatgtggg cctctagtgg tacttaggga
5101 ggggaaattg ccaggagggg ttaaaacatt tgccatttct gcagttttgc cttctgaaag
5161 taacaggcaa atctcactga gagatcaaca tcttgaacca ggcttaacta gtctctttt
5221 atagattatc acacttaatt cttagtccag ttctctggcg tagagccaga cctctgtttt
5281 acaggtgagg aaagaagctt ggagatgcca tgtattttca tggttatcac agcctagaca
5341 tcatagctta ggtttggacc tttgcagtgt tggcaaccag ggttggatca aaaatattaa
5401 gaggacaaga ttgcagactg cagtaatttg tctcaggatt aactgattcc aaccgtttt
5461 ttgtttttgt ttttttcccc caagacaggg tttctctgta tagccctggc tgtcctggaa
5521 ctactttgt aatccaggct gtccctggaac tcagaaatcc gcctgccttt gcctcccag
5581 tgctgggatt aaagggtgct accaccactg cccggctgat tccaacctct tagacttct
5641 gggcacttca gccacagtag ttcttgcctc aattccctca ggaacttgtt aaagtagaaa
5701 tgggtccctt cactggtttt tataatggac ttgggtgactt caccctagta cggagctgag
5761 atttgggttc ctatgattgt gttccttggc cactgtagca tttgtggttc agctgtctc
5821 ggagatggat ccccttttgc tatctaatag gatccacaga attgcatctg atccagattt
5881 atggatgcta tgaatgaggg cacttcttct tctctgctac ctggatctg taggagtcag
5941 gtccagctcc tgttggctcc ttcttccacc tctgctgacc tcccaggagc tgtctaggga
6001 atgaaagatg agagcctaca agtctgtggg ctctgctcgg cagtgaagct tgagcggttg
6061 ccctgggttt ggtacaaggg gttttctgag agctaatagc ttgactgact tcatacgggt
6121 ctcaagatat tagcccctca cattgtggga agagacatct gatagacctc atgtgtggac
6181 agatgggtaa agaattcaaa tttttatttc taacctcaaa cactgcttct aagagactta
6241 accggctgag gcctcagggg caggtgttga gttcccccta ctgcttctca aggtcagttt
6301 gtgtccagta ggttgtccat ttctgtagac tactgcagat cagatagatg gttttctctg
6361 aggaccaagg acacagacag caaccttagg ctagtgtcta ggtgcccagg gaacattgcc
6421 ttctttctga ttatcagacc cctctgtatg tgtgtggctc tttggcagga cggctatgtc
6481 tggtagcagg acagctggtc ttctgagagc atagctncc agcgtttctt ggtttaaata
6541 catgctgctg cttaaagaaag gtagcgttcc tggaaagggtg ctgctactca actcactctg
6601 agctttactg tgganccatt taaagccttn ctattttgaa aagtatgcag aacagaataa
6661 tgaacctcac ccttcttggc tgtcattcct gtcttataat tcgagccaaa gaccagcatc
6721 ttattctttt atctatttta acactgaaaa cacatctaaa ctaggaaaca cttccttagg
6781 tttagtgatg gtccactgtg tacatttttg tgaagctgac ctcaaactca cagatctgac
6841 tgcctctgccc tgtcaagtgc tggactaaaa ggtgtgtgcc acctgcccga gctgtttggg
6901 tggggttttt ttgtttgttt gtttttggtt agacatgtag taaaaattgg ccttgaacct
6961 tcaaatattt gatcctcctg cctcagctct cctagtgtta gaattacaga tgtgtactat
7021 caggcctgac tctggattat gtgtactatc aggcctgact ctggattttt ggtagtttaa
7081 tttaggggct gaattaggtc tacctagtag agttagttga tggcctgaat ctagctgatg
7141 gctacacttt ttctagttct ctttttctac ttttgacttt gaaaaaaact aactcctgta


```
7201 tccagtttct gactgactga gctgtgagtt gttggcttct tgcattgtctc tgtcctctgt
7261 gtctccagct ctggttggtt gggtcacacc tctttcaagg tctctgggac ctctctggct
7321 agtgactaca aggcaggaca ttctattggt gaagaaagat ctctgggata ttcacctgac
7381 actaggtata aacttatttt tggcttcaga cattgttggt ttagatatca tttctgggtga
7441 caggactat acatttttag attttgagtt tgaggccagc ctgatcaaca tagttccagg
7501 acacacctag agcagtgtag agagacctg tctcaaaaaa caaaacaaaa caaaatagta
7561 gggaggggaa taagtaggta tgatggttta tacttgatata tctcaacact gggggagatt
7621 gagacaggag gattttggtt ttgaggtcag cctaggccat acacagaaat atgtttttaa
7681 aaaaatccaa aaccctcaaa gcattaaaaa acccctaaga gggctggaga gatggctcag
7741 cagttaagag cactgactgc tcttccaaag gtcttgagtt caattcctag caaccacatg
7801 gtggctcaca accatctgta atgggactc atgcccctgt ctgggtgtgc tgaagacagc
7861 tacagtgtat ccatatacat aaaataaata agtttttttt aaaaatacca ctaagaaaag
7921 ttaagaatag gtaaatctaa tgagatagaa aaagattaat agtgtgttga gggtagtagt
7981 caagaaccgt tgggcttctt tgtggaatga tgaaaacatg aaattagtgt tgatgattac
8041 ccaggcttgt gaaggaagac actaaaaatc atcaaattgt caagttttaa atgtgaactt
8101 tatagtagtc aattttttcc tgaattttgt tgttgatgaa aataagctta aatctatacc
8161 aagtaataag tttatacaaa aatagatttt ggtcacctgg gaggtcagg atggtagtac
8221 atctctatca tctaacacc ttgaaggcag aggcaagatg gttgctaca attggacca
8281 gcttggttca tgaaggaga acccctcct cccaattttg agaggtagga gaacaagtct
8341 gagaggatta tccaggagac acactcttcc ttgtctgctt tctcagaggc ttatgctggg
8401 ctttaggtgt ctttctgccc agtgggtgct ttctgtgggg ttgtggtttg gagtctcttt
8461 gttcttgtat tgacttttaa actaagactc ccagggtgtg aggtagttt tagagtcata
8521 gactgggtgt tcacaaagaa gtaatatggt cagagagtct tgcagctgac cccaagact
8581 gcactcaggc tggttaatag atggcaagga gtagagatga cagtgcctcc ttt
```

//

8.1.1 Analyse des sequenzierten Abschnitts mit dem Repeatmasker

(<http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/>)

Repetitive Elemente sind in der Sequenz mit “N” maskiert.

```
AGATCTGACCATAGGCCATGTTTACAATCCTCACATGCCATAAACCTGCTGGCATGTGGCTTCCTGCCAAGTC
TTCATTTCAAAAATGCCTTCTATAAAGGTCACCTTCTTGACACCTTTCCTTTAGCAATGCACAGGTTGGCATAGT
AAGGGCCAGGGCCAGGGCCAGGATGACCTTGGGAGAACCTGTCTTCTGGGTCTCTGACGAACCTGAGACAATT
GCTCTGTCTACAGTAGATGGCTGGTAGGTGTGTGTCCTTTCTCCCATCTCCCTGGGGTACTCATGGCCAGTGG
TTTCAAATGTCTCTGGAACGTTCTCCATCTACAATCTATATTAGTTTTGTAGCTTTTCTCTTTTTCTCCCTT
TCCTTCTGTCTGTCTGACNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNCCCAAATGANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
CTAACATAAAAATTGAGATACGGTTCCCAAGCGTGATATCTAGTATTGTTTTTAAGAATATTTAANNNNNNNNN
```

NNNNAGTTATGTTTTTGTATGGGTATTTGTTATTTCTCATCCATGAAGGAGCTGAGAGAGGTTAAAAGGGTGT
CCTTGGAAGTCTGTGAGAAATTAATTAAGTAGTCTGGTCAGGAGCTTTTAGGAACCTCTCACTCTAGAGTAC
TGGCCTGAGAAGCGCATGCTACCATGCATGCTCTGTGAGTTGGTTTTGTTTTGTTTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NN
NNNTTCTGTGCGTATCAATATA
TTTAATAAGGCTGTTTCATTCACCTCGTCTAATTACGGAACAAACATGCTTATTGGCCCCAAAGAACGCCCCACC
CCTTTCCCTCCAGTCTCAAGGCACTCATCAACTTCCCTGTCTTTGTGGACTTTTCTCTCCCCTTTTTAAATTTAAA
TTTTTCTTTCCCTTTTTGAATATTTCCCTGTTGTAGTTCCTTGGTATTTGGACGTCTAAACATTTTTTTCAAGGA
TTACTCCCCGGTGTATGGTTGGAAGTCTTTTCTCTCAATTTTTATTTTTTCTTTAGCTCCTGCGCACAAGGAT
CTACAGTACCTGGAGACTGAAGCCTGAGATGGAGCTGCTTGGCGGGTGGGCGGGTGGTAACAGCGTCTCCCCA
GCACCTCCGACGGGTGGTCTGCGCGGAGTGGTGGAGGGCACGGCGCTAAACTGCACCCACTCCAGGTGAGCTG
TGAGCTCAATCTCATGCATCACTTCTGAGCCTCAGCAGCATCCTCTGGCAGAGGTCATGATATGACGCAGCA
AGTATTTATTGACTCAGGTGCGCGTACTCTCCAGGTCAGAGAAGACTTGCAGAAGTGAAGCTCGCACAGCT
GGTACCCAGAACTGTAGTTCGACGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTTTTTTTTAAATTTATTATCANNNNNNNNNN
NN
NN
NN
NNNTGCTGAGCCCTCTCTCTGCACC
TACTAGTGTTTTCAATATTGTGACTGTTGATTGCAGAAGGCTAGGAGCGAAGAAACCTACTGACTCCAAGAAG
GCCTCAACAGCCAGAGGACTTCAAGGGGAACTCGGAAAGCAGGGTGAATAGCCATAAGCTCTCCANGCCGT
TGTGGGTANGGACAGCTAAGCGGGCAGTCTCAAACCGCAGCCTGACTCGGGGGCTCGAAACGCCGCAG
CAGAGGNGGNCGGGAGCTTCTCCACCTTCAAGCCTGGTCTGCAGCAGACCCAGCGGTGCAGAAGGCGGGGC
CTCCGGAGGACTCCCCTCCCGTGAGACCCCGCCACCAAGGCTCACGCTCACTGGGCGGAGCCTCTGAGGGCG
CCCTTCCCTCAGGCCCCGCTACTGCAGGATCTGCAATGAAGAGGGCGGAGCCTGTGAAGGCCCTTCTCTTCAT
CCAGTCCCACCTACAGCCAACCTTGAAGCGCAGGGGCGGAGTCTGAGGGCGCCCGCCCCACGCCGGAGGTGG
GGGGGAGGAGGAGGAGTGGCGCTGGTCTGCAGTGCAGCGCAATGCGCGAGCAGGCGGCCAAGGCCCTGAG
GTGCGGCCTGCCCAGAGCGCTGAGCAGCTGTGCACCGCAGACGGGCCACGGCCGCCCGCGGCATTCAGCCCC
GTGCCGACCATGAGGTCCGCGGGCCCCCTGAACTGCGGCTGCCGGCGCAAGGGGCCCTCGGGGAACCGGGG
CCATGCGCGGGCTGCGTGCAGATGCCGCCCGCGCCTGCTCTCCTGGCGCTGGCCCTAGGCCCTGCGGCTG
TGGCTCGGACGCTGGCCGAGACCTGGGCGCGCTGCAGGCTTGCCTGCTCCTGGCGCTGGCCCTAGGCCCTG
CGCCCGACGCCCTGCCCGCTCAATGCTCCTGCTGGCTGCAGACGCTAGGGCCGAGTCTGCGCATCCC
GGCTGACGCCACCGCGCTGTGAGTAGCTGCGCCGAGGCAGTGCAGGCGGGCAGGCGGTTGCCATGGCGGCGGG
CGGCCTGGCTAGAGCATCATGACTGGGTCCGGCGGGAGCAGGGCTGAGGTAGATAGAGCCCTTCTGGAGCTTT
GCCGGGCTGTCCGCCGAGAGCGTGGGCGCGTCTGAGCTCGGGCGCAAGACGCAGCGGGGCCCTGGCCGCT
CCTAGGGCGAGGCTCCAGCAGGGATGTCCGGCCGACTAAATAAGGAAAACCTTGGACCTCAGCCGGCGTGACC
CAGAAGAGTAGCCAAAAATCCAGTTCCTACGAAGACTGACGTTTTTACGTTGCGGGGCTCCTCAAACAGGAGC
TAGAACAGTGCCTGGGGCTGGTAGGAGTTGCGGAATAAACGTTAATTAGAGACTAATTGAGGTGTATCCTG
GGGTTGGAGATTTCTGTTGGGGCTCAGAGCTGGCCTCTAGGGGAAGAGTCTCGACAAGAATTTTATGGATGTG
TAAGAATTGACTATGTTTAAGGACAAAAAGTTGGTCCAGCGGCCCTGGCCCTGAGGTGGCCACACATAGTGAC
TGCTGGAGAAGTGTTAGGGAGTAGAGGGTGTGATGGATGTGGGCCCTTAGTGGTACTTAGGGAGGGGAAATTG
CCAGGAGGGGTTAAAAATTTGCCATTTCTGCAGTTTTGCTTCTGAAAGTAACAGGCAAATCTCACTGAGAG
ATCAACATCTNN
NN
NN
NNNTGGATCAAAAATATTAAGA
GGACAAGATTGCAGACTGCAGTAATTTGTCTCAGGATTAACGTATCCAAACCGTTTTTTTTGTTTTNNNNNNNNNN
NN
NNNTGATT
CCAACCTCTTAGACTTCCCTGGGCACTTCAGCCACAGTAGTCTTGTCTGCAATTCCCTCAGGAACCTGTTAAAG
TAGAAAATGGTCCCTTTCACTGGTTTTTATAATGGACTTGGTGACTTACCCTAGTACGGAGCTGAGATTTGGG
TTCTTATGATTGTGTTCCCTGGCCACTGTAGCATTTGTGGTGCAGCTGCTCTGGAGATGGATCCCCTTTTGC
TATCTAATAGGATCCACAGAATTCATCTGATCCAGATTTATGGATGCTATGAATGAGGGCACTTCTTTCTCT
CTGCTACCTGGTATCTGTAGGAGTCAGTCCAGCTCCTGTTGGCTCCTTCTTACCCTCTGCTGACCTCCCAG
GAGCTGTCTAGGGAATGAAAGATGAGAGCTACAAGTCTGTGGCTCTGCTCGGCAGTGAAGCTTGAAGCGGTT
GCCCTGGGTTTTGTTACAAGGGTTTTCTGAGAGCTAATAGCTTGAAGTACTCATACGGTCTCAAGATATTA
GCCCCACATTTGTGGGAAGAGACATCTGATAGACCTCATGTGTGGACAGATGGGTAAAGAATTCAAATTTTT
ATTTCTAACCTCAAACACTGCTTCTAAGAGACTTAACCGCTGAGGCCCTCAGGGACAGGTTGTGAGTTCCCC
TACTGCTTCTCAAGGTCAGTGTGTCCAGTAGGTTGTCCATTTCTGTAGACTACTGCAGATCAGATAGATGG
TTTTCTCTGAGGACCAAGGACACAGACAGCAACCTTAGGCTAGTGCTTAGGTGCCAAGGAACATTGCCTTCT
TTCTGATTATCAGACCCCTCTGTATGTGTGGCTCTTTGGCAGGACGGCTATGCTGGTAGCAGGACAGCTG
GTCTTCTGAGAGCATAGCTTNCAGCGTTTTCTTGGCTTAAAATCATGCTGCTGCTTAAGAAAGGTGACGTTCC
TGAAGGGTGCTGCTACTTAACCTCACTCTGAGCTTTACTGTGGANCCATTTAAAGCCTTNCATTTTTGAAAAG

Anhang

```
=====
file name: repeat.seq
sequences: 1
total length: 8633 bp (8633 bp excl N-runs)
GC level: 47.76 %
bases masked: 3149 bp ( 36.48 %)
=====
              number of      length  percentage
              elements*    occupied  of sequence
-----
SINES:          22          2831 bp   32.79 %
  B1s           18          2288 bp   26.50 %
  B2-B4         3           353 bp    4.09 %
  IDs           0            0 bp    0.00 %
  MIRs          1           190 bp    2.20 %

LINES:          1           136 bp    1.58 %
  LINE1         1           136 bp    1.58 %
  LINE2         0            0 bp    0.00 %
  L3/CR1        0            0 bp    0.00 %

LTR elements:   0            0 bp    0.00 %
  MaLRs         0            0 bp    0.00 %
  ERVL          0            0 bp    0.00 %
  ERV_classI    0            0 bp    0.00 %
  ERV_classII   0            0 bp    0.00 %

DNA elements:   0            0 bp    0.00 %
  MER1_type     0            0 bp    0.00 %
  MER2_type     0            0 bp    0.00 %

Unclassified:   0            0 bp    0.00 %

Total interspersed repeats: 2967 bp  34.37 %

Small RNA:      0            0 bp    0.00 %

Satellites:     0            0 bp    0.00 %
Simple repeats: 3           150 bp    1.74 %
Low complexity: 1            32 bp    0.37 %
=====
```

* most repeats fragmented by insertions or deletions
have been counted as one element

The sequence(s) were assumed to be of rodent origin.
RepeatMasker version 2002/07/13 , default mode
run with cross_match version 0.990329
RepBase / RepeatMasker database versions unknown

8.2 Verwendete Oligonukleotide

Auszug aus der Datenbank des Instituts für Humangenetik, Münster

Synth-Nr	Name	Sequenz
06811-1	Pkd2del, Ex07, rev1	AAAATTGATGAATTTGAAGAGCACG
06812-1	Pkd2, Ex06, for1	GTAAACTGATCCGCTATGTCAC
06813-1	Pkd2, Ex07, for1	CTGGATGTTGTGATTGTCGTGTTATCT
06814-1	Pkd2, Ex07, for2	CATGGTATTTTTGGTCTGGATTAAGCTC
06815-1	Pkd2, Ex07, rev1	AAAATTGATGAATTTGAAGAGCTTAATC
06816-1	Pkd2del, Ex07, for1	CTGGATGTTGTGATTGTCGTGCTC
01257-1	Reverse Primer	gctatgaccatgattacgccaagc
01258-1	Universal SP	cgacggccagtgaattgtaatacg
02026-1	Universal T7 for pBluescript	TAATACGACTCACTATAGGGCGAA
02027-1	Universal T7 for pBluescript	GAACTAGTGGATCCCCCGGGCTG
02090- Cy5	Universal SP6-SP-long	GATTACGCCAAGCTATTTAGGTGACACTATAGAATAC
02089- Cy5	Universal T7-SP-long	TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTCGAGCTCGG
02082- Cy5	Universal SP6-SP	CAAGCTATTTAGGTGACACTATAG
02081- Cy5	Universal T7-SP	GTAATACGACTCACTATAGGGC
02204- Cy5	Universal SP (-21)	TGAAAACGACGGCCAGT
02205- Cy5	Universal M13, RP1 (21)	CAGGAAACAGCTATGACC
02210-1	GAPDH, F	GACTGTGGATGGCCCCTCCGG
02211-1	GAPDH, R	AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGC
02211-2	GAPDH, R	AGGTGGAGGAGTGGGTGTCGC
02642-1	PKD2, Maus, ex 01, F	CTGGGTCGGGACAGTGAGATC
02643-1	PKD2, Maus, ex 01, R	GATCTCACTGTCCCGACCCAG
02644-1	PKD2, Maus, ex 02, F	GAGCGCTGGGAATCGGATGAT
02645-1	PKD2, Maus, ex 02, R	ATCATCCGATTCCCAGCGCTC
02646-1	PKD2, Maus, ex 03, F	CTCGGTGGCCAGCCCCACCCC
02647-1	PKD2, Maus, ex 03, R	GGGGTGGGGCTGGCCACCGAG
02648-1	PKD2, Maus, ex 04, F	CTTCCTCCCAGTCTGCAGAG
02649-1	PKD2, Maus, ex 04, R	CTCTGCAGACTGGGAGGAAG
02650-1	PKD2, Maus, ex 05, F	GTGCCAACGTCCATGCCTAA
02651-1	PKD2, Maus, ex 05, R	TTAGGCATGGACGTTGGCAC
02652-1	PKD2, Maus, ex 06, F	GCTGGTCTTTGTGACCAATTG
02653-1	PKD2, Maus, ex 06, R	CAATTGGTCACAAAGACCAGC
02654-1	PKD2, Maus, ex 07, F	CTCATGTGAGAAATCTAGGTG
02655-1	PKD2, Maus, ex 07, R	CACCTAGATTTCTCACATGAG
02656-1	PKD2, Maus, ex 08, F	TAGTCTTGTGCATCTTGACC
02657-1	PKD2, Maus, ex 08, R	GGTCAAGATGCACAAGACTA
02658-1	PKD2, Maus, ex 09, F	CAGCTATTCATAGACACCCC
02659-1	PKD2, Maus, ex 09, R	GGGGTGTCTATGAATAGCTG
02660-1	PKD2, Maus, ex 10, F	ACAGACCAGCAACCACACGC
02661-1	PKD2, Maus, ex 10, R	GCGTGTGGTTGCTGGTCTGT
02662-1	PKD2, Maus, ex 11, F	CCGCGTCTACGCCAACTCCG
02663-1	PKD2, Maus, ex 11, R	CGGAGTTGGCGTAGACGCGG
02664-1	PKD2, Maus, ex 12, F	CCTGCGAGATGAAATTAA
02665-1	PKD2, Maus, ex 12, R	TTAATTTTCATCTCGCAGG
02666-1	PKD2, Maus, ex 13, F	GGACCGCGGAATGGAACCTGCG

Anhang

02667-1	PKD2, Maus, ex 13, R	CGCAGTTCATTCCGCGGTCC
02668-1	PKD2, Maus, ex 14, F	CGTACAGTGGAGCGGGTACT
02669-1	PKD2, Maus, ex 14, R	AGTAACCCGCTCCACTGTACG
02673-1	PKD1, Maus, ex 49, F1	AGCTCTACCGCCCAGCATGG
02674-1	PKD1, Maus, ex 49, F2	GATGGGCTTCAGCAAGGTCAAG
02675-1	PKD1, Maus, ex 49, R	CTTGACCTTGCTGAAGCCCATC
02676-1	PKD1, Maus, ex 50, F1	GTCCGCTTTGAAGGAATGGAT
02677-1	PKD1, Maus, ex 50, R1	ATCCATTCTTCAAAGCGGAC
02678-1	PKD1, Maus, ex 50, R2	CAACTGGGGATGACTTGGAGC
02679-1	PKD2, Maus, JF	CCGGCCTTTCACAACCTTAC
02680-1	PKD2, Maus, JR	AAAGGTTGTGAAAGGCCGGCC
02681-1	PKD2, Maus, ex 13, F2	TCCGTCAGCAGTGAGGACAG
02687-1	PKD2, Maus, SP W11044	AGTTCGTGTGGAGCCACCAC
02688-1	PKD2, Maus, SP aa023786	GGCAAGCGTGGAGCCGCGAC
02689-1	PKD2, Maus, SP aa023786	GGGCTTTGAGGCAGAGGAGG
02690-1	PKD2, Maus, SP W11044	GTACACATTATTACAGTTAAG
02691-1	PKD2, Maus, SP aa023786	GATTAATTCGTAATATGTC
02692-1	PKD2, Maus, ex 14, F-Xba I	GCTCTAGAGCCGTACAGTGGAGCGGGTACT
02693-1	PKD2, Maus, ex 01, R-Xma I	TCCCCCGGGGGGAGATCATCCTGTCCCGACCCAG
02715-1	PKD2, Maus, SP 13F/14R	ACCGAGCCCTGTTTGGTGACTG
02720-1	PKD2, Maus, ex 13, F-Xba I	GCTCTAGAGCGGACCGCGGAATGGAAGTGGC
02721-1	PKD2, Maus, ex 13, F-Bam H I	CGGGATCCCGGGACCGCGGAATGGAAGTGGC
02722-1	PKD2, Maus, ex 02, R-Pst I	AACTGCAGAACCAATGCATTGGATCATCCGATTCCCAGCGCTC
02723-1	PKD2, Maus, ex 02, R-Xho I	CCGCTCGAGCGGATCATCCGATTCCCAGCGCTC
02726-1	PKD2, Maus, SP aa023786	
02876-1	PKD2, Maus, SP W11044	AATGCAAAATCCAATACCTAGG
02877-1	PKD2, Maus, SP W11044	TTTTGTTTCAGATTTGGCAAGG
02878-1	PKD2, Maus, SP W11044	TTAATCCCAACACTTGGGAGGC
02879-1	PKD2, Maus, SP 13F/14R	TGTGTGTCAGAGTTCACGTGTGCC
02880-1	PKD2, Maus, SP 13F/14R	GTGCCACTGCATATGGGACCAC
02906-1	PKD2, Maus, ex 13, F2-R	CTGTCCTCACTGCTGACGGA
02995-1	PKD2, Maus, 5'	GTCGCGGCTCCACGCTTGCCTGGAGCAGG
02996-1	PKD2, Maus, 5'	GTCGTGTCGTCATCCTCCTCTGCCTC
02997-1	PKD2, Maus, 5'	GGAGCCGCGACAACCCGGGCTTTGAGGC
02998-1	PKD2, Maus, 5'	GCCTCAAAGCCCGGGTTGTGCGGGCTCC
02999-1	PKD2, Maus, R	GTGTGCTTACACCATGACCTGTTTGGC
03000-1	PKD2, Maus, F	CGCAAACAGGTCATGGTGTAAACACAC
03014-1	PKD1, ex 01, F	GCGCGCGCTGCCCTAACGAT
03015-1	PKD1, ex 01, R	CCAGGCGTTCCTTATTTAGCA
03016-1	PKD1, ex 05, F	CAGTGGCTGCCTCTTCTAGGT
03017-1	PKD1, ex 05, R	CAGGGTGTCAACGGTCAGTGT
03020-1	PKD2, Maus, F	GTGGTAGAGATGGATGTGGAGTGGCGCCCGGGC
03021-1	PKD2, Maus, R	GCCCGGGCGCCACTCCACATCCATCTCTACCAC
03022-1	PKD2, Maus, F	CACCTGAGCGGGAGGCGGCGCCGGCTAG
03023-1	PKD2, Maus, R	CTAGCCGGCGCCGCTCCCGCTCAGGTG
03024-1	PKD2, Maus, R	CCCTCGGCCGCGGGCGCCACCGAGCTC
03025-1	PKD2, Maus, F	CGCCACCTCCCGCTGGAGGGCCAGCCACCCCG
03026-1	PKD2, Maus, F	GAGAGGCTGGTGCAGGGCTGCGAGGTCTCTGGGG
03027-1	PKD2, Maus, F	CCCAGAGACCTCGCAGCCCTCGCACCAGCCTCTC
03028-1	PKD1, ex 01, F	CCTGGGCCTGGCCTGTGGCT
03029-1	PKD1, ex 01, R	CGCTGTGGCGTCCGCGGGGAT
03030-1	PKD2, Maus, R	CGAAAGCGGAGGAGACGGCGAGGCCGAGGTCCGGCCGGGG
03031-1	PKD2, Maus, gap, F1	CAAACATTAACCTGTTCTGTGTGGTC
03032-1	PKD2, Maus, gap, F2	GAGGAGTCCCAGCAACGGGTGGC

Anhang

03033-1	PKD2, Maus, gap, R1	GCTTGACAATCACGGCATCAATCTTGG
03034-1	PKD2, Maus, gap, R2	TGCCAATGGAGTGCTCCATGCGG
03035-1	PKD2, Maus, gap	GACCACACAGAACAGGTTAATGTTTG
03036-1	PKD2, Maus, gap	GCCACCCGTTGCTGGGAACCTCCTC
03037-1	PKD2, Maus, gap	CCGCATGGAGCACTCCATTGGCA
03038-1	PKD2, Maus, gap	CCAAGATTGATGCCGTGATTGTCAAGC
03045-1	PKD2, Maus	CACCTCTCGTCTCTTCAGCTTGGCCCC
03046-1	PKD2, Maus	CGGGCCAAGCTGAAGAGACGAGAGGTG
03047-1	PKD2, Maus	GCCCCGGTCCAGCCAGAAGTTCCTCCTG
03048-1	PKD2, Maus	CAGGAGGAACTTCTGGCTGGACCGGGGG
03208-1	PKD2, gap, F	TTACTATGTGGTGGAAAGAGATATTGG
03209-1	PKD2, gap, R	CCAATATCTCTTCCACCACATAGTAA
03210-1	PKD2, gap, F	CACAGACTGAGCTATTTTCAGG
03211-1	PKD2, gap, R	CCTGAAATAGCTCAGTCTGTG
03212-1	PKD2, gap, R	CTTCTGGGGAAACTTCTGACTGCTC
03213-1	PKD2, gap, F	GAGCAGTCAGAAGTTTCCCCAGAAG
03214-1	PKD2, gap, R	CTGTCTTCGTCATCCTCCTCCTCGG
03215-1	PKD2, gap, F	CCGAGGAGGAGGATGACGAAGACAG
03222-1	PKD2, 5'-R, Maus	CGAAAGCGGAGGAGACGGCGAGGCCG
03223-1	PKD2, 5'-R, Maus	CCGGCCGGGGGATCCCCGAGCGGC
03224-1	PKD2, gap, R	GATCTTCAAGAAACTGTAGCAGCCC
03225-1	PKD2, gap, F	GGGCTGCTACAGTTTCTTGAAGATC
03226-1	PKD2, gap, F	CCAACTTTGAGCAGTGGCATACTGGC
03227-1	PKD2, gap, F	GCCAGTATGCCACTGCTCAAAGTTGG
03239-1	PKD2, gap	TTCAGGTCTTGCCGAAGCTCATC
03240-1	PKD2, gap	GGCCTCAATCTCTGCATCTG
03255-1	PKD2, Maus, 8F2	GGAAGAGAGCAACGCCAACCGAG
03256-1	PKD2, Maus, 8R2	CTCCCGTAACACACTTTTCAGG
03257-1	PKD2, Maus, gap, R	GATGAATTTGAAGAGCTTAATCC
03258-1	PKD2, Maus, gap, F	GGATTAAGCTCTTCAAATTCATC
03259-1	PKD2, Maus, gap, R	GGCACATCGAGACATGGTTGTGG
03260-1	PKD2, Maus, gap, F	CCACAACCATGTCTCGATGTGCC
03261-1	PKD2, Maus, gap, R	GGGTGCCGAAGACAAGGTGTGC
03262-1	PKD2, Maus, gap, F	GCACACCTTGTCTTCGGCACCC
03263-1	PKD2, Maus, gap, F	GATGAGCTTCGGCAAGACCTGAA
03264-1	PKD2, Maus, gap, F	CAGATGCAGAGATTGAGGCC
03265-1	PKD2, Maus, RACE, R	CGGATGCAGCTCCATCTCGATCTCC
03266-1	PKD2, Maus, RACE, R	CCCCGAGGCCCGCGGGGACAGC
03267-1	PKD2, Maus, RACE, F	GCTGTCCCCGGCGGCCTCGGGG
03294-1	PKD2, Maus, F	GGGGATGCAGCAGGCCGACTCCGG
03295-1	PKD2, Maus	GAACATGGCTCTGCGGCAGAG
03296-1	PKD2, Maus	GTAGTATCTATGGTGATTAA
03297-1	PKD2, Maus	CCAGACCAAAAATACCATGAC
03298-1	PKD2, Maus, Intron 8	CGCATCATTTTGGGTGATATC
03299-1	PKD2, Maus	CTGTAGTATCTATGGTGATTAA
03300-1	PKD2, Maus	ATCCAGACCAAAAATACCATGA
03301-1	PKD2, Maus	CTGATAAGGTCTGAGAGTTC
03303-1	PKD2, Maus	CTCTTTCTCCAAGTCATCTC
03304-1	PKD2, Maus	CCGGGCGGCTGCGGCTGCACG
03305-1	PKD2, Maus	TCTGTTGATGCTCACGCTCGG
03306-1	PKD2, Maus	AACTTCGCAGAGATCGAGGAAG
03307-1	PKD2, Maus	GCCCCTCTGCATTTGACATTCG
03308-1	PKD2, Maus	ATACAGTTCAACAATATAAGTG
03302-1	PKD2, Maus	ATGCCATCTCAGAGAGTCTCCG

Anhang

03309-1	PKD2, Maus	CTTGGAACACAGCTCTTTACC
03310-1	PKD2, Maus	CTCTTCATAGGAAACCCAC
03311-1	PKD2, Maus	GGGGAACAAGACTCATGGAAGAGA
03312-1	PKD2, Maus	GGAAGAAAGAGTTTTAAAGTTGG
03325-1	PKD2, Maus, a-Rep, Intron 5	GGGTTACCACAAGCTGGGGAATCC
03326-1	PKD2, Maus, a-Rep, Intron 5	GGTCAGTCCCTGCACTATGAGG
03327-1	3	GTCTCTGTGAATTACTGACTTGG
03328-1	PKD2, Maus, cag-Rep, Intron 3	GTAAATTCAACCCATAAGTATC
03329-1	PKD2, Maus, ex 09	CAAATGTAGTAAAATAAAGTGGCC
03330-1	PKD2, Maus, ex 01	GAAAAGGCCAGCGGCAGGGATC
03331-1	PKD2, Maus, ex 01	CTCCCGGGCCTGGCTCGCTGG
03332-1	PKD2, Maus, ex 10	CAGAATATGTTCTGCGATCA
03333-1	PKD2, Maus, atg-Rep, Intron 7	CTACATGACTGCAAACTATGCA
03335-1	PKD2, Maus, atg-Rep, Intron 7	CCTCATCTGGCCATTTCAATCAGC
03356-1	PKD2, Maus, R	GATGAACGTTTTACACTTTTATTTA
03357-1	PKD2, Maus, CA, R	GGCCTCCGATCCTGCAGGACGC
03358-1	PKD2, Maus, CA, R	AGGACGCCTCCACCCACTG
03397-1	PKD1, Maus, ex 15, F2	CGGAATTCCTCTGTGGGCACCTTCAATA
03398-1	PKD1, Maus, ex 15, R1	CGGAATTCAGAAGCTGTGGGAGAAGTGG
03399-1	PKD1, Maus, ex 15, F1	CGGAATTCGTGGGAGCCCTGCCACCTAC
03400-1	PKD1, Maus, ex 15, R2	CGGAATTCGACTGCATTGGAAGCATTGAG
03405-1	PKD2, ex 01, R	CGCCTCCGCCCGCCCCTCGGC
03406-1	PKD2, Maus, ex 01, R	CTTCCCGGAGTCGGCCTGCTG
03407-1	PKD2, Maus, F, CA	CCTTTGACTCTCCTGGTCTTC
03408-1	PKD2, GA, R	ACAGACTTATGGATGATTGAGAG
03409-1	PKD2, ex 01, F	GATCCCTGCCGCTGGCCTTTTCG
03410-1	PKD2, ex 01, F	CCAGCGAGCCAGGCCCGGGAGCGGG
03473-1	PKD2, Maus, ex 01, F	GGAGGCGGGGAGCAGCAGGC
03474-1	PKD2, ex 01, R	CGCGCAGGCAGTTGTCAACGTGC
03475-1	PKD2, Maus, ATG, F	TGCTGTCAATGTTTGTGGTCTGG
03476-1	PKD2, Maus, ATG, R	AAGGCAAATCTATGTCTTCCAATGATC
03478-1	PKD2, Maus, AG, F	CAATGCAGGTGAGATTCAGGG
03479-1	PKD2, Maus, AG, R	TTACAGACTTATGGATGATTGAGAGAAC
03480-1	PKD2, Maus, CA, F	CCTTTGACTCTCCTGGTCTTCA
03481-1	PKD2, Maus, CA, R	GTCGTTGTGTGGTCTTGTAAATACA
03527-1	PKD1, Maus, ex 01, F	CTGGGCCTGTGGCTCGGAGC
03528-1	PKD1, Maus, ex 01, R	CAGCCGGGATGCGCAGACTC
03529-1	PKD1, Maus, ex 02, F	CACAACCTACTTCAGACGCT
03530-1	PKD1, Maus, ex 03, R	AAATTAGCAAACACGCCTTC
03531-1	PKD1, Maus, ex 04, F	TTGAGTGCAACTGTGGTCTG
03532-1	PKD1, Maus, ex 04, R	GGGATACTGAGGAGAGGTTG
03533-1	PKD1, Maus, ex 05, F	TGTGGCAGCAGTACCCTTCT
03534-1	PKD1, Maus, ex 05, R	GCAGAGTTGAGGGACAGTGA
03540-1	PKD2, ex 01, M, F, EcoR1	CCGGAATTCATGGTTAACTCCAGACGCGTGCAG
03541-1	PKD2, ex 01, M, F, g	AGCAGGCCGACTCCGGGAAG
03542-1	PKD2, ex 01, M, R, g	CAGGCAGTTGTCAACGTGCACTGG
03543-1	PKD2, ex 02, M, F, g	ACATGACCTTGTGTTTTGTTTTCCG
03544-1	PKD2, ex 02, M, R, g	TCCTGGTGCTCACGAACTTTTC
03545-1	PKD2, ex 03, M, F, g	TCTGCCTACCAGGAATCCCTTC
03546-1	PKD2, ex 03, M, R, g	CCAAGTCAGTAATTCACAGAGACAAGG
03547-1	PKD2, ex 04, M, F, g	TGCTTGCTCTTATGATCCGGGTAG
03548-1	PKD2, ex 04, M, R, g	GGGCATACGTCACACAGATAAGCAC
03549-1	PKD2, ex 05, M, F, g	TGGCAGGCACCAGTCATCTTCC

03550-1	PKD2, ex 05, M, R, g	GTCACCTGCATGGGCTAGTTTTCC
03552-1	PKD2, Maus, sp 3'-1	TTCACATATAACAAGTTCTTTGGACA
03553-1	PKD2, Maus, sp 3'-2	TCTCCCCTCTGTAAAGGGTATAGTTA
03558-1	PKD2, Maus, sp 5'	ACTTAGGCGCGTCGAAAAGGCC
03562-1	PKD2, Maus, ex 10, F	GGATAAAAAGGTGAACAAAAAGCAT
03563-1	PKD2, Maus, ex 10, R	CACACACACGCACATAAAACTATGG
03564-1	PKD2, Maus, ex 10, F2	TCTGAAGTAAAATCCTCTGTGGCCC
03565-1	PKD2, Maus, ex 11, R	GTTTGCCACCACCTTGCCGG
03566-1	PKD2, Maus, ex 02, F2	AAGACTCATGGAAGAGAGCAACGCC
03567-1	PKD2, Maus, ex 03, R2	GTACACATTGGAGCTCATCATGCCG
03568-1	PKD2, Maus, ex 02, R2	CCTGGGCAGAGAGGCTGGTGCG
03569-1	PKD2, Maus, ex 01, F2	CTTTTCAGGTACTTCTCTCGGTTGGCG
03598-1	PKD2, m, SP I, ex 11, F	TTCCTGGAACATGCTATATGTCTCC
03599-1	PKD2, m, SP I, ex 11, R	CACGTGGTCCAGCCCTAACACTG
03600-1	PKD2, m, SP I, ex 12, F	GAGCAGTTTGGGGATGACCCTATTC
03601-1	PKD2, m, SP I, ex 12, R	AAGAATATGGGGTCTTCCAGTGAGG
03602-1	PKD2, m, SP, prom, R1	ATAGTGCTTAGACTTGTCATATCCC
03603-1	PKD1, Maus, SP, R	GCGGCCTCCACCCCCCT
03604-1	PKD1, Maus, SP, ex 01, F	CCCCTGCTTTTGCGGCC
03605-1	PKD1, Maus, SP, ex 01, F	CCGGAGACCCTGGGCGCG
03606-1	PKD2, m, SP I, ex 01, F	GATCCAACCTCTGGCGTCCAGTG
03607-1	PKD2, m, SP I, ex 01, R	GACCATAGAAATTCACAAGTGAGC
03608-1	PKD2, Maus, human, ex 15, F	CCATAGGATGCTAGTCTTTGTGACCGA
03609-1	PKD2, Maus, human, ex 15, R	TCAGAAGCCCTTTGACAGTTTTCTAGC
03674-1	PKD1, Maus, F1	GAGCTCTACCGCCAGCATG
03675-1	PKD1, Maus, R1	GCAGATGAGCCACAGAAGC
03676-1	PKD1, Maus, F2	GGAATTCGGTCAAGGAGTCCGCCACA
03677-1	PKD1, Maus, R2	GGAATTCCCATTGGTGGGCTTGCCAG
03689-1	SP, pBelobac, Forward	AACGCCAGGGTTTTCCAGTCACG
03690-1	SP, pBelobac, Reverse	CACAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC
03713-1	PKD2, BAC13, T7, F	GACCTGTCTCATGCTATTACT
03714-1	PKD2, BAC13, T7, R	GACTGATGCATGAGCCAGA
03715-1	PKD2, BAC13, sp6, F	GACTCATGCCAGGCCCTCCTTCA
03716-1	PKD2, BAC13, sp6, R	GCTCCTTTGTATCTCCAGCTCA
03717-1	PKD2, AG, Intron 03	CAGCTCTTCTAGACACCCCCGTG
03718-1	PKD2, CA, Intron 05	AAGATAATCTCACAGGCTGCCAGGAAG
03719-1	PKD2, ATG, Intron 07	TGAGCATCTGGCATATTGGCAGATACAG
03814-1	PKD2	GGTCAACCATGTTGTACATTAAG
03815-1	PKD2	ACGCCATTCATGGCCATATCAATG
03816-1	PKD2, Maus, Pst1, 1F	ACTGAATTCTCAGGGGAGGCAAAGA
03817-1	PKD2, Maus, Pst1, 1R	TAAGGCTCCCAATCCAATCCTATCCCC
03821-1	PKD2, ex 02, sp, Hind3	TTCTCCATCTCGCTTACTTTGG
03822-1	PKD2, 1311, 5, R	CTTCCCCTGAGTTCCTCCCACA
03823-1	PKD2, 1311, 5, F	TGGCTCAAAGTGTGGTCTGCATTAGG
03824-1	PKD2, Maus, pH4, R	ACTTTACAAAGCTGCCCTCCACAGG
03825-1	PKD2, Maus, pH4, F	CATAATAATCTCAGGTAACAAAGC
03825-1	PKD2, Maus, H3H2, 36R	GAGTAGCCCTCTTATTCATTTGAG
03827-1	PKD2, Maus, H3H2, 36F	GTAATAATTTCTTAAAGTGCCTGGG
03828-1	PKD2, Maus, H3H1, 5aR	CTACCCGGGTGGGGCAGAAAGG
03829-1	PKD2, Maus, H3H2, 5aF	CCACTTGGA CTCTGCTGCATTGG
03831-1	PKD2, ex 04, JF7	TGGTTATGCAACGATGCAGG
03841-1	PKD2, Maus, H3N1, F1	GATTGAAACATAAACATGAATGTAGCAC
03846-1	PKD2, ex 02, con2, R	TAAACGCGTTTTTCGAGTGTAATATG
03887-1	GAPDH, F	CCATGGAGAAGGCTGGGG

Anhang

03888-1	GAPDH, R	CAAAGTTGTCATGGATGACC
03900-1	M-PKD1, X1, R	TTGAAAAACAACAGCCGGCAATGG
03901-1	M-PKD1, X1, F	GACCAGGCTGGCCTTGAACTCAGAG
03902-1	M-PKD1, SP27, F	GACCAGGCTTGAAGGTGGAGGAAGC
03903-1	M-PKD1, Pst1, 8F	CTGGCTCTACGCCAGAGAACTGGAC
03904-1	M-PKD1, P3, 1R	TGGCAAGAAATTCCCAAGCAACAAC
03909-1	PKD1, Maus, ex 03-02, R	GCCTCAGGGACAGGTGTTGAGTTCC
03910-1	mPKD1	TCCCCAGAAATAGGGTCTTACTATG
03911-1	mPKD1, H3-3, F2	GCATCTATCTTATCTTTGAAGTCAG
03912-1	mPKD1	CTCCCCACCACCCCTGCCACTCCCC
03913-1	mPKD1, P2-P4	TGCTGTGGTTGTCAAGAGGGTCATG
03917-1	PKD1, XL31, F	GGCACCGGGCTCTGTCCTGT
03918-1	PKD1, XL30, F	GGCAGCCTCTTCCCTGCCAG
03919-1	PKD1, XL27, F	GGATGCCACACGTGTTGGGC
04006-1	HPKD2, 2271, R	CTTGCCTCCTCCTTGCCGCAG
04007-1	HPKD2, 3249, R	TGGTGGCAACTGGGCGTACCG
04009-1	HPKD2, 227, F	TCGAGATGCAGCGCATCCGGC
04010-1	HPKD2, 1127, F	ATAGGGCTCCCTTTGGGCCCC
04011-1	HPKD2, 1388, R	GCCCTGGTTCCTCGGTCCAGC
04012-1	HPKD2, 2251, F	CTGCGGCAAGGAGGAGGCAAG
04050-1	mPKD2, Sonde, 1F	ACACAGCCTGGAGCACCCTGACAA
04051-1	mPKD2, Sonde, 1R	GCAGAGTAATAAGGGACCCTGGCCT
04052-1	lacZ, R2	CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
04054-1	lacZ, R3	GCCTCTTCGCTATTACGCCAGC
04055-1	lacZ, R4	GAAAGGGGGATGTGCTGCAA
04071-1	HPKD2, 6F	CGTAGGCGCACAGCGCCG
04072-1	HPKD2, 66F	GATGGTGAACCTCCAGTCGCGTGC
04086-1	mPKD2, 95F	CCATGGTTAACTCCAGACGCGTGC
04087-1	mPKD2, 0818, R	GAGCTCATCATGCCGTAGGTCAAGATG
04088-1	mPKD2, 0698, F	GACTCATGGAAGAGAGCAACGCCAAC
04089-1	mPKD2, 1392, F	GTTCTGTGTGGTCAGGTTATTGGCGG
04090-1	mPKD2, 1498, R	AATCAAAGGCAGTGACATAGCGGATCAG
04091-1	mPKD2, 1915, F	GCATACGCACAGCTGGCATACTTG
04092-1	mPKD2, 2017, R	TATCACCCAAAATGATGCGGAACTGG
04093-1	mPKD2, 3014, R	ACACGTGTGGATTATTAGGCATGGACG
04094-1	UNI, SP	CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT
04095-1	REV, SP	CAGGAAACAGCTATGAC
04154-1	Universal, SP, For	AGGGTTTTCCAGTCACGACG
04155-1	Universal, SP, Rev	GAGCGGATAACAATTTACACAGG
04303-1	EcoGFP	CGGAATTCCGGGCCGGATGAACCCCCCAGAGCC
04304-1	XbaGFP	GCTCTAGATCACTGGGTGTTGAGCTTCTTAG
04358-1	LoxP, AP, F	GGGGCCCCGGAATCCAG
04362-1	PKD1, ex 09, F, seq	GGGGTCTGTGGAGCTGA
04363-1	PKD1, ex 09, R, seq	CCACCCACCACCAGAGT
04562-1	LoxP, ATG, F	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
04563-1	LoxP, ATG, R	ATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT
04564-1	LoxP, ATG, HpaI-SalI, F	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTTAACGTCGCAC
04565-1	LoxP, ATG, HpaI-SalI, R	GTCGACGTTAACATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT
04566-1	F HindIII-ScaI-LoxP ATG-NotI,	AAGCTTAGTACTATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGGC...
04567-1	R	GCGGCCGCATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATTT...
04568-1	G3PDH, 5'	ACCACAGTCCATGCCATCAC
04569-1	G3PDH, 3'	TCCACCACCCTGTTGCTGGA
04573-1	2071-For	AGGGCAATGAGGACATGAAC

Anhang

04672-1	Pkd1, GFP, F	AGCTGGCGCTGGGTCTGCAGTG
04673-1	Pkd1, GFP, R	AGAGCAGGCGGCCATGGGC
04693-1	pBelo11, 1F	CHTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG
04694-1	pBelo11, 1R	GGATATTACGGCCTTTTAAAGACCG
04833-1	Lacz, R1	GATGGGCGCATCGTAACCGTGC
04834-1	Lacz, R2	TCACCGCGAGGCGGTTTTCTCC
04835-1	EGFP, R1	AGCTTGCCGTAGGTGGCATCGC
04836-1	EGFP, R2	GGACGTAGCCTTCGGGCATGGC
04885-1	Zeo, R,	CGGTGAGCACCGGAACGGCAC
04886-1	Zeo, F	CGAACTTCCGGGACGCCTCCG
04992-1	PKD2, CX6, F	CCTGTGAGATTATCTTTTGTTT
04993-1	PKD2, CX6, 2F	TTTTACTATGTGGTGAAGAG
04994-1	PKD2, CX8, F	GTTTGGCTTTGCTATTATGTT
04995-1	PKD2, CX8, 2F	CCTAGCGTATGCTCAGTTGG
04996-1	PKD2, CX8, R	AACATAATAGCAAAGCCAAAC
04997-1	PKD2, CX8, 2R	CCAACTGAGCATAACGCTAGG
04998-1	PKD2, CX10, R	AGCCCTTTCTGATAAGATCTG
04999-1	PKD2, CX10, R4	GTAGCCCTTTCTGATAAGATCTGAG
05001-1	PKD2, CX10, 2R4	ACTCTCTGAAATGTCATCCACGG
05000-1	PKD2, CX10-2	TCTGAAATGTCATCCACGG
05002-1	PKD1, ex 14, F	CTGTCCCGGTTCACTCACTGC
05014-1	X1F	AAATTATGCATTCCAGGCTCTAGTG
05037-1	PKD1, 7491, F	CAGCAGGGGCTACAAGCAAGGG
05038-1	PKD1, 9077, F	TTAATGAGCGCTATCTGTCCGCG
05039-1	PKD1, 9161, R	GATCCTCCTGCTGGCCGAGC
05040-1	PKD1, 9264, R	AATGGCTCGTCAGGTTTCAGGTAG
05041-1	PKD1, 1020, F	GACACCACCTACAGCATGGGACC
05042-1	PKD1, 10343, F	TGTCTGGGGACCAAAACCCC
05043-1	PKD1, 10414, R	GTGTGAGGAGGGAGCTGTCTAGCAC
05044-1	PKD1, 11876, F	TGCTGCTGTTACTGCGCCTCGAG
05045-1	PKD1, 11958, R	GACAGGCCAGTGCTGAGTCGC
05046-1	PKD1, 12678, F	GCTTTTCCTGCGTAGGCTTCGG
05047-1	PKD1, 12852, R	CCGTCTGGTTGGCTGGACGAG
05048-1	PKD1, 13483, R	GGGGGGCGAATAAATTAGCGTCTTG
05091-1	PKD2, Maus, F	GGGGATGCAGCAGGCCGACTCCGG
05092-1	PKD2, Maus, R1	CCCCGAGGCCGCCGGGGACAGC
05093-1	PKD2, Maus, R2	CGGATGCAGCTCCATCTCGATCTCC
05104-1	PKD2, Maus, 5	GCAAACCCAGGGGGAGTATGGACAG
05115-1	PKD2, Maus, 3	GCGCTCCATCTCGATCTCCAGGC
05116-1	PKD2, Maus, 5-1	GCATCAGAAAGTTCCAAAATCCAACCC
05117-1	PKD2, Maus, 3-1	CATCCCTCCTTCTTCTCCTTCCACCTC
05331-1	PKD2, L2, F	CAGAACGGGCATAGTGGAAC
05332-1	PKD2, L2, R	CCAGTAGGCAAGGAAAGCTG
05333-1	PKD2, L2, F2	GCGTATACCGAGATGGAGGA
05334-1	PKD2, L2, R2	GCCTGCTAGTGCAGCTTTCT
05395-1	3'PKD1, TG1	GGGAGGGGAAATTGCCAGGAG
05396-1	3'PKD1, TG2	CAAAAAGTTGGTCCAGCGGCC
05397-1	5'PKD1, TG1	TTGGGGCTGCAGAAGTGGCTAGG
05398-1	5'PKD1, TG2	GGCACTGTCCTCCCATGTGCAG
05399-1	uni, T17	CGTTGTAACGACGCGCCAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
05446-1	HPKD2, 66F, EcoRI	GGAATTCGATGGTGAAGTCCAGTCGCGTGC
05447-1	HPKD2, 3249R, EcoRI	GGAATTCGATGGTGGCAACTGGGCGTACCG
05448-1	3294 + EcoRI	GGAATTCGGGGATGCAGCAGGCCGACTCCGG
05449-1	mPKD2, 3014R + EcoRI	GGAATTCACACGTGTGGATTATTAGGCATGGACG

Anhang

05506-1	GFP, Rev	CGGGATCCGCTGATTATGATCTAGAGTCG
05507-1	GAPDH, T7	GCTAATACGACTCACTATAGCAAAGTTGTCATGGATGACC
05515-1	HPKD2, 767, R	CTCGGTTAGTGCTGCTTTTCCTCC
05516-1	HPKD2, 1074, R	GTCCTGGGGGATAGAGCAGGATCC
05517-1	HPKD2, 1559, R	TGAATGCGAATTTCCAATATCTCTTCC
05518-1	HPKD2, 1924, R	CAAAGACAAGGTATGCCAACTGAGC
05519-1	HPKD2, 2950, R	TGGGGCGAGGTTGACCATTTAGTC
05520-1	HPKD2, 312, R	GCACGACGAGAGCGGAGGAGAAG
05675-1	PKD1, 5', 1350	CAAAAAACCCCAAATGAGTTAGATG
05676-1	PKD1, 5', 897	GCGCACACCTTTGATCCCAAC
05677-1	PKD1, 5', 3098	CAGCCAGAGGACTTCAAGGGG
05678-1	PKD1, 5', 3120rev	CCCCTTGAAGTCTCTGGCTG
05679-1	PKD1, 5', 4886rev	TTGCCAACACTGCAAAGGTCC
05680-1	PKD1, 5', 5775rev	AACACCTGTCCCTGAGGCCTC
05681-1	PKD1, 5', 5904	TAGGTGCCCAAGGAACATTGC
05682-1	PKD1, 5', 6063	AAGGTGACGTTCTGGAAGGG
05683-1	H4, 6, 3, 3	CCCAGGCTTGTGAAGGAAGAC
05684-1	H4, 6lücke	CTGTCTCAATCTCCCCCAGTG
05685-1	S3, 1, P4, 2	CCAAGGAGCTCGGTACCAAGC
05686-1	S3, 1, x1, 1	CTCTCAAGAGTCCGCAGGAGC
06724-1	mdck, pkd1	GCCTCCCTGACAACAGCTC
06725-1	mdck, pkd1	ACAATGCTGTATGTGGCTTCC
07142-1	PKD2del 07F	CTGGATGTTGTGATCGTTGTGCTC
07143-1	PKD2 07F	GTATTTTTTGTCTGGATTAAGCTC
07144-1	PKD2 3' cDNA	ACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
07145-1	Karl	
07387-1	LACZ F	GTCACACTACGTCTGAACGT
07388-1	LACZ R	CTGCACCATTCGCGTTACG

9 Zusammenfassung

Die Autosomal Dominate Polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist eine der häufigsten monogenen Erbkrankheiten des Menschen. Mindestens 0,1% der Bevölkerung sind von dieser Krankheit betroffen. Neben völligem Versagen der stark vergrößerten und mit Zysten übersäten Nieren kann es zu weiteren lebensbedrohlichen Symptomen in anderen Organen und Systemen kommen. Zwei Gene sind bei über 99% der bekannten Fälle in die Entstehung der Krankheit involviert: PKD1 und PKD2. Nach Entdeckung der homologen Gene der Maus wurden murine Modelle erzeugt, die zum Verständnis der Pathogenese der ADPKD beitragen sollen.

In dieser Arbeit wurde ein Konstrukt erstellt, das ein Reportergen unter der Promotorkontrolle des murinen Pkd1-Gens trägt. Zur Erzeugung des Konstrukts wurde das so genannte „ET-Cloning“ verwendet. Die erzeugte transgene Mauslinie zeigte keinen auffällig veränderten Phänotyp.

Parallel wurden zwölf Antiseren gegen verschiedene Epitope des humanen Polycystin-1 auf Sektionen von Mausembryonen getestet. Nur das Antiserum PK6 aus einem Huhn zeigte eine Aktivität, die mit der aus vorherigen Untersuchungen scheinbar übereinstimmte. Da keine Präimmunsereen vorhanden waren, sollte das von PK6 erzeugte Muster mit dem der transgenen Reportermause verglichen werden. Wie sich herausstellte, wurde das Transgen durch Methylierung inaktiviert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden vier unbekannte Spleißformen des Pkd2-Gens identifiziert. Diese konnten auch in cDNAs humaner Zelllinien bzw. fötalen Gewebes nachgewiesen werden. Pkd2 Δ 6 und Pkd2 Δ 9 werden aufgrund ihrer vorzeitigen Termination der Translation wahrscheinlich vom NMD-Stoffwechselweg (nonsense mediated RNA decay) abgebaut. Pkd2 Δ 12-13 konnte nur als Fragment, aber nicht mit dem gesamten codierenden Bereich amplifiziert werden. Pkd2 Δ 7 ist eine der am häufigsten gefundenen Spleißformen und scheint für ein funktionelles Protein zu codieren. Diese Variante wurde in höchster Menge im Gehirn von Mäusen unterschiedlicher Entwicklungsstadien gefunden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Pkd2 als auch Pkd2 Δ 7 entwicklungspezifisch transkribiert werden. Das Polycystin-2 Δ 7-Protein konnte transient stabil exprimiert werden. Durch Co-Immunopräzipitation konnte gezeigt werden,

dass die Variante nicht mit Polycystin-1 interagiert, im Gegensatz zum normalen Polycystin-2. Versuche mit Fusionsproteinen geben Hinweise, dass die Polycystin-2 Δ 7 Variante trotzdem in ihrer subzellulären Lokalisation durch die Gegenwart von Polycystin-1 beeinflusst werden könnte.

10 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Jürgen Horst danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik in Münster durchzuführen.

Herrn PD Dr. Thomas Schmitt- John danke ich im besonderen Maße für die spontane Bereitschaft, diese Arbeit extern zu betreuen und mir die Möglichkeit zu geben, an der Universität Bielefeld zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. Bernd Dworniczak danke ich für die kritische Auseinandersetzung mit meiner Arbeit und den erzielten Ergebnissen.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Dr. Arseni Markoff und Frau Dr. Nadja Bogdanova. Großes Engagement, Hilfsbereitschaft und permanente Offenheit Dinge differenziert zu beleuchten und neu zu überlegen, zeichnen sie aus.

Besonders danke ich auch dem „Oehlke- Clan“, Barbara und Irene sowie Angelika und Antonio Sensale. Sie haben mir den Rücken frei gehalten, damit ich mich auf das Schreiben konzentrieren konnte. Irene möchte ich zusätzlich für das Korrekturlesen danken.

Allen, die ihren Namen hier vermissen, sei gesagt: „Ich weiß, wer ihr seid!“

Hiermit versichere ich, die Arbeit selbstständig verfasst zu haben und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen verwendet zu haben.

Karl Hackmann

Dresden, im April 2005