



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

***In vivo* Analyse der C-T Transition im Anks6 Gen**

Autor: Sabine Neudecker
Institut / Klinik: Zentrum für Medizinische Forschung
Doktorvater: Prof. Dr. N. Gretz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden transgene Rattenlinien entwickelt, die ein mutiertes *Anks6* Gen im proximalen Tubulus überexprimieren. So konnte zum ersten Mal der *in vivo* Beweis erbracht werden, dass die Expression der mutierten *Anks6* Sequenz tatsächlich eine polyzystische Nierenerkrankung induzieren kann. Die induzierte PKD wurde hinsichtlich der molekularen und histopathologischen Mechanismen, sowie den zeitlichen Abläufen der Zystogenese charakterisiert.

Die mutierte cDNA Sequenz des *Anks6* Gens wurde unter Kontrolle eines Cytomegaloviruspromotor gestellt und durch eine SV40 Region mit Intron und Polyadenylierungssignal terminiert. Die pronukleäre Mikroinjektion erzeugte fünf transgene Founder, von denen ausgehend, fünf unabhängige transgene Linien etabliert wurden. Drei dieser Founder waren Chimären (393, 395, 400), ein Founder trug multiple Integrationsstellen des Transgens (405) und nur ein Tier (402) integrierte das Transgen, wie bei pronukleären Mikroinjektionen erwartet, hemizygot. Die Expression des Transgens war im Vergleich zu anderen Geweben in der Niere am höchsten. Die renale Transgenexpression war in TGR/393, TGR/395 und TGR/402 im Northern Blot nicht bzw. nur auf niedrigem Niveau nachweisbar. TGR/400 zeigte eine Transgenexpression auf mittlerem Niveau, welche jedoch mit zunehmender Generationenzahl zunahm. In TGR/405 wurde eine starke Variabilität der Transgenexpression beobachtet, was zusammen mit einer sehr hohen Transgenübertragungsrate vom Founder auf seine Nachkommen auf eine multiple Integration des Transgens in das Genom des Founders zurückgeführt werden konnte. TGR/400 und TGR/405 entwickelten entsprechend der Höhe ihrer Transgenexpression eine unterschiedlich stark ausgeprägte polyzystische Nierenerkrankung. Zysten konnten in TGR/400 und TGR/405 bereits im Alter von zehn Tagen beobachtet werden. Größe und Anzahl der Zysten nahm mit zunehmendem Alter zu. Der Zystengrad war analog zur Höhe der Transgenexpression in TGR/400 höher als in TGR/405. Die Nierenfunktion gemessen an Harnstoff- und Kreatininspiegel im Plasma war in TGR/400 bereits in 1 Monat alten Tieren durch die PKD signifikant beeinträchtigt und verschlechterte sich mit zunehmendem Alter. In TGR/405 wurde analog zum schwächeren Phänotyp auch in 2 Monate alten Tieren keine Beeinträchtigung der Nierenfunktion beobachtet.

Die Transgenexpression konnte wie erwartet im proximalen Tubulus lokalisiert werden. Die Expression wies ein mosaikartiges Expressionsmuster auf, wie es bereits für den CMV-Promotor beschrieben worden war. Die Transgenexpression konnte mittels *in-situ* Hybridisierung vorwiegend in erweiterten Tubuli und kleinen Zysten detektiert werden. Große Zysten mit stark abgeflachtem, dedifferenziertem Epithel exprimierten das Transgen nicht mehr. Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Transgenexpression zeigte eine Expression des Transgens bereits in neugeborenen Tieren. Die Transgenexpression ist bis zu einem Alter von einem Monat gleichbleibend hoch und geht dann mit zunehmendem Zystengrad stark zurück.

Für den immunologischen Nachweis des *Anks6* Genproduktes wurden zwei Antikörper produziert. Ein in *Escherichia coli* exprimiertes Fusionsprotein von *Anks6* wurde spezifisch mit dem Antikörper SamCy(612) und einem Antikörper gegen den His-Tag des Proteins detektiert. In Nierenlysaten konnte mit dem SamCy(612) Antikörper ein Protein detektiert werden, dessen molekulare Masse nicht mit der theoretisch erwarteten molekularen Masse von *Anks6* korreliert. Im Gehirn wurde eine weitere Variante von *Anks6* mit einer anderen molekularen Masse detektiert. Die Detektion unterschiedlich großer Proteine in verschiedenen Geweben könnte in einer alternativen Spleißvariante oder in post-translationalen Modifikationen begründet sein. Immunhistologisch wurde *Anks6* in Dünnschnittpräparaten in bläschenartigen Ausstülpungen der Zellmembran gefärbt. Diese Strukturen wurden fast ausschließlich in intakten proximalen Tubuli und nur selten in Zysten beobachtet. Eine Doppelfärbung mit acetyliertem Tubulin zeigte keine einheitliche Kolo-kalisation mit Zilien.