

Dominik Grieb

Dr. med.

Charakterisierung des Armadillo-Repeat-Proteins ARM CX2 in Nierenzellen

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. Martin Zeier

Zystische Nierenerkrankungen wie die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung und die Nephronophthise sind erbliche Krankheitsbilder, bei denen es zu einer kontinuierlichen Bildung von Zysten, insbesondere in der Niere kommt. Die Zystogenese im Rahmen dieser zystischen Nierenerkrankungen ist durch eine Vielzahl von komplexen Vorgängen in der Zelle geprägt. Neuere Forschungen an zystisch veränderten Mausnieren haben außerdem ergeben, dass eine große Anzahl an Genen bei diesen erblichen Erkrankungen in der Niere dysreguliert ist. Bei einem dieser Gene handelt es sich um *Arm cx2*, dessen Genprodukt zur Familie der Armadillo-Repeat-Proteine gehört. Diese sind durch ein 42 Aminosäuren-Tandem Motiv, die sogenannte Arm-Domäne, gekennzeichnet. Sie spielen bei vielen unterschiedlichen Prozessen im Zellstoffwechsel wie der Tumorgenese und der Embryonalentwicklung, aber auch bei der Zystogenese eine wichtige Rolle. Das Armadillo-Repeat-Protein ARM CX2 ist in der Literatur bisher wenig beschrieben und insbesondere über seine Funktion in Nierenzellen war bislang nichts bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, ARM CX2 in Nierenzellen erstmalig zu beschreiben und einen Einblick in die funktionellen Eigenschaften des Proteins im Zellstoffwechsel der Niere zu erlangen. Ein spezieller Fokus wurde dabei auf die Zellmigration, einen zentralen zellulären Prozess der komplexen Zystogenese, gelegt.

Mit Hilfe der Reversen-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion konnte nachgewiesen werden, dass *ARM CX2* sowohl in einer Zelllinie des proximalen, renalen Tubulusepithels (HK-2) als auch in primären proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (PTEC) transkribiert wird. Unter Zuhilfenahme der indirekten Immunfluoreszenz gelang außerdem der Nachweis des Proteins ARM CX2 in den genannten Nierenzellen und es konnten mehrere intrazelluläre Lokalisierungen des Proteins aufgedeckt werden. Dabei zeigte sich ARM CX2 vor allem perinukleär und in der Peripherie der Zelle, wobei vor allem die Lokalisierung an den

Zellgrenzen in Form einer bandförmigen Struktur eine Assoziation des Proteins zur Zellmembran vermuten lässt.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit konnten auch eine Assoziation von ARM CX2 zu den zentralen Zytoskelettbestandteilen Actin und Mikrotubuli zeigen. Insbesondere der Nachweis von Veränderungen des zytoplasmatischen Verteilungsmusters von ARM CX2 unter reversibler Mikrotubulidepolymerisation liefert dabei außerdem erste Hinweise auf funktionelle Assoziationen von ARM CX2 und dem Mikrotubulinetzwerk. Interaktionen der Zytoskelettbestandteile Actin und Mikrotubuli spielen unter Anderem bei der Zellmigration eine wichtige Rolle. Daher kann diskutiert werden, ob ARM CX2 Interaktionen zwischen dem Actinnetzwerk und dem Mikrotubulinetzwerk moduliert und auf diesem Weg mit dem Zytoskelett funktionell assoziiert ist und Einfluss auf die Zellmigration nimmt.

Durch die gezielte Anwendung eines *in vitro Scratch-Assays* gelang es zudem, ARM CX2 in den sich bildenden Zellfortsätzen migrierender Nierenzellen, den Lamellipodien und Filopodien, nachzuweisen. Dieser Assay stellt durch die gezielte „Verwundung“ eines Zellmonolayers die unterschiedlichen Zustände einer Zelle während der Zellmigration bis zum vollständigen Verschluss der „Verwundung“ dar. Mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz kann das Verhalten einzelner Proteine in diesen Zellen beurteilt werden. Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ARM CX2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Phase des „Wunderverschlusses“ des Zellmonolayers in den Zellfortsätzen der migrierenden Nierenzellen lokalisiert ist.

Diese Arbeit liefert somit sowohl den erstmaligen Nachweis des Armadillo-Repeat-Proteins ARM CX2 in Nierenzellen als auch vielfältige Erkenntnisse über das zelluläre Verteilungsmuster des Proteins. Auf der anderen Seite konnten auch erste vielversprechende Hinweise auf eine funktionelle Assoziation von ARM CX2 mit dem Zytoskelett und vor allem auf eine Beteiligung des Proteins bei der auch für die Zystogenese so wichtigen Zellmigration gewonnen werden. Somit sind die Ergebnisse dieser Arbeit eine wichtige Basis für Folgestudien, in denen der genaue Stellenwert von ARM CX2 bei der Zystogenese näher beurteilt werden kann. Zu diesem Zweck ist es wichtig, einen Schwerpunkt auf die funktionelle Rolle von ARM CX2 bei der Zellmigration und insbesondere auf mögliche Interaktionen mit dem Actin- und Mikrotubulinetzwerk zu legen. Hierdurch können auch neue Erkenntnisse gewonnen werden, die in der Zukunft zu einem besseren Verständnis der komplexen Abläufe der Zystogenese bei den zystischen Nierenerkrankungen beitragen.