



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Charakterisierung des polyzystischen Nierenproteins PKD2 und seiner L703-Deletionsmutante in permanenten Zelllinien

Autor: Anna Cedzich
Institut / Klinik: Zentrum für Medizinische Forschung
Doktorvater: Prof. Dr. N. Gretz

Die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist die häufigste erbliche Erkrankung der Niere. Sie wird durch Mutationen in mindestens drei Genen verursacht. Das *PKD2*-Gen, das bei etwa 10 bis 15 % aller Patienten mit ADPKD mutiert ist, wurde erst 1996 kloniert. Sein Produkt ist ein 110 kDa großes Membranprotein mit hoher Homologie zu Calcium-Kanälen. Die pathogenetische Rolle des PKD2-Proteins bei der Entstehung der polyzystischen Nierenerkrankung ist bis heute unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die zellbiologischen und biochemischen Eigenschaften des Wildtyp-PKD2-Proteins sowie der L703-Deletionsmutante, die einen verkürzten COOH-Terminus besitzt, zu charakterisieren. Hierzu wurden permanente Zelllinien entwickelt, die diese beiden Proteine sowohl konstitutiv als auch regulierbar unter Anwendung des tet-off-Systems exprimierten. Mittels Immunzytochemie wurde festgestellt, daß das Wildtyp-PKD2-Protein in allen Zelllinien mit einem Markerprotein des ER kolokalisiert, während die Deletionsmutante in induzierbaren HeLa-Zellen mit der Plasmamembran assoziiert ist. Eine Unterstützung für diesen Befund lieferten die biochemischen Analysen, in denen nach der metabolischen Markierung die Sensitivität des Wildtyp-PKD2-Proteins sowie die Resistenz der Mutante gegenüber der Glykosidase Endo H demonstriert wurde. Unter Anwendung der metabolischen Markierung mit anschließendem Phosphatase-Verdau konnte außerdem die Phosphorylierung des Wildtyp-PKD2-Proteins, aber nicht der Deletionsmutante gezeigt werden.

Die Behandlung entsprechender Zellen mit der F-Aktin-destabilisierenden Substanz Cytochalasin D führte zur Umverteilung des mutierten PKD2-Proteins, was auf die Notwendigkeit eines intakten Aktin-Zytoskeletts für die Plasmamembranlokalisation dieses Proteins hinweist. Auch das monomere G-Protein Rho scheint an der korrekten Verteilung der Deletionsmutante beteiligt zu sein, was in Versuchen mit Y-27632, einem Rho-Kinase-Inhibitor, beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Verteilung des Wildtyp-PKD2-Proteins weder durch Cytochalasin D noch durch Y-27632 verändert. Unter Anwendung der "representational difference analysis" (RDA) wurde festgestellt, daß sowohl das Wildtyp-PKD2-Protein als auch die Deletionsmutante unter anderem die Expression von ER- und Zytoskelett-assoziierten Proteinen beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die zellbiologischen und biochemischen Konsequenzen, die aus einer COOH-terminalen Mutation des Wildtyp-PKD2-Proteins resultieren, gezeigt. Zusammen mit weiterführenden Arbeiten sollen diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der ADPKD beitragen.