Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung des Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) bei der Differenzierung der Tubulusepithelzellen von Säugetieren

Petra Mühlenhardt

München 2006

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Abteilung Innere Medizin IV
Nephrologie und Allgemeinmedizin
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. G. Walz
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Eingereicht über den Lehrstuhl für
Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. W. Schmahl

Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung des Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) bei der Differenzierung der Tubulusepithelzellen von Säugetieren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Petra Mühlenhardt

aus München

München 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer
Referent:	Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent:	Univ.-Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 28.Juli 2006

Inhaltsverzeichnis

Einleitung **1**

1.1 Die Tim Genfamilie **1**

1.1.1 Identifizierung der *Tim* Genfamilie 1

1.1.2 Struktur der Tim-Proteine 1

1.1.3 Die Bedeutung von Kim-1 bei Nierenerkrankungen und bei der epithelialen Polarität 5

1.1.4 Kim als Biomarker 8

1.1.5 Kim-1 im primären Zilium 8

1.1.6 Das konservierte Tyrosin von Kim-1 wird durch ITK phosphoryliert 9

1.2 Der Wnt Signaltransduktionsweg **10**

1.2.1 Der Wnt/ß-Catenin Signalweg 10

1.2.2 Der alternative Wnt/JNK Signalweg 12

1.3 Ziel und Hintergrund dieser Arbeit 13

Materialien **14**

2.1 Materialien und Lösungen **14**

2.1.1 Zellkultur 14

2.1.2 Transfektion 15

2.1.3 Vektoren 15

2.1.4 Zelllyse 16

2.1.5 SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot 16

2.1.6 Immunfluoreszenz 18

2.1.7 DNA-Technologien 18

Methoden **19**

3.1 Zellkultur **19**

3.1.1 Kultivierung der Zellen 19

3.1.2 Passagieren von Zellen 19

3.1.3 Transiente Transfektion 19

3.1.4 Bestimmung von zytosolischem Beta-Catenin 20

3.1.5 Luziferase Assay 20

3.1.6 Statistik 21
3.1.7 Virusherstellung 21
3.1.8 Immunfluoreszenz 22
3.2 Proteinbiochemische Methoden 23
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 23
3.2.2 Western Blot (Immunoblot) 24
3.3 Molekularbiologische Methoden 24
3.3.1 Ligation 24
3.3.2 Transformation und Amplifikation rekombinanter DNA 24
3.3.3 Minikultur und Minipräparation 25
3.3.4 Maxikultur und Maxipräparation 25
3.3.5 Agarose Gelelektrophorese 26
3.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA 26
3.3.7 DNA-Sequenzierung 27
3.3.8 Knock-Down von mKim-i-1 durch RNA-Interferenz 27

Ergebnisse 30
4.1 Kim-1 ist in-vivo im primären Zilium von Tubulusepithelzellen in Mäusenieren lokalisiert. 30
4.2 Die Expression von Kim-1 korreliert mit dem Differenzierungsgrad von tubulären Epithelzellen 32
4.3 Kim-1 moduliert den Wnt Signaltransduktionsweg 33
4.3.1 Kim-1 antagonisiert die Wirkung von Dvl 33
4.3.2 Kim-1 reduziert zytosolisches ß-Catenin 34
4.3.3 Kim-1 aktiviert AP-1 35
4.4 Effizienter Knock-down von murinem und caninem Kim-1 in IMCD und MDCK-Zellen 36
4.4.1 Einfluß der Knock-down Konstrukte *mkim-i-1* und *dkim-i-1* auf das Tight junction Protein ZO-1 37
4.4.2 Untersuchungen des Einflusses der Knock-down Konstrukte *mkim-i-1 plvth* und *dkim-i-1* auf die Ziliogenese 42

Diskussion **48**

5.1 Kim-1 ist ein ziliäres Signaltransduktionsmolekül **48**

5.2 Die Rolle von Kim-1 in der epithelialen Differenzierung **49**

5.3 Kim spielt keine essentielle Rolle in der Ziliogenese **51**

5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick **52**

Zusammenfassung **54**

Summary **56**

Literatur **58**

Abbildungsverzeichnis **65**

Danksagung **69**

Lebenslauf **70**

Kapitel 1
Einleitung

1.1 Die Tim Genfamilie

1.1.1 Identifizierung der *Tim* Genfamilie

In der westlichen Welt reagieren 40% der Bevölkerung auf eine Vielzahl von Umweltantigenen mit erhöhter Produktion von Immunglobulin E (IgE). Diese Veranlagung nennt man Atopie. Atopische Menschen haben einen im Vergleich zur Normalpopulation höheren Gesamtspiegel an IgE und höhere Konzentrationen an eosinophilen Granulozyten im Blut, zudem sind sie anfälliger für allergische Erkrankungen wie Heuschnupfen, Asthma oder atopische Dermatitis. Aufgrund genetischer Untersuchungen in betroffenen Familien hat man Loci auf Chromosom 11q und 5q als Genorte ermittelt, die bei der Veranlagung zur Atopie von Bedeutung sein könnten.[21,50] Die meiste Beachtung erhält der Chromosomenabschnitt 5q23-35, weil hier eine große Zahl von Genen festgelegt ist, die die Asthmaanfälligkeit unterstützen. Durch den Vergleich Asthma-resistenter DBA/2 Mäuse mit Asthma-anfälligen BALB/c Mäusen wurde eine Region auf Maus Chromosom 11 identifiziert, *Tapr* (engl.: *T cell and airway phenotype regulator*), die die Anfälligkeit für die beobachtete T_H2-Zytokinproduktion und die bronchiale Hyperreagibilität, auch AHR (engl.: *airway hypersensitivity reaction*) genannt, vermittelt.[51] DBA/2 Mäuse sind im murinen Asthmamodell resistent, weil sie unter anderem verminderte IL-4 Produktionen zeigen. Bei Patienten mit Asthma geht eine Prädominanz von T_H2-Zellen mit Freisetzung von IL-4 und IL-5 einher, was die B-Lymphozyten zur Produktion von IgE anregt und in der Lunge zu einer typischen eosinophilen Entzündung führt. Innerhalb der *Tapr* Region wurde über positionelle Klonierung eine neue Genfamilie, die *Tim*-Familie (*t-cell immunglobulin mucin*), entdeckt, welche für membran-ständige T-Zell-Glykoproteine kodiert.[51]

1.1.2 Struktur der Tim-Proteine

Alle Tim Proteine sind Typ-1 Transmembranproteine und gehören der IgSF (*Immunglobulin-Superfamilie*) an, die zusammen mit den Integrinen, Cadherinen und

Selektinen die Gruppe der CAMs (*cell adhesion molecules*) bilden.[29] Da die Proteine dieser Genfamilie auf T-Zellen exprimiert werden, eine Immunglobulin V-ähnliche Domäne und eine Mucin-ähnliche Domäne enthalten, wurden sie Tim-Proteine genannt.

Die *Tim* Familie befindet sich bei der Maus auf dem Chromosom 11B1.1 mit 8 Genen (*Tim*-1 bis *Tim*-8) und mit 3 Genen (*TIM*-1, -3 und -4) auf dem humanen Chromosom 5q33.2. Zusätzlich existieren noch *Tim* Pseudogene auf anderen Chromosomen.[38] Die genomische Erstbeschreibung der Familie der *Tim* Gene erfolgte im Jahre 2001 durch die Arbeitsgruppe um McIntire et al., die eine Assoziation der Polymorphismen der *Tim* Familie mit murinem Asthma nachweisen konnten.[21,51]

Alle Tim Proteine besitzen eine *Immunglobulin Domäne*, die charakteristisch für Proteine der Immunglobulin-Superfamilie ist. Hierzu zählen Antikörper, T-Zell-Rezeptoren, MHC Moleküle und andere Moleküle. Man unterscheidet dabei 2 Haupttypen: die C-Domänen und die V-Domänen. Die Tim Familie besitzt eine Immunglobulin-V Domäne, die neben den 2 bei Immunglobulinen herkömmlichen noch 4 zusätzliche Cystein Reste aufweist. Sie vermittelt Zell-Zell oder Zell-Matrix Protein Interaktionen.[32]

Die Größe der *Mucin Domäne* variiert stark zwischen den einzelnen Mitgliedern der Tim Familie. Mucine sind gekennzeichnet durch einen hohen Gehalt an Serin, Threonin und Prolin Resten sowie einer O-verknüpften Glykosilierung der Serin- und Threonin-Reste.[29] Tim-3 besitzt die kürzeste Domäne und die geringste Zahl an O-Glykosilierungsstellen.

Die *zytoplasmatische Domäne* der Tim Proteine besteht aus 42-77 Aminosäuren und ist die am stärksten konservierte Domäne zwischen den Maus und Mensch Orthologen.[54] Bemerkenswert ist das bei Tim-1, Tim-2 und Tim-3 enthaltende intrazelluläre Tyrosinkinase Phosphorylierungsmotiv.[38] Eine elektronische Analyse dieses Motivs durch ein Internet-basiertes Programm, das Proteindomänen auf seine Signaltransduktionsfunktion analysiert (www.scansite.mit.edu) prädiziert, das durch die Phosphorylierung des konservierten Tyrosins durch Tyrosinkinasen eine

Bindungsstelle für eine Proteindomäne resultiert. Sie wird SH_2-Domäne (*src-Homologie-Domäne vom Typ 2*) genannt.
Eine strukturelle Ähnlichkeit verbindet die Tim Proteine mit MAdCAM-1 (engl.: *mucosal addressin cell adhesion molecule-1*), einem Zell-Adhäsions-Molekül, das auf der Schleimhaut exprimiert wird und aus 2 Immunglobulin Domänen und einer Mucin Domäne besteht. Es bindet an $\alpha_4\beta_7$ Integrin[7,36,37] und reguliert den Eintritt von Lymphozyten in das Lymphgewebe der Schleimhaut.

Im Folgenden werden die wichtigsten Tim Proteine kurz vorgestellt.

Tim-1

Das erste *Tim*-Gen, *Tim-1*, wurde ursprünglich als HAVcr (engl.: *Hepatitis A virus cellular receptor*) identifiziert und kurz darauf als KIM-1 (engl.: *kidney injury molecule-1*) beschrieben.[18,24,29,33] Tim-1 wirkt als Rezeptor, an den das Hepatitis A Virus bindet, um dann in die Zelle internalisiert zu werden. In der Niere wird Kim-1, das unter normalen Bedingungen nur gering exprimiert wird, nach Schädigung der Tubulusepithelzellen hochreguliert (siehe nachfolgend). In T-Zellen wird Tim-1 auf $CD4^+$ Zellen nach Differenzierung zu T_H2 Zellen exprimiert. Eine Fehlregulation dieser T-Zellen ist mit einer Asthma- und Allergieanfälligkeit assoziiert.[50,51] Polymorphismen in TIM-1 sollen phänotypisch mit AHR (engl.: *airway hypersensitivity reaction*) in kongenen Mäusen in Verbindung stehen.[21,51] Durch die Bindung seines physiologischen, endogenen Liganden Tim-4 wird Tim-1 aktiviert. Tim-4 wird nur auf Antigen präsentierenden Zellen exprimiert und bewirkt zusammen mit CD3 und CD28 eine Hyperproliferation der T-Zellen. Die Interaktion zwischen Tim-1-Tim-4 scheint somit die klonale T-Zell Proliferation zu regulieren.[53,81] Die Aktivierung von Tim-1 verhindert außerdem die Entwicklung respiratorischer Toleranz und fördert pulmonale Entzündungen.[79-81]

Tim-2

Dieses in der Maus beschriebene Protein besitzt kein humanes Ortholog. Tim-2 hat große strukturelle Ähnlichkeit mit Tim-1 und wird ebenfalls auf $CD4^+$ Zellen exprimiert.[49] Kürzlich wurde das Klasse IV Semaphorin Sema4A als Tim-2 Ligand identifiziert. Die Bindung von Sema4A an Tim-2 resultiert in der Phosphorylierung des intrazellulär konservierten Tyrosins. Man vermutet, dass Tim-2 als Rezeptor

fungiert und durch Tyrosin Phosphorylierung Signale transduziert. Sema4A wird auf aktivierten Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert. Mit Hilfe der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell zur Erforschung der Multiplen Sklerose, konnte gezeigt werden, dass mit spezifischen Antikörpern gegen Sema4A die EAE verhindert wird, indem sie die Produktion von Antigen spezifischen T_H-Zellen, IFN-γ und IL-4 hemmen. Daraus lässt sich schließen, dass Tim-2 und sein Ligand Sema4A wichtig für die frühe klonale Expansion und Zytokinherstellung sind.[42]

Tim-3

Der intrazelluläre Teil des Tim-3 Moleküls enthält 6 Tyrosine, wovon eines sich innerhalb des konservierten Tyrosin-Phosphorylierungsmotives befindet.
Immunologisch betrachtet wird Tim-3 auf T_H1-Zellen exprimiert.[34] In vivo Experimente in einem EAE Mausmodell (siehe oben) haben gezeigt, dass die Hemmung von Tim-3 die Aktivierung und Expansion von Makrophagen erhöht und einen schwereren Krankheitsverlauf mit erhöhter Mortalität nach sich zieht.[49,54,69] Der Mechanismus zur Aktivierung der Makrophagen ist noch unklar. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen Tim-3 auf T_H1-Zellen und seinem potentiellen Liganden Galectin-9 auf der Oberfläche von Makrophagen zur Aktivierung und klonalen Expression der Makrophagen führt.[38,69,88] Aufgrund der Tatsache, dass die Interaktion zwischen Tim-3 und Galectin-9 eine T_H1 Immunantwort hemmt, wird möglicherweise die Entwicklung einer peripheren Toleranz verstärkt.

Tim-4

Dieses Protein unterscheidet sich von den anderen Tim Mitgliedern dadurch, dass es keine konservierte Tyrosindomäne besitzt, dafür aber eine RGD Sequenz im Immunglobulin Teil. Diese Sequenz besteht aus einer Vielzahl von sauren Aminosäuren und wird oft in Liganden gefunden, die Integrin binden können. Demnach könnte Tim-4 eine Rolle als Zelladhäsionsmolekül spielen.
Tim-4 wird nicht auf T-Zellen, sondern nur auf $CD11b^+$ und $CD11c^+$ Antigen präsentierenden Zellen und lymphatischen, dendritischen Zellen exprimiert.[53] Wegen seiner Expression in peripheren lymphatischen Geweben und der Herabregulierung in Lymphotoxin-α defizienten Mäusen hat die Arbeitsgruppe um Shakhov et al.

dieses Protein auch SMUCKLER (engl.: *spleen mucin-containing knockout of lymphotoxin*) genannt.[72]

Erst vor kurzem wurde Tim-4 als der natürliche Ligand von Tim-1 erkannt. Die Interaktion beider Proteine reguliert die klonale T_H2-Zell Proliferation und Differenzierung.[53]

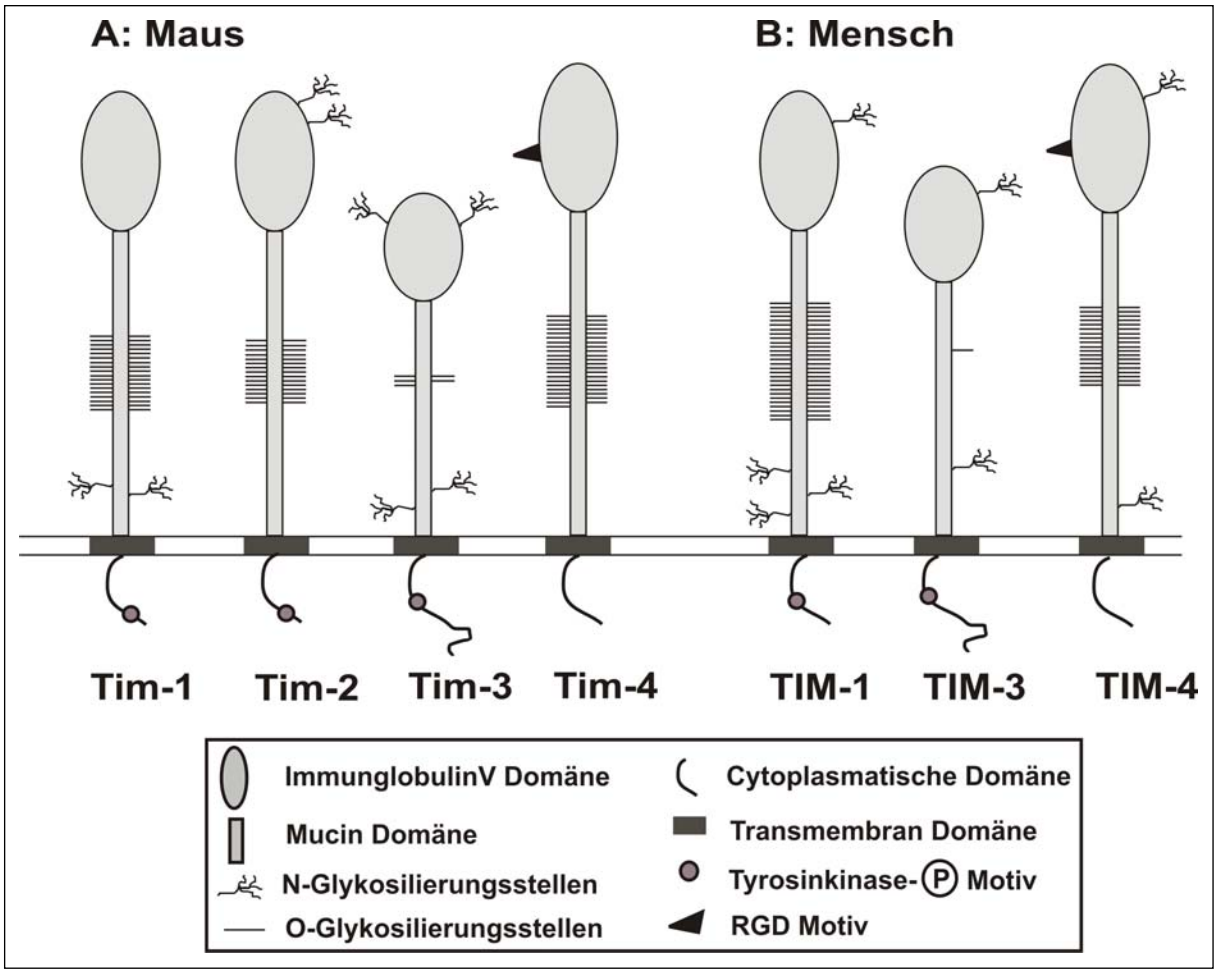

Abbildung 1: Die Struktur der Tim-Familie bei Maus und Mensch. Modifiziert nach Kuchroo, 2003.

1.1.3 Die Bedeutung von Kim-1 bei Nierenerkrankungen und bei der epithelialen Polarität

Das renale proximale Tubulusepithel ist aufgrund seiner hohen metabolischen Aktivität sehr sensitiv gegenüber Ischämie und toxischen Schädigungen durch Medikamente oder Toxine. Da das Auftreten von Tubulusepithelzellschädigungen im Menschen mit einer stark erhöhten Mortalität assoziiert ist,[11] kann die Identifizierung renaler Schädigungen zu einem frühen Zeitpunkt gravierende Auswirkungen auf Therapie und Prognose der betroffenen Patienten haben. Die anatomischen und

funktionellen Veränderungen, welche als Reaktion auf einen ischämischen oder toxischen Schaden im proximalen Tubulusepithel auftreten, sind vorwiegend in der Ratte und der Maus in einem renalen Ischämie-/Reperfusionsmodell untersucht worden.[4,29,84] Hierzu werden den Tieren unter Narkose eine Nierenarterie und -vene für ca. 30-45 Minuten abgeklemmt und anschliessend reperfundiert. Immunhistologische Untersuchungen ergaben, dass es in der frühen Postischämiephase primär zu einem Verlust der Zellpolarität kommt, erkennbar an einem frühen Zusammenbruch der Zonulae occludentes und adhaerentes (Tight und Adherent junction), sowie der zytoskeletalen Integrität und einer gestörten Na/K ATPase Verteilung an die apikale Membran. Es zeigen sich Nekrose und Apoptose, in den überlebenden Zellen lässt sich Vimentin als Zeichen der Dedifferenzierung nachweisen. Neues dedifferenziertes, regeneratives Epithel migriert über die freiliegende Basalmembran. Zum Schluß proliferieren überlebende proximale Tubuluszellen und regenerierende Epithelzellen differenzieren sich, um ein neues funktionstüchtiges proximales Tubulusepithelium zu bilden[30,74] (siehe Abbildung 2).

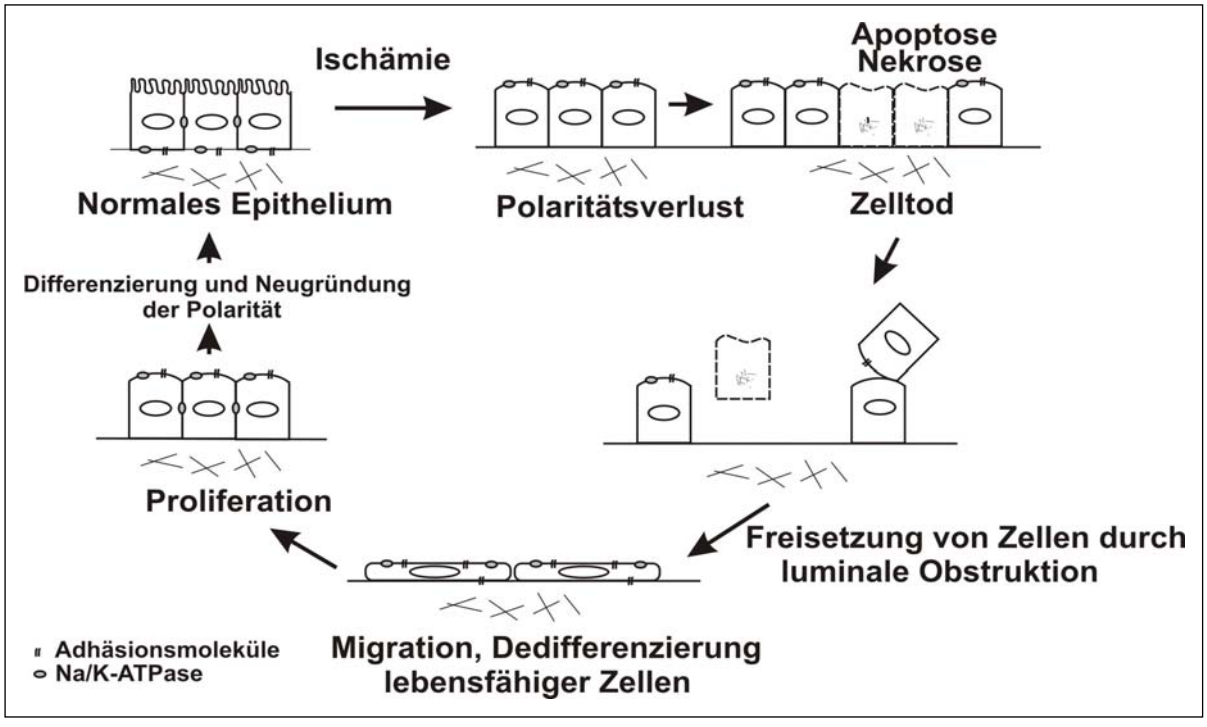

Abbildung 2: Eine Ischämie resultiert in reversiblen und irreversiblen Schädigungen des proximalen Tubulusepithels. Die Na/K-ATPase ist basolateral an der Zellmembran lokalisiert: Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. Integrin sitzen basal. Bei Ischämie sind die Na/K-ATPase apikal und die Zelladhäsionsmoleküle lateral und basal lokalisiert. Einige verletzte Zellen werden nekrotisch oder apoptotisch, während andere lebensfähige Zellen dedifferenzieren, über die freiliegende Basalmembran migrieren und ein neues funktionstüchtiges Epithel bilden. Modifiziert nach Sheridan, 2003.

Kim-1 wird in gesunden Nieren nur minimal exprimiert, und erst 8-48 Stunden nach einem ischämischen Ereignis von den proximalen Tubuluszellen hochreguliert.[29] Man geht davon aus, dass Kim-1 eine Rolle in der Dedifferenzierung und Proliferation der überlebenden Tubulusepithelzellen spielt und damit einen wichtigen Beitrag zur Regeneration des Tubulusepithels liefert. Dabei ist auch von Interesse, dass das Zebrafisch-Ortholog von Kim-1 in der regenerierenden Flosse exprimiert ist,[12] was auf eine weiterreichende konservierte Rolle von Kim-1 schließen lässt.

Erhöhte Kim Expression wird auch bei der autosominal dominant vererbten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) beobachtet.[40] Dabei entwickeln sich die Zysten aus proximalen Nephronabschnitten und Sammelrohren. Mutationen im *PKD1* oder *PKD2* Gen führen zu Veränderungen des Epithels und der Basalmembran, was dazu führt, dass aus dem resorbierenden ein sezernierendes Epithel wird.
Den betroffenen Patienten wird ein normales und ein mutiertes *PKD* Gen vererbt. Im Laufe des Lebens kommt es zu einer zufälligen Mutation des normalen Gens (*second hit Hypothese*).[31] Dieser Verlust der Heterozygotie führt daraufhin zu einer Dedifferenzierung und Proliferation der renalen Tubuluszellen im Epithelverband und ist mit einer gestörten Polarität dieser Zellen assoziiert. Dies führt zu der Erweiterung des tubulären Lumens und damit ultimativ zu abgekapselten Zysten, die an Größe zunehmen und benachbarte Strukturen komprimieren. Normales Nierenparenchym atrophiert und fibrosiert, wodurch eine ausreichende Nierenfunktion nicht mehr gewährleistet ist.[83]

Genetisch funktionelle Untersuchungen in 2 murinen Stämmen mit vererbter PKD, der ORPK und der CPK-Maus, führten zu der Erkenntnis, dass die Genprodukte der mutierten Gene unter physiologischen Bedingungen im so genannten Primärzilium von Tubulusepithelzellen lokalisiert sind. Das murine CPK-Modell (engl.: *congenital polycystic kidney*), welches Mutationen im für Cystin codierenden *Cys1* Gen trägt, führt ebenso wie das ORPK Mausmodell (engl.: *Oak Ridge polycystic kidney*) mit einer Mutation des *Tg737* Gens zu einer massiven Nierenzystenbildung mit schneller Progression zur Niereninsuffizienz.[22,26,78] Mittlerweile konnte für sämtliche Proteine, deren Funktionsverlust mit PKD assoziiert ist eine Lokalisation in Zilien nachgewiesen werden.[59,65,66,83,87] Funktionelle Daten zeigen, dass das Primärzilium

als Flusssensor funktioniert. Dabei führt die Auslenkung des Ziliums durch einen Flüssigkeitsstrom zum Kalziumanstieg innerhalb der Zelle.[16,56,65,66] Man geht davon aus, dass dieser Mechanismus weitreichende nachgeschaltete Signaltransduktionswege aktiviert, die die Polarität der Tubulusepithelzellen im Epithelverband kontrollieren. Neue Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Walz und Dr. Kühn zeigen, dass Kim-1 im Primärzilium lokalisiert ist (s.u.).[39] Diese Tatsache, in Verbindung mit den oben erläuterten strukturell-funktionellen Überlegungen, lässt eine Funktion von Kim-1 in der ziliären Signaltransduktion vermuten.

1.1.4 Kim als Biomarker

Die Kim-1 Ektodomäne, bestehend aus der Immunglobulin- und Mucin Domäne, kann abgespalten und als lösliche Form mit dem Urin ausgeschieden werden. Die Spaltung erfolgt durch eine Metalloproteinase nahe der Transmembran Domäne.[3] Kim-1 gilt somit als sensitiver Urinmarker für proximale Tubuluschädigungen und lässt fortschreitende renale pathologische Prozesse vermuten, noch bevor es zu einem signifikanten Serum-Kreatinin Anstieg kommt.[23-25]

1.1.5 Kim-1 im primären Zilium

Primäre Zilien kommen in der Niere in allen Abschnitten des Nierentubulussystems in einer Anzahl von 1-2 Zilien pro Epithelzelle vor. Sie ragen mit einer Länge von 2-10 µm in das Tubuluslumen. Durch die Entdeckung, dass viele im primären Zilium lokalisierte Proteine eine wichtige Rolle bei der Entstehung von zystischen Nierenerkrankungen spielen, sind Zilien in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.[62]

Bei den primären Zilien handelt es sich, um nicht aktiv bewegliche, in ein Lumen reichende mikrotubuläre Strukturen, die durch intraflagellaren Transport (IFT) vom Basalkörperchen aufgebaut werden.[68] Sie bestehen aus 9 paarigen im Kreis angeordneten Mikrotubuli, die neben einer Stützfunktion auch eine Funktion als Leitschiene für die ins Zilium zu transportierenden Proteine haben.

Diskutiert wird zusätzlich eine Funktion der Zilien als Mechanosensoren. Hierbei führt ein Abbiegen des Ziliums durch einen Flüssigkeitsstrom zu einem Ca^{2+} Einstrom in die Zelle.[56,65,66] Es wird angenommen, dass diese Funktion notwendig ist, um die epitheliale Polarität aufrecht zu erhalten und damit unter anderem den intratubulären Durchmesser zu regulieren.[39]

Aktuelle Studien belegen, dass Inversin, ein Protein des Zilienkomplexes, eine Brücke zwischen Zilien-basierenden Prozessen und intrazellulären Signaltransduktionswegen, wie zum Beispiel dem Wnt Signalweg, bildet. Dabei fungiert Inversin als molekularer Schalter zwischen den verschiedenen Wnt Signalkaskaden, indem es den non-kanonischen Wnt Weg aktiviert.[76] Neueste Ergebnisse konnten zeigen, dass Kim-1 im Zilium lokalisiert ist, mit Inversin interagiert und somit möglicherweise Einfluß auf den Wnt Signalweg (siehe Kap. 1.2) nimmt. [39]

1.1.6 Das konservierte Tyrosin von Kim-1 wird durch ITK phosphoryliert

In Voruntersuchungen innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Frage der Signaltransduktion von Kim-1 untersucht. Ein Vergleich von humanen und murinen Kim-1 und Tim-3 Formen lässt eine hoch konservierte Domäne um Y350 von Kim-1 erkennen (Abb.3), die nach Phosphorylierung des Tyrosins eine SH_2-Bindungsstelle darstellen könnte (siehe auch oben). Mit Hilfe der humanen Kim-1 Mutanten Y350F und Y314F, bei denen die beiden konservierten Tyrosine durch Phenylalanin ersetzt wurden konnte gezeigt werden, dass nur Tyrosin 350 phosphoryliert wird. Ein Screen mit Koexpression verschiedener Kinasen zeigte, dass die Interleukin induzierbare T-cell Kinase (ITK) Kim-1 spezifisch an Y350 phosphoryliert.

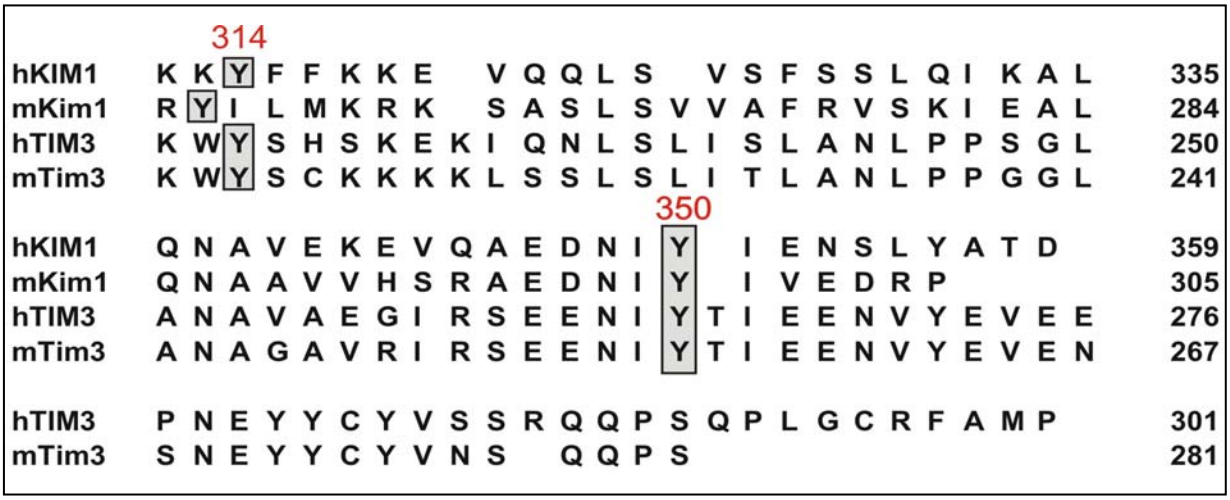

Abbildung 3: Intrazelluläre Region von humanem und murinem Kim-1 und Tim-3. Kim-1 besitzt in seiner intrazellulären Region hochkonservierte Tyrosine, die durch die induzierbare T-Zell Kinase phosphoryliert werden. Y350 liegt in einer hoch konservierten Region. Ein weiteres konserviertes Y 314 ist Nahe der Transmembran Region lokalisiert. Modifiziert nach Kuehn, 2005.

Das *ITK*-Gen liegt in unmittelbarer Nachbarschaft der Tim Genfamilie und Polymorphismen in *ITK* und *Tim-1* sind beide unabhängig voneinander mit Atopie assoziiert.[21] Daraus lässt sich schließen, dass es eventuell einen gemeinsamen Signalweg für Kim-1 und ITK in epithelialen und T-Zellen gibt.
Kim-1 wird in lipid rafts (engl.: *raft=Floß*) rekrutiert. Dies sind Komplexe aus Sphingolipiden, Cholesterin und Proteinen, die in der fluiden Zellmembran wie „Flöße" auf einem See flottieren. Sie können Signalmoleküle schwach binden und mit ihnen an Signalrezeptoren andocken. Durch Endozytose werden die „Lipidflöße" samt Rezeptor ins Zellinnere gebracht.[75,77] Obwohl auch ITK mit lipid rafts assoziiert ist hat die Y350 Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Einbeziehung von Kim-1 in lipid rafts.[39]

1.2 Der Wnt Signaltransduktionsweg

Die Wnt (engl.: Wingless, INT) Proteine sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die eine entscheidende Rolle in der frühen Embryonalentwicklung von Vertebraten und Evertebraten spielen. Zudem regulieren sie die Differenzierung, Proliferation und Polarisation von Zellen.[58,60,88] Diese Proteine binden an ihren Rezeptor und wirken auf ihre Zielzellen, indem sie drei verschiedene Signalkaskaden aktivieren. Der klassische, kanonische oder Wnt/ß-Catenin Signalweg steuert über den zytosolischen β-Catenin Gehalt die Expression von Zielgenen. Dem stehen die beiden alternativen, nicht-kanonischen Signalwege gegenüber: zum einen der Wnt/Ca^{2+} Signalweg,[41] der über eine intrazelluläre Kalziumerhöhung wirkt und zum anderen der planar cell polarity (PCP) Signalweg bei Drosophila, der für die planare Zellpolarität in Auge und Flügel verantwortlich ist.[41,47]

1.2.1 Der Wnt/ß-Catenin Signalweg

In Abwesenheit eines Wnt Signals bindet β-Catenin an einen Proteinkörper, der aus Axin, APC, GSK3β und CK1α besteht. Wie in Abbildung 4 dargestellt ermöglicht dieser die Phosphorylierung von β-Catenin an N-terminalen Serin- und Threoninresten durch CK1α und GSK3β. Nur phosphoryliertes β-Catenin wird von dem Protein β-TrCP erkannt, anschließend ubiquitiniert und in Proteasomen abgebaut.[57,82] Bindet ein Wnt Protein an seine Rezeptoren Frizzled und LRP, so wird der β-Catenin Abbau gestoppt und β-Catenin akkumuliert in der Zelle.[48] Das Wnt

Signal wird vom Rezeptorkomplex auf das Protein Dishevelled (Dvl) übertragen und dieses damit aktiviert. Dvl bindet an Axin und inaktiviert auf diese Weise den ß-Catenin Degradationskomplex, bestehend aus Axin, GSK3β, APC und CK1α.[43] Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner von Dishevelled, das GSK3 Bindeprotein (GBP) bindet an GSK3β und verhindert so die Interaktion zwischen GSK3β und Axin.[17] Die Konsequenz daraus ist, dass β-Catenin nicht mehr phosphoryliert und somit nicht von β-TrCP erkannt wird. β-Catenin wird nicht mehr abgebaut und akkumuliert im Zytoplasma und im Kern der Zelle. Im Kern interagiert β-Catenin mit LEF/TCF Faktoren.[64]

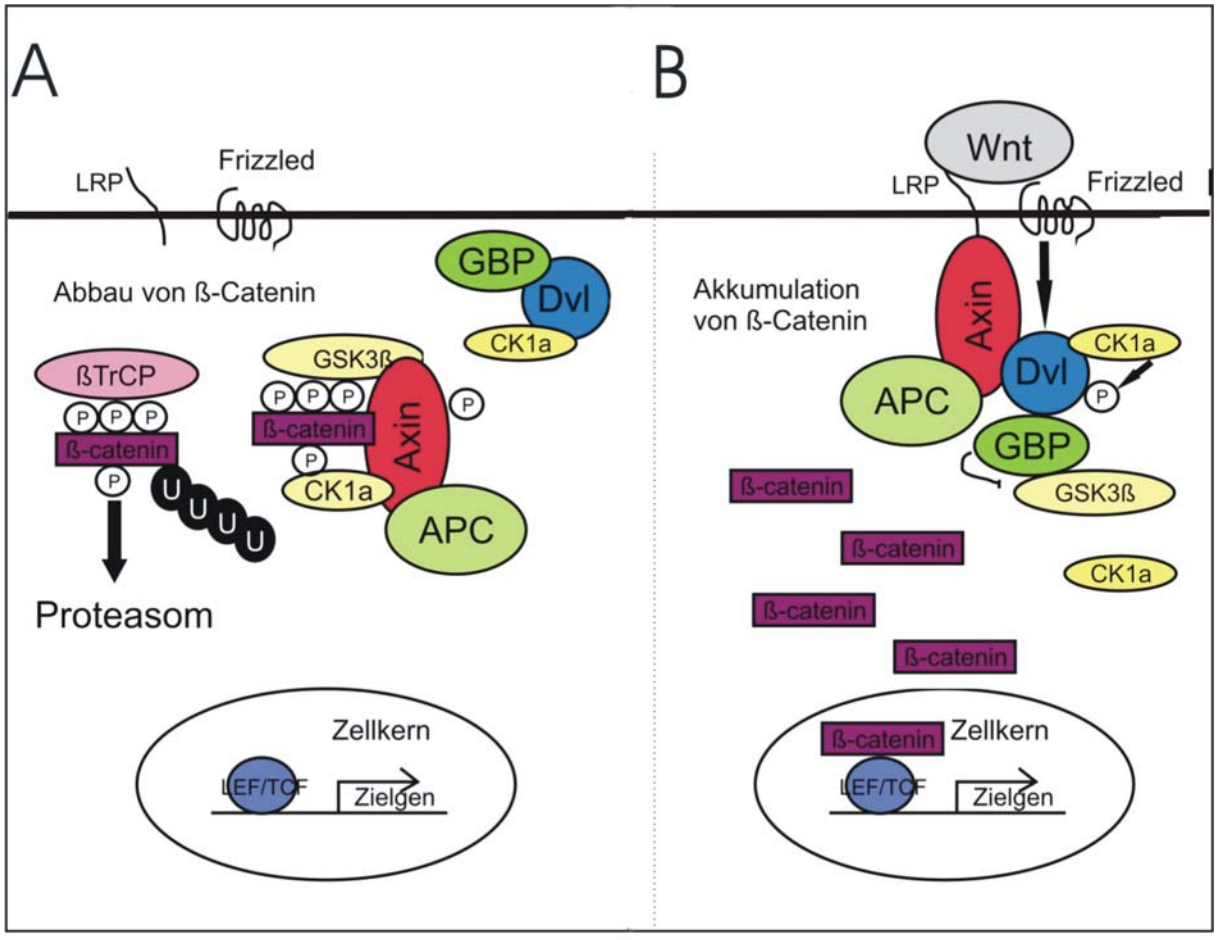

Abbildung 4: Darstellung des Wnt/β-Catenin Signalweges**: A:** Bei Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β-Catenin phosphoryliert und durch einen Degradationskomplex, bestehend aus Axin, GSK3β, APC und CK1α in der Zelle abgebaut. **B:** Bei Bindung von Wnt Proteinen an Frizzled Rezeptor und LRP Co-Rezeptor wird der Degradationskomplex außer Kraft gesetzt, β-Catenin nicht dephosphoryliert und der Abbau gestoppt. β-Catenin akkumuliert in der Zelle und bindet im Zellkern an LEF/TCF Transkriptionsfaktoren, wodurch die Transkription von Zielgenen aktiviert wird. Modifiziert nach Nusse, 2006, Wnt Homepage: www.stanford.edu/~rnusse.

1.2.2 Der alternative Wnt/JNK Signalweg

Der alternative Wnt/JNK Signalweg hat Ähnlichkeit mit dem PCP Weg von Drosophila, der die planare Zellpolarität kontrolliert.

Der Signalweg führt von dem aktivierten Frizzled Rezeptor über Dishevelled zu einer Aktivierung von Rho,[43] einer kleinen GTPase. Im weiteren Verlauf wird die c-jun-N-terminale Kinase (JNK) aktiviert.[5,6,41,86] Inversin hemmt die Phosphorylierung von GSK3ß und wirkt als Schaltermolekül zwischen dem kanonischen und dem alternativen Signalweg (siehe Abb. 5). So hemmt die Überexpression von Inversin in Xenopus Embryonen die Ausbildung einer doppelten Körperachse durch Überexpression von Dvl als Aktivator des kanonischen Wnt Weges. Die Hemmung von Inversin im Zebrafisch führt zur Ausbildung von Nierenzysten, im Sinne einer gestörten planaren Polarität.[17,76]

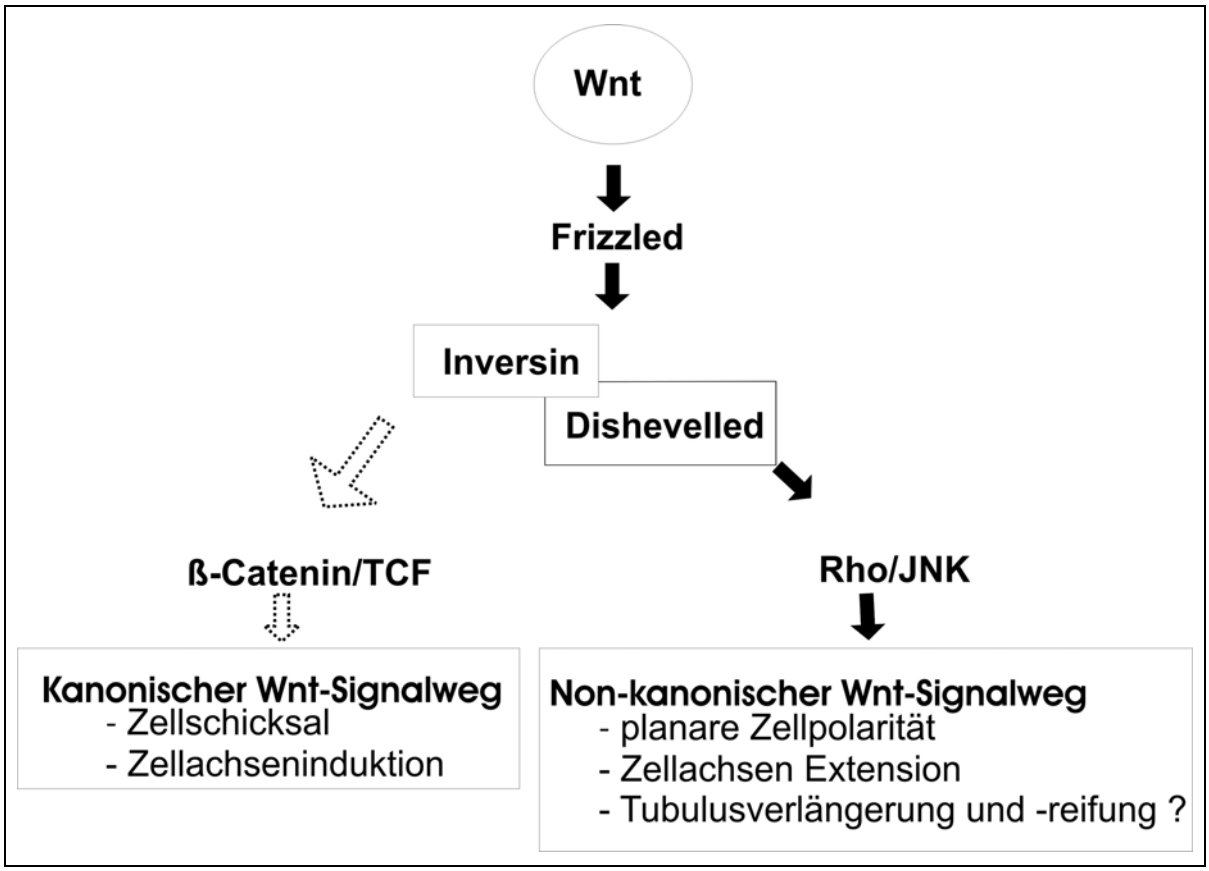

Abbildung 5: Inversin, ein Schaltermolekül zwischen dem kanonischen und non-kanonischen Wnt Signalweg.

1.3 Ziel und Hintergrund dieser Arbeit

Kim-1 (kidney injury molecule 1), ein Mitglied der TIM (*T cell immunglobulin mucin*) Familie ist ein glykosyliertes Typ1 Transmembranprotein mit extrazellulärer Immunglobulin- und Muzin-Domäne und einem kurzen intrazellulärem Schwanz, der eine hochkonservierte Tyrosin Domäne enthält. Es wird in depolarisierten und dedifferenzierten Tubulusepithelzellen nach ischämisch induziertem akuten Nierenversagen oder chemisch-toxischem Schaden hochreguliert. Es wird außerdem in den meisten Nierenkarzinomen und in Nierenzysten bei der Polyzystischen Nierenerkrankung exprimiert, während es in gesunden Nierenzellen nur minimal nachweisbar ist. Im Immunsystem spielt Kim-1 eine Rolle als Hepatitis A Virus Rezeptor, bei der Entstehung von Asthma bronchiale und bei der Differenzierung von T-Helferzellen.
Primäre Zilien sind fadenförmige Organellen, die im Basalkörperchen verankert aus der apikalen Zellmembran von Nierenepithelzellen herausragen und sensorische Eigenschaften besitzen. Es häufen sich Hinweise, dass die Ausbildung von Nierenzysten eng mit einer Ziliendysfunktion verknüpft ist. Kim-1 ist in Zilien von immortalisierten Tubulusepithelzelllinien lokalisiert und interagiert mit Inversin, einem ziliären Protein, das in der Nephronophthise vom Typ 2 mutiert ist. Inversin bindet an Dishevelled und nimmt Einfluss auf die Wnt-Signaltransduktion. Die Expression der Wnt-Proteine ist entwicklungsbiologisch essentiell für eine Reihe grundlegender zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Polarisierung und Adhäsion.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es mit molekularbiologischen (Luziferase Reporter Assays, Untersuchung von Mutanten, „*Loss of function*“ Knock-Down Experimente) und immunhistochemischen Methoden (phänotypische Untersuchung der Knock-Down Experimente) die Rolle von Kim-1 in Signaltransduktionswegen, bei der epithelialen Differenzierung und bei der Ziliogenese zu untersuchen.
Es sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ist das Tim Protein Kim-1 im Wnt- Signaltransduktionsweg, der eine Rolle in der Differenzierung und Proliferation von Zellen spielen, funktionell aktiv?
2. Ist die Tyrosinphosphorylierung innerhalb der konservierten Domäne dabei relevant?
3. Spielt Kim-1 eine Rolle in der epithelialen Differenzierung und Polarisierung?
4. Spielt Kim-1 eine Rolle in der Ziliogenese?

Kapitel 2
Materialien

2.1 Materialien und Lösungen

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 HEK 293T-Zellen

HEK 293t-Zellen (*human embryonic kidney*), immortalisierte Zelllinie aus menschlichen Embryonalnieren

DMEM (*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*) (Bio Whittaker) mit 4,5 g/l Glucose, 2,5 mM L-Glutamine und Zusatz von 10% fötalem Rinderserum (FBS)

Trypsin-EDTA mit HBSS ohne Magnesium und Calcium (Invitrogen Corporation)

PBS: 136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5mM KH_2PO_4

Hepes Puffer (1M), pH 7,0-7,6 (Sigma)

2.1.1.2 MDCK-Zellen

MDCK II-Zellen (*Mardin Darby canine kidney cells*), immortalisierte Epithelzelllinie aus distal-tubulären Hundenierenzellen

DMEM + 10% FBS, ***Trypsin-EDTA, PBS***

Polybrene (=Hexadimethrinbromid) (Sigma)

2.1.1.3 IMCD-Zellen

IMCD-Zellen (*inner medullary collecting duct cells*) murine Sammelrohrzellen der Nierenpapillen

HAMS = DMEM-F12 (*Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*) + 10% FBS

Trypsin-EDTA, *PBS*

2.1.2 Transfektion

Kalziumchlorid 0.25 M

2x HEBS (4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat) mit pH 7,05 (50 mM Hepes; 280 mM NaCl; 10mM KCl; 1,5 mM Na_2HPO_4; 12 mM Dextrose)

2.1.3 Vektoren

2.1.3.1 eukaryonte Expressions- und Überexpressionsvektoren

***Kim-1-Konstrukte*:**

pcDNA3.hKim-1-F	cDNA Sequenz des open reading frame von humanem Kim-1 fusioniert mit C-terminalem Flag
pcDNA3.hKim-1Y350F-F	Mutante von pcDNA 3.h KIM-1F an Tyrosin 350
sIg7-Kim-1:	extrazelluläre Ig-Domäne mit Transmembrandomäne, fusioniert mit dem zytoplasmatischen Anteil von hKim-1.
sIg7-Kim-1.Y350F:	Mutante von sIg7-Kim-1 an Tyrosin 350.

sonstige Vektoren:

cdm0	Expressionsvektor ohne cDNA Sequenz
cdm8	Expressionsvektor ohne cDNA Sequenz
sIg7	Expressionsvektor für eine extrazelluläre Ig-Domäne mit Membrananker, ohne zytoplasmatische Anteile.

2.1.3.2 lentivirale Vektoren

plvth	Leervektor zur lentiviralen Expression von siRNAs

*plvth mKim-1-i, mKim-2-i und dKim-1 Konstrukte (*siehe Kapitel 3.3.8)

pcMV△R8,74 (gag und pol) und *pMD-2-VSV-G* (env) Lentivirale Hilfskonstrukte zur Herstellung von reproduktionsdefizienten Lentiviren.

2.1.4 Zelllyse

IP-Puffer: 1 % Triton X-100; 20 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl; 50 mM NaF; 15 mM $Na_4P_2O_7$; 0,1 mM EDTA; 2 mM Na_3VO_4; 0,25 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)

Homogenisierungs-Puffer, 2 ml 1 M Tris (pH 7,5), 0.6 ml 5M NaCl, 10 ml 500mM NaF, 10 ml 0,25 M $Na_4P_2O_7$, 0,5 M EDTA

Complete Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten, Roche Diagnostics

Protein Assay, Bio-Rad, zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

2x Laemmli-Puffer: 900 µl Laemmli-Stammlösung, 100 µl DTT 1 M (Dithiothreitol) (Laemmli-Stammlösung: 125 ml Tris 1M pH 6,8; 20 g SDS; 100 ml Glycerol; 5 mg Bromphenol Blau; 270 ml H_20)

6x Laemmli-Puffer: 100 ml Tris 1M pH 6,8; 48 g SDS; 200 ml Glycerol; 50 mg Bromphenolblau; 100 ml β-Mercaptoethanol (14,7 M)

2.1.5 SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

	Trenngel	Sammelgel
Trenngelpuffer	12 ml	0 ml
Sammelgelpuffer	0 ml	5 ml
Acrylamid (30%)	6 ml	1.2 ml
H_2O	6 ml	3.8 ml
Ammoniumperoxidisulfat (10 %)	240 µl	100 µl
TEMED (N,N,N`,N`-Tetra-methylethylendiamid)	30 µl	15 µl

Trenngelpuffer pH 8,8: 90 ml 2M Tris HCl, 285 ml 2M Tris Base, 10 ml 20% SDS, 115 ml H_20

Sammelgelpuffer pH 6,8: 121 ml 2M Tris HCl, 4 ml 2M Tris Base, 10 ml 20% SDS, 365 ml H_20

Laufpuffer: 191, 8 mM Glycin; 3,5 mM SDS; 247,7 mM Tris Base

Transferpuffer: 247, 7 mM Tris Base; 3,5 mM SDS; 187,8 mM g Glycin; 15 Vol % Methanol

Waschpuffer: 9 ml Tris pH 7.5; 18 ml 5 M NaCl; 0.9 ml Tween 20

BSA (*Bovines Serum Albumin*) der Firma Sigma 5% in Waschpuffer

Membranen: PolyScreen PVDF Transfer Membrane der Firma Life Science

Visualisierungslösung ECL (engl.: *enhanced chemiluminescence*), bestehend aus Lösung A (100 mM Tris pH 8,5; 2,5 mM Luminol; 0,4 mM Coumarin in H_20) und Lösung B (100 mM Tris pH 8,5; 1,5 % H_2O_2 in H_20) im Verhältnis 1:1

Filme für Western Blot Entwicklung: Fudji Medical X-Ray Film

Primärantikörper:

Anti-ß-Catenin monoklonaler Antikörper, Santa Cruz, Biotechnology, Inc Verdünnung 1:1000

Anti-p38 MAPK (*mitogen activated protein kinase*), monoklonaler Antikörper, Transduction Laboratories; Verdünnung 1:1000

R9N (Anti-Kim-1), polyklonaler Antikörper, Verdünnung: 1:1000

Sekundärantikörper:

gegen den Fc-Teil von Mausantikörpern gerichtete polyklonale Ziegenimmunglobuline, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), Dako Zytomation; Verdünnung 1:10000

gegen den Fc-Teil von Kaninchenantikörpern gerichtete Eselimmunglobuline, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP), Amersham Biosciences; Verdünnung 1:10000

2.1.6 Immunfluoreszenz

PBS: 136 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5mM KH_2PO_4

Fixierlösung: 3% Paraformaldehyd, 5% Sucrose in PBS

Blockierlösung: 5% Ziegenserum, 0,1% Triton in PBS

gegen Kaninchen IgG gerichtete Ziegenimmunglobuline konjugiert mit grün fluoreszierendem Farbstoff

anti-Maus Cy3 Antikörper, Sekundärantikörper, rot fluoreszierendes Carbocyanin, Verdünnung 1: 500

anti-acetyliertes Tubulin Antikörper, monoklonaler Primärantikörper, Sigma, Verdünnung 1: 4000

anti-Kaninchen Alexa 488 Antikörper, Sekundärantikörper zur Anregung bei 488nm, Verdünnung 1:500

Hoechst Stain 33342 (Kernfärbung), Molecular Probes, Verdünnung 1:1000

ProLong®-Antifade Kit, Molecular Probes

2.1.7 DNA-Technologien

Restriktionsenzyme: Cla I, Not I, Eco RI, Hind III, Bam HI, Xba I, Xho I, Bgl II, New England Biolabs

T4 DNA Ligase, 10x T4 DNA Ligase Puffer, Fermentas

Taq DNA Polymerase, 10x Taq Polymerase Puffer, Eppendorf

100 mM dNTP Mix, Stratagene

Lösung 1 (10 mM EDTA; pH 8,0)

Lösung 2 (0,2 M NaOH/ 1% SDS)

Lösung 3 (5 M Kaliumazetat)

LB-Medium (20 g LB auf 1000 ml H_2O; 100 µg/ml Ampicillin; 0,25 µg/ml Tetrazyklin)

Kapitel 3
Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zellen

Alle Säugerzelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C unter Begasung mit 5 % CO_2 in 10 cm-Gewebekulturschalen mit ca. 10 ml DMEM + 10 % Rinderserum kultiviert. Die Ausnahme hierzu stellten die IMCD Zellen dar, die HAMS Medium + 10% FBS benötigten. Die Arbeiten wurden ausschließlich unter einem sterilen Abzug durchgeführt.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Zur Subkultivierung der Zellen wurde das Kulturmedium mit einer Vakuumpumpe entfernt und die Zellen einmal mit 5ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin bedeckt und für 3-5 min bei 37°C inkubiert. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und je nach Passagierverhältnis in neue Kulturschalen ausgesät.

3.1.3 Transiente Transfektion

Um Fremd-DNA in eine eukaryontische Wirtszelle einzuführen wurden am Vortag passagierte, einzeln stehende HEK 293t Zellen mit der nachfolgend beschriebenen Kalziumphosphat-Methode[10] transient transfiziert.

9 µg DNA wurden in Eppendorf Gefäßen vorgelegt, 500 µl 0,25 M Kalziumchlorid dazu gegeben und dann tropfenweise 500 µl 2x HEBS unter ständigem Mischen dazupipettiert. Abschließend wurde 1 ml der Transfektionslösung tropfenweise in das Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Nach ca. 8 Stunden wurden die im Medium verbliebenen DNA/Kalziumphosphat Präzipitate durch Absaugen des Mediums entfernt und anschließend neues Medium dazugegeben. Als Transfektionskontrolle wurde Flag-markiertes grün fluoreszierendes Protein (GFP)[55] in eine Kontrollschale

transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde unter dem Mikroskop anhand der leuchtenden im Verhältnis zu den nicht leuchtenden Zellen beurteilt.

3.1.4 Bestimmung von zytosolischem Beta-Catenin

HEK 293t Zellen wurden transient transfiziert, und die Transfektion nach 8 Stunden mit DMEM + 10% FBS gestoppt. Einen Tag später wurde den Zellen im Rahmen einer Serumdepletion die Wachstumsfaktoren entzogen. Dazu wurde das Medium abgesaugt und durch serumfreies Medium (DMEM) ersetzt.

Nach weiteren 16h wurde das Medium wiederum abgesaugt, jede Gewebekulturschale mit gekühltem PBS (4°C) überlagert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst. Die in PBS befindlichen Zellen wurden in kleine Falcon® Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500 µl Homogenisierungs-Puffer mit Protease Inhibitoren resuspendiert und anschließend im Stokes Homogenisator mit 20 Stößen homogenisiert. Es folgten 2 Zentrifugationschritte bei 4°C und 3000 rpm 5 bzw. 10 Minuten lang, bei denen die Zellkerne entfernt wurden. Der Überstand wurde in ein Eppendorf Gefäß überführt und dann ultrazentrifugiert (45000 rpm, 1 Stunde, 4°C), um die Membranfraktion zu pelletieren. Dem entstandenen Überstand wurde 50 µl Lysat entnommen und mit 50 µl 2x Lämmli + DTT versetzt. Nach 5-minütiger Kochzeit bei 95°C konnten die so gewonnen Proben auf Polyacrylamidgele geladen werden.

3.1.5 Luziferase Assay

Ziel eines solchen Assays ist es die Aktivität eines Transkriptionsfaktors, wie zum Beispiel AP-1, zu quantifizieren, indem seine transkriptionelle Wirkung auf einen Promotor mit nachgeschaltetem Luziferase Gen anhand der resultierenden Lichtemission gemessen wird. HEK 293t Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und mit einem Luziferase-Reporter-Konstrukt sowie einem Beta-Galaktosidase-Expressionsvektor und den Vektoren zur Expression der entsprechenden Proteine transfiziert. Die Gesamt-DNA-Menge betrug 1,5-2 µg pro Loch. Die Zellen wurden nach 8 Stunden mit DMEM + 10% FBS gestoppt und am darauf folgenden Tag serumdepletiert (siehe Kapitel 3.1.4). Durch Zugabe von 80 µl Tropix Lysis Puffer, versetzt mit 10 µl 1M DTT, wurden die ausgesäten Zellen für 5-10 Minuten lysiert.

Um unlösliches Material zu entfernen folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm (5 min, 4 C°).
Die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurde mit Hilfe eines kommerziellen Assay Systems (Applied Biosystems, Norwalk, CT) durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde durch automatische Injektion von 75µl Luziferin-Reaktionsgemisch des Luziferase-Assay Systems pro Probe für 10 sec gemessen und der Messwert in RLU/s (*Relative Light Units pro Sekunde*) ausgegeben. Der gemessene RLU-Wert des Leerwertes wurde automatisch von den Messwerten der Proben abgezogen.

Zur Korrektur der Transfektionseffizienz wurden die bestimmten Aktivitäten für die Beta-Galaktosidase-Aktivität normalisiert. Dazu wurden 10 µl Überstand (s.o.) für ca. 20 min bei 37°C im Dunkeln mit 10 µl ß-Gal Substrat inkubiert und anschließend in einem Luminometer gemessen.
Die in beiden Tests erhaltenen Daten wurden miteinander verglichen und nach folgender Formel gegeneinander abgeglichen:

$$\frac{\text{gemessener Luziferasewert}}{\text{gemessener ß-Galaktosidasewert}} = \text{rel. Luziferasewert (RLU)}$$

3.1.6 Statistik

Die Versuche wurden für jede Probe in 3 Wells pro Experiment durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) angegeben (n = Anzahl der Experimente). Zur Prüfung der Signifikanz wurde der zweiseitige ungepaarte Student's T-Test angewendet. Ein Ereignis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit <5% ($p < 0{,}05$) wurde als signifikant betrachtet. Signifikante Differenzen sind im Text erwähnt und in den Abbildungen gekennzeichnet.

3.1.7 Virusherstellung

Durch Cotransfektion lentiviraler Transferkonstrukte mit den Hilfskonstrukten *pcMV-⊿ R8,74* und *pMD-2-VSV-G* können in HEK 293t Zellen Lentiviren erzeugt werden. *pMD-2-VSV-G* kodiert für das Virushüllprotein (env) VSV-G des vesikulären Stomatitis Virus (VSV), während *pcMV-⊿R8,74* für die gruppenspezifischen

Antigene (gag) und Polymerasen (pol) kodiert. Die so erzeugten Lentiviren sind replikationsdefizient, da sie keine genomische Information für env, gag oder pol besitzen. Im Gegensatz zu Retroviren infizieren sie Zielzellen unabhängig davon ob sie sich in Teilung befinden. Auf diese Weise werden höhere Transduktionseffizienzen ereicht als mit Retroviren. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase und Integrase integrieren sie ihre genetische Information in das Genom der Wirtszelle. So können polyklonale stabile Zelllinien kreiert werden. Aufgrund der hohen Transduktionseffizienz bedarf es keiner klonalen Selektion und die Selektion von artifiziellen Eigenschaften wird vermieden.

Für jedes Viruskonstrukt wurden drei Gewebekulturschalen mit HEK 293t Zellen transfiziert. In jede der drei Schalen wurde jeweils 15 µg *plvth* Konstrukt, 11,25 µg *pcMV-△R8,74* und 3,8 µg *pMD-2-VSV-G* transfiziert. Nach 8 Stunden wurde das Medium mit 8 ml DMEM + 10%FBS und 20 mM HEPES pH 7,4 ausgetauscht. 3 Tage später wurde der Zellüberstand mit den enthaltenen Viren abgenommen, bei 2500 rpm 5 Minuten lang zentrifugiert und mit Hilfe eines 0,45 µm Filters von Zellbestandteilen befreit. Zur Ankonzentrierung des Virus folgte ein 4 stündiger Zentrifugationschritt bei 19500 rpm. Anschließend wurde der Überstand verworfen, inaktiviert und das Viruspellet in 1,5 ml Medium resuspendiert.

Die Transduktion der MDCK und IMCD Zellen erfolgte, indem das Medium der MDCK oder IMCD Zellen für ca. 12 Stunden durch 8 ml konzentriertem Virus mit 8 µg/ml Polybrene ersetzt wurde. Nach jeder Transduktion schloss sich eine mindestens 12-stündige Erholungsphase der Zellen in dem jeweiligen Medium an. Die MDCK und IMCD Zellen wurden insgesamt 3 Mal transduziert.

3.1.8 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz gelingt es Proteine in Zellen zur Fluoreszenz anzuregen und somit auf mikroskopischer Ebene direkt Aussagen über ihr Vorkommen, ihre Lokalisation und Funktion zu machen. Das Prinzip beruht auf einer Epitoperkennung durch einen Primärantikörper und der speziesspezifischen Bindung eines Sekundärantikörpers, gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoff an den primären Antikörper.

Für die Immunfluoreszenzstudien wurden die Zellen (MDCK und IMCD) in 24- oder 6-well-Platten auf runden Deckgläschen ausgesät und an 3 darauf folgenden Tagen mit konzentriertem Virus transduziert.

Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 2-10 Tage inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 15 Minuten lang mit einer Paraformaldehydhaltigen Fixierlösung inkubiert. Es folgten 3 weitere Waschschritte mit PBS. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu blockieren und um die Zellen zu permeabilisieren wurden die Deckgläschen 30 Minuten mit einer Lösung, die 5% Ziegenserum und 0,1% Triton in PBS enthielt, inkubiert. Der Primärantikörper wurde in vorgegebener Verdünnung (Kap. 2.1.6) angesetzt und 1 Stunde lang bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Es folgten 3 Waschschritte mit PBS. Der Sekundärantikörper (der gegen den Primärantikörper gerichtet ist) und Höchst Stain 33342 (Kernfärbung zur Kontrolle) wurden gleichzeitig in angegebener Verdünnung auf die Zellen gegeben. Nach den letzten 3 Waschschritten wurden die Deckgläschen zur Konservierung und zum Schutz vor einem Ausbleichen mit dem Prolong Antifade Kit (Molecular Probes) auf Objektträgern eingedeckelt.

Die Ergebnisse wurden mittels eines Fluoreszenzmikroskopes (Zeiss Axioplan2) mit einem 10x und 40x Objektiv und einem 63x Immersionsölobjektiv detektiert und dokumentiert.
Zur Immunfluoreszenzanalyse von Nierengewebe wurden 10 µm dicke Cryostat-schnitte von perfusionsfixierten Mäusenieren nach dem oben beschriebenen Protokoll bearbeitet. Diese Schnitte wurden innerhalb der Abteilung gemäß der Richtlinien der Universität Freiburg für tierexperimentelle Forschung gewonnen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt.
Je 15-25 µl der Proben wurden in die Taschen eines 10% Polyacrylamid-Gels aufgetragen. Zur späteren Molekulargewichtsbestimmung wurden 15 µl eines kommerziell erhältlichen Proteinmarkers (Biorad) aufgetragen. Die Gele bestanden aus zwei Phasen. Zunächst wanderten die Proteine 30 min. in der Sammelphase bei

70 Volt in Richtung Anode und wurden anschließend in der Trennphase für 2 h bei 20 mA aufgetrennt.

3.2.2 Western Blot (Immunoblot)

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine durch eine Elektrophorese auf einer Membran immobilisiert. Daraufhin erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch eine mindestens 30 minütige Inkubation mit 5% BSA in Waschpuffer bei 37°C.
Nach 3 Waschschritten mit Waschpuffer wurde die Membran für 30 Minuten mit dem Primärantikörper inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch mehrere Waschschritte entfernt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Nach 3 weiteren Waschschritten fand ein Detektionschritt statt, bei dem durch Zugabe von Luminol eine HRP vermittelte Chemilumineszenzreaktion ausgelöst wurde. Dazu wurde die Membran 1 Minute lang in einer ECL Visualisierungslösung inkubiert. In einer Dunkelkammer wurde dann die Lichtreaktion mit Röntgenfilmen detektiert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Ligation

Ein mit Restriktionsendonukleasen verdauter DNA-Abschnitt wurde mit Hilfe der DNA-Ligase als Insert in einen mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor ligiert. DNA-Abschnitte und Vektor wurden hierfür nach dem Verdau aus einem Gel nach Gelelektrophorese (30 min bei 70 mV) ausgestanzt. Die so erhaltenen Gelstücke wurden auf 70°C erhitzt um sie zum Schmelzen zu bringen. 1 µl des geschmolzenen Vektoransatzes und 4 µl des Insertansatzes ergaben mit 5 µl 10X Ligationspuffer, 35 µl dH_2O und 0,4 µl T4 DNA-Ligase den neuen Reaktionsansatz. Dieser wurde für mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation war das Insert in den Vektor integriert.

3.3.2 Transformation und Amplifikation rekombinanter DNA

Als kompetenter Bakterienstamm mit selektiver Antibiotikaresistenz stand der *E.coli* Stamm DH10 zur Verfügung. 5 µl eines 1:1000 verdünnten Plasmids bzw. 4 µl des Ligationsproduktes wurden zu 50 µl Bakterien-Suspension gegeben, vermischt und

der Ansatz für 30 min auf Eis gelagert. Der Transformationsansatz wurde dann für 45 sec bei 42°C inkubiert und nach Zugabe von 1 ml Soc-Medium eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf einer Platte ausgestrichen, die mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt war. Die Platte lagerte über Nacht bei 37°C, so dass bei einer erfolgreichen Transformation und Induktion der Antibiotikaresistenz am Tag darauf Bakterienkolonien gewachsen waren.

3.3.3 Minikultur und Minipräparation

Zur Vervielfachung eines DNA-Konstruktes in kleinen Mengen wurden über Nacht gewachsenen *E-Coli* Bakterienkolonien mit einer sterilen Impföse aufgenommen und jeweils in ein mit 3 ml LB-Medium gefülltes 15 ml Falcon Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen wurden für mindestens 6 h bei 37 °C auf einem Rotor inkubiert (Minikultur). Die Bakterien wurden zunächst durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 200 µl Lösung 1 resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung 2 zugegeben, um die Zellen zu lysieren und die DNA freizusetzen. 200 µl von Lösung 3 dienten der Neutralisation. Die darauf folgende 10-minütige Inkubation bei 4°C und die Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm dienten der Entfernung der Zellbestandteile. Die DNA-enthaltende Lösung wurde anschließend mit 400 µl 100% Isopropanol versetzt um die DNA zu fällen. Im Anschluss daran erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und das DNA-Pellet wurde schließlich 2x mit 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Nach Resuspendierung der DNA mit warmen dH_2O wurde diese dann nach einem diagnostischen Restriktionsenzymverdau, entsprechend der eingebauten Schnitt-stellen, einer Gelelektrophorese in einem Agarosegel unterzogen, die Aussagen über den Erfolg der Amplifikation machte.

3.3.4 Maxikultur und Maxipräparation

Die Cäsiumchlorid-Maxi-Präparation[13] dient der weiteren Vervielfachung eines DNA-Konstruktes in Bakterienzellen.

1,5 ml Bakterienkultur, die das zu vermehrende DNA Konstrukt enthielt, wurde in einem mit Selektionsantibiotikum versetzten Ansatz für 16-20 Stunden bei 37°C unter stetigem Schütteln vermehrt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4500 rpm und 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Der die Bakterien enthaltende Bodensatz, wurde mit 40 ml Lösung 1 gelöst und dann mit 80

ml Lösung 2 versetzt. Hierbei handelt es sich um ein Detergens, das die Bakterienwände zerstört und so die DNA freisetzt. Weitere 40 ml der Lösung 3 führten zu einer Neutralisation des vorherigen Schrittes. Nach dem nächsten Zentrifugationsschritt (4500 rpm, 10 min, 4°C) wurden bakterielle Zellbestandteile herausfiltriert, die Suspension zur Fällung der DNA mit 100% Isopropanol im Verhältnis 1:1 gemischt und erneut zentrifugiert (4500 rpm, 5 min, 4°C). Danach wurde das Isopropanol abgegossen. Um Salze von der DNA abzulösen wurde der Bodensatz mit 70% Ethanol gespült und anschließend getrocknet. Als Nächstes wurde er mit 10 mM Tris HCl Puffer (pH 7,5) gelöst und mit 5,20 g $CsCl_2$ und 500 µl Ethidiumbromid versetzt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit 80.000 rpm für 4 Stunden oder alternativ über Nacht bei 25°C mit 60.000 rpm. In der weitgehend durchsichtigen Lösung zeichnete sich eine Bande ab, die mit Hilfe einer Kanüle entnommen wurde. Um das $CsCl_2$ zu entfernen wurde eine Butanolextraktion mit 8 ml gesättigtem 1 M NaCl Butanol durchgeführt. Die DNA wurde nun mit 95% Ethanol ausgefällt und mit einem Zentrifugationsschritt (15000 rpm 15 min, 25°C) vom Überstand getrennt. Nach Waschschritten mit 70% Ethanol erfolgte schließlich die Lösung der DNA in 500 µl dH_2O. Zum Abschluss wurde die DNA Konzentration bestimmt (siehe Kap. 3.3.6).

3.3.5 Agarose Gelelektrophorese

In einem 15 µl Ansatz waren neben H_2O und 1 µg zu verdauender DNA noch Restriktionsenzyme und zu den Enzymen passender 10x Puffer enthalten. Der Verdau verlief über 2 h bei 37°C. Anschließend wurden 10 µl der Probe mit 2 µl Ladepuffer auf einem Agarosegel aufgetragen. Als Größenmarker diente ein Marker mit verschiedenen DNA-Fragmenten definierter Länge (Lambda DNA-BstEII-Digest). Der Verdau wurde für 30 min bei 70 mV aufgetrennt und unter UV-Licht mit Hilfe des nun in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids fluoreszenzoptisch sichtbar gemacht.

3.3.6 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration der Ribonukleide wurde photometrisch gemessen und nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnet:

(1) $C = A_{260} \cdot V \cdot 40$ [µg/ml]; A= Absorption; V = Verdünnungsfaktor

Der Faktor 40 µg/ml gilt für RNS, für doppelsträngige DNA beträgt er 50 µg/ml.

3.3.7 DNA-Sequenzierung

Das Sequenzierungsverfahren basierte auf einer modifizierten von Frederick Sanger 1977 beschriebenen Didesoxynukleotidterminationsmethode. [70] Der Reaktionsansatz bestand aus der zu sequenzierenden DNA, H_2O, Primer und Big Dye Mix (einer Reaktionsmischung, die fluoreszenmarkierte Didesoxynukleotide enthält). Nach Durchführen einer Polymerase-Ketten-Reaktion wurden die Proben der Sequenzierungseinheit des Forschungsgebäudes zugeleitet, wo alle weiteren Arbeitschritte vorgenommen wurden. Die Sequenzierungsergebnisse wurden am Computer mit den Programmen DNA-Star und Chromas 1.62 ausgewertet und analysiert.

3.3.8 Knock-Down von mKim-i-1 durch RNA-Interferenz

Das Phänomen der RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt einen hochspezifischen Mechanismus zur Stilllegung von Genen (Knock-Down), ausgelöst durch dsRNA. Es konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch eine Übertragung oder Expression so genannter „short interfering RNA"-Moleküle (siRNA) eine gezielte Inaktivierung von Genen in Säugerzellen erreicht werden kann.[9]

In Experimenten unserer Arbeitsgruppe, die vor dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte eine Unterdrückung von endogenem Kim-1 durch RNAi mit Hilfe des Expressionsvektorsystems pSUPERretro in MDCK Zellen erreicht werden. Da sich damit auf Dauer keine stabilen Knock-Downs erzeugen ließen, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Produktion von endogenem Kim-1 in IMCD und MDCK Zellen effizienter mit dem Expressionsvektorsystem *plvth* (Abb. 6) unterdrückt werden.[73,85]

Die Vorteile des lentiviralen Expressionsvektors *plvth* liegen in seiner besseren Transfektionseffizienz und im Besitz des *GFP* (*grün fluoreszierende Protein*) Gens.[55] Dadurch können effizient transduzierte Zellen anhand ihrer intensiven Grünfärbung identifiziert werden.

Der lentivirale *plvth* Vektor besitzt einen H1-Promotor, der die Produktion der shRNA (*short hairpin RNA*) kontrolliert. Diese wird durch eine doppelsträngige DNA kodiert, die direkt in den *plvth* Vektor kloniert wurde. Das so erhaltene Konstrukt wurde mit Standardmethoden transformiert und amplifiziert.

Wirkmechanismus der *plvth* mKim-i und dKim-i Konstrukte:

Der Mechanismus der RNAi ist inzwischen teilweise aufgeklärt. Den Ausgangspunkt für siRNA bilden vektoriell transkribierte RNA Doppelstränge, die durch eine 9bp lange Haarnadelsequenz (engl.: *short hairpin*) verbunden sind (Abb.6). Diese Haarnadelsequenz wird durch eine so genannte DICER Nuklease abgespalten, was zur Bildung eines RNA Doppelstranges (dsRNA) mit 21-23 bp langen dsRNA-Fragmenten[52] führt. Diese Fragmente werden als short interfering RNA (siRNA) bezeichnet, sie stellen die eigentlichen Effektoren der RNAi dar. Eine anschließende Phosphorylierung der 5'-Enden der siRNA-Duplex führt zur Aufnahme in den „RNA induced silencing complex" (RISC). Der RISC ist ein Protein-Nuklease Komplex, der mit Hilfe des antisense-Strangs der siRNA über komplementäre Basenpaarung an die korrespondierende mRNA Sequenz herangeführt wird. Im Falle einer Bindung des siRNA Strangs an die korrespondierende mRNA werden Endonukleasen rekrutiert, welche die mRNA zerstören und damit die Proteinsynthese des Zielgens unterbinden (siehe Abbildung 6).

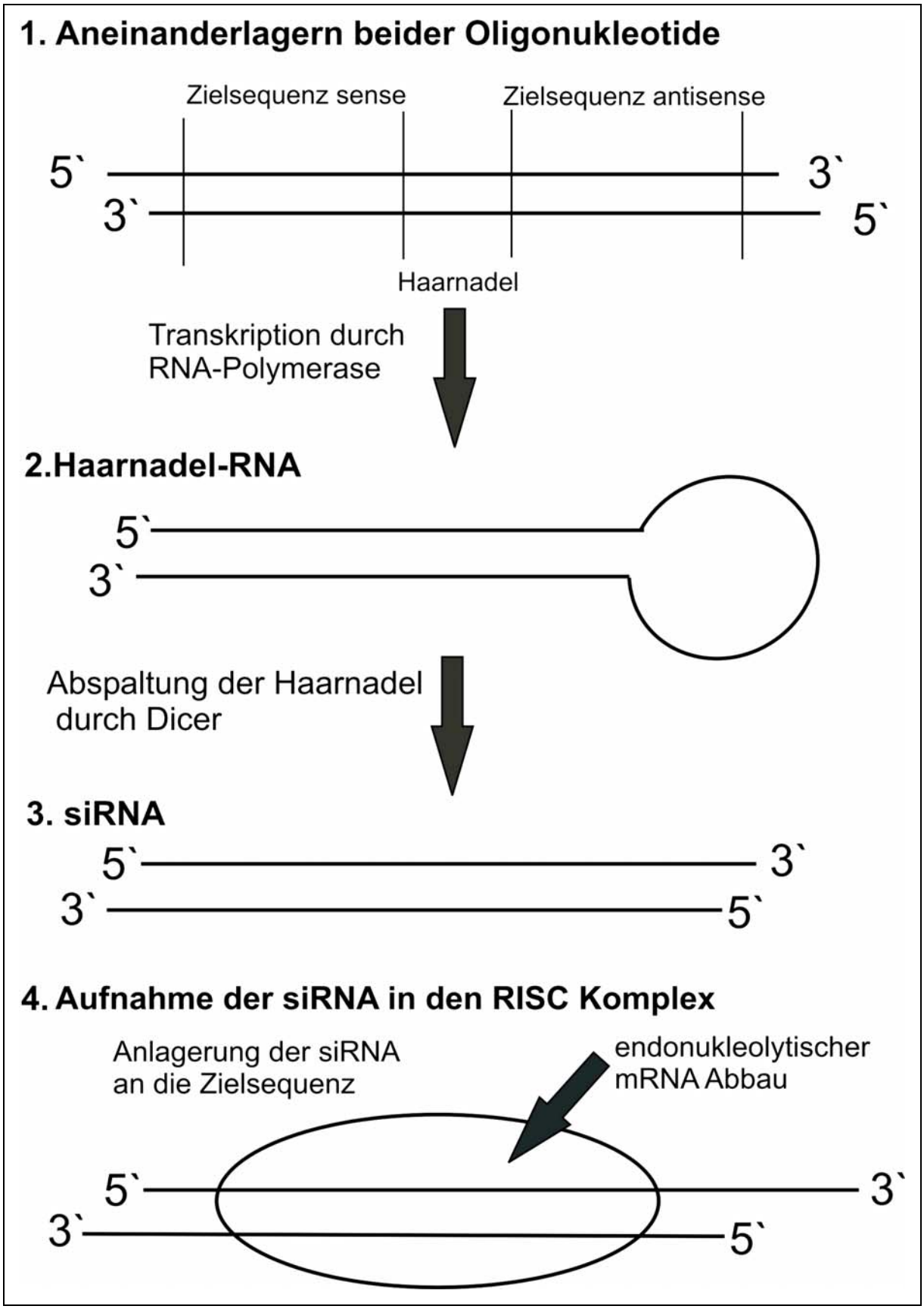

Abbildung 6: Wirkmechanismus der *plvth* Kim-1 Konstrukte. Modifiziert nach McManus, 2002.

Kapitel 4
Ergebnisse

4.1 Kim-1 ist in-vivo im primären Zilium von Tubulusepithelzellen in Mäusenieren lokalisiert.

In den letzten Jahren ist die Bedeutung des primären Ziliums als entscheidendene Organelle für die Entstehung der polyzystischen Nierenerkrankung erkannt worden. Zum einen wurde festgestellt, dass Polaris und Cystin, zwei wichtige Proteine in der Pathogenese der murinen polyzystischen Nierenerkrankung, aber auch Polycystin 1 und Polycystin 2 in den primären Zilien der Nierenepithelzellen vorkommen.[87] Zum anderen wurde gezeigt, dass ein Abbiegen der Zilien durch einen Flüssigkeitsstrom zu einem Ca^{2+}-Einstrom in die Zelle führt[65,66] und das Zilium somit an Signaltransduktionswegen (z.B. dem Wnt Signalweg[14,20,76]) teilnehmen kann. Man geht davon aus, dass das Zilium eine wichtige Aufgabe in der Erhaltung der zellulären Polarität und des tubulären Durchmessers spielt.[39]

Vor diesem Hintergrund und der Feststellung, dass Kim möglicherweise eine Rolle in der Differenzierung von Tubulusepithelzellen spielt, war im Vorfeld dieser Arbeit bereits eine Expression von Kim-1 im Primärzilium von kultivierten Zellen nachgewiesen worden. Um zu beweisen, dass Kim-1 auch in Zilien intakter Tubuli exprimiert ist, wurden Gewebeschnitte von Mäusenieren nach Färbung mit Antikörpern gegen Kim-1 fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb.7). Als Gegenfärbung zur Detektion der Zilien diente ein Antikörper gegen acetyliertes Tubulin, der Zilien spezifisch markiert (Rotfärbung).

Wie in Abb.7 zu sehen ist Kim-1 in grün deutlich in der apikalen Membran sowie im Zilium lokalisiert. Das Zilium ist durch seine intensive Rotfärbung zu sehen. Diese Daten zeigen, dass Kim-1 auch im intakten Tubulus ziliär lokalisiert ist, was für eine Rolle von Kim-1 unter physiologischen Bedingungen spricht.

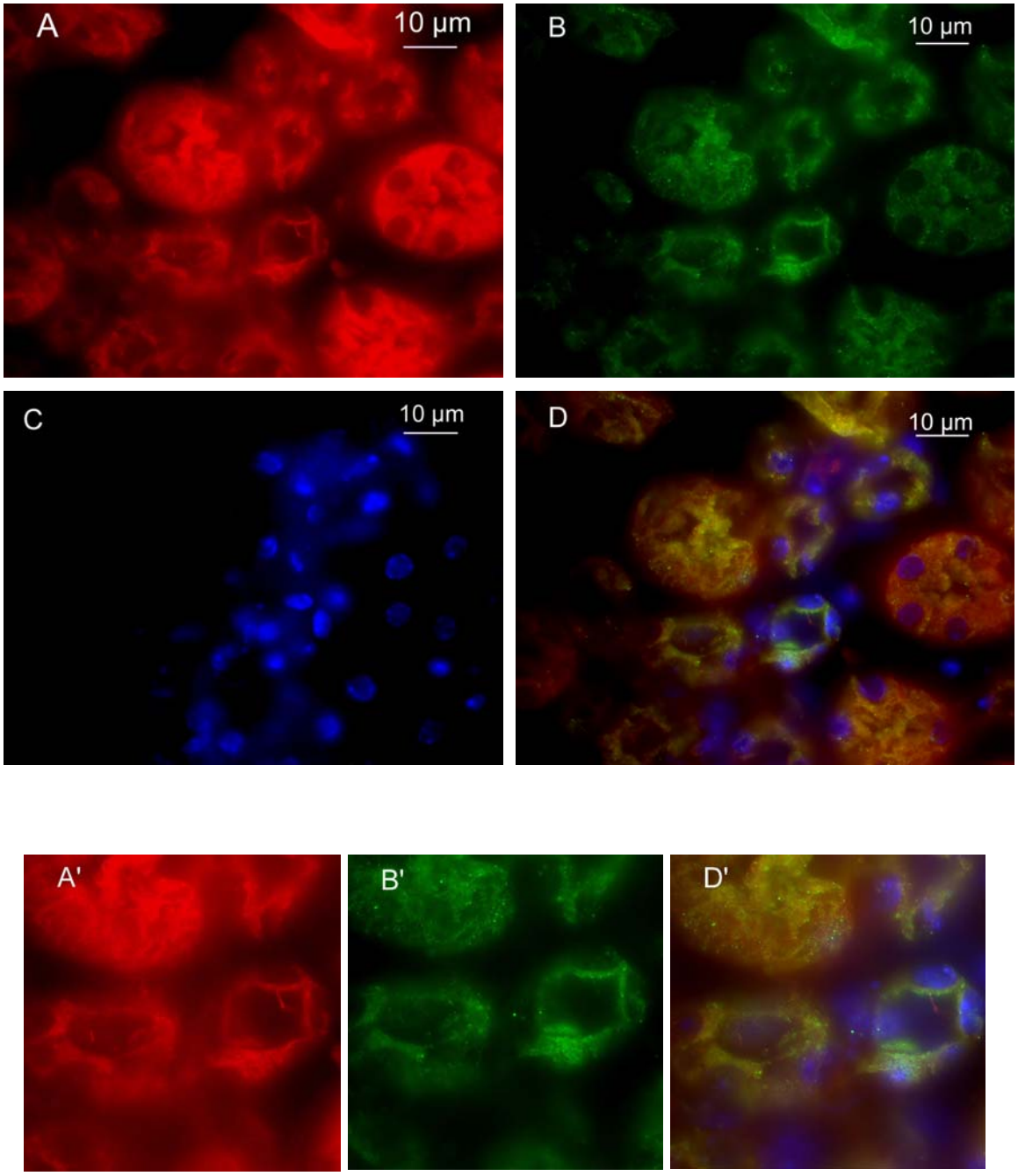

Abbildung 7: Lokalisation von Kim-1 im primären Zilium und der apikalen Membran eines distalen Nierentubulus in der Maus. A: Zilienfärbung mit acetylierten Tubulin; B: Kim-1 Färbung mit GFP Markierung; C: Kernfärbung mit Höchst 33342; D: Übereinanderlagerung von A-C (1000-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

4.2 Die Expression von Kim-1 korreliert mit dem Differenzierungsgrad von tubulären Epithelzellen

Kim-1 wird in gesunden Nieren nur gering exprimiert. Kommt es zu einer akuten Nierenschädigung steigt die Kim-Expression dramatisch an. Um eine Antwort auf die Frage zu bekommen, ob diese hochregulierte Expression durch die Schädigung selbst oder durch die nachfolgende Dedifferenzierung ausgelöst ist, wurden Western Blot Analysen mit Zelllysaten von IMCD Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Passagierung und mit entsprechenden unterschiedlichen Differenzierungsgraden gemacht. Die Zelllysate wurden daraufhin auf ihren Proteingehalt gemessen und äquivalente Mengen durch Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. Wie in Abb.8 gezeigt, ist Kim-1 am Tag 1 und 2 nach Passagierung stark hochreguliert, während das Expressionsniveau an Tag 4 und 7 dramatisch abfällt. Diese Ergebnisse belegen, dass die Expression von Kim-1 vom Differenzierungsgrad der Epithelzelle abhängt, und dass sie mit fortschreitender Differenzierung und Polarisierung der IMCD-Zellen abnimmt.

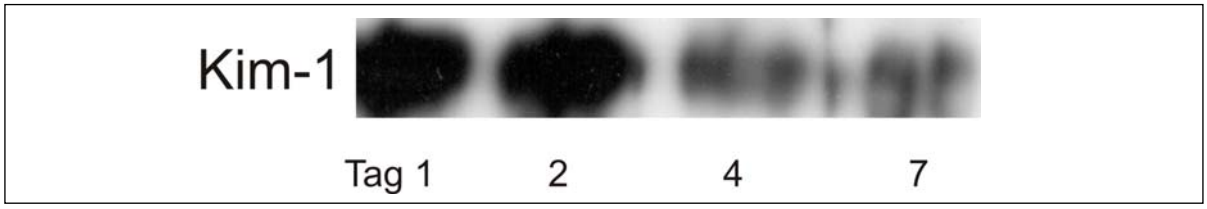

Abbildung 8: Kim-1 ist hoch exprimiert in undifferenzierten IMCD Zellen, zu sehen bei Tag 1 und 2. Je fortgeschrittener die Differenzierung der Zellen, umso weniger Kim-1 wird exprimiert (Tag 4 und 7). Die Proteinkonzentration wurde normiert.

Diese Untersuchung weist darauf hin, dass Kim-1 möglicherweise eine physiologische Funktion während der Differenzierung und Polarisierung von tubulären Epithelzellen ausübt.

4.3 Kim-1 moduliert den Wnt Signaltransduktionsweg

4.3.1 Kim-1 antagonisiert die Wirkung von Dvl

Die ziliäre Lokalisation von Kim-1 lässt vermuten, dass Kim-1 in Signaltransduktionswegen mitwirkt, die von ziliären Proteinen ausgelöst werden. Für das ziliäre Protein Inversin konnte eine Antagonisierung des Wnt Signaltransduktionsweg sowie eine Aktivierung des non-canonischen Wnt Signalweges nachgewiesen werden.[76] Im Vorfeld dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Kim-1 in Anwesenheit der induced T-cell Kinase (ITK) mit Inversin interagiert. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob Kim-1 ebenfalls den Wnt Signalweg moduliert. Das *TOP FLASH* Konstrukt ist ein Reporterkonstrukt, bei dem das Luziferase-Gen durch einen TCF/LEF sensiblen Promotor gesteuert ist. TCF/LEF Transkriptionsfaktoren stellen die Effektoren des kanonischen Wnt Signalweges dar, so dass die Aktivität dieses Signalweges mit der gemessenen Lichtaktivität korreliert. Reporter Assays mit *TOP FLASH* Luziferase Konstrukten nach Koexpression von Dvl zeigen eine stark erhöhte Lichtaktivität, da Dvl ein starker Agonist des kanonischen Wnt Signalweges ist. Um zu untersuchen, ob Kim-1 diese Aktivität unterdrückt, wurde flag markiertes *Kim-1* zusammen mit *Dvl* und *TOP FLASH* Konstrukt transfiziert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Resultate wurden mit Proben verglichen, bei denen entweder ein Kontrollprotein, ein membranverankertes Immunglobulin ohne Intrazellulärdomäne (*sIg7*), oder das an Y350 mutierte *Kim-1* kotransfiziert. Alle Luziferasewerte wurden dabei auf die Werte von TOP FLASH transfizierten Zellen ohne Koexpression von Dvl normiert. Wie in Abb.9 dargestellt zeigte sich, dass *Kim-1* die *Dvl* induzierte *TOP FLASH* Aktivität von 17,2-fach auf 11,3-fach reduziert, während die Mutante *Kim-1Y350F* einen kleineren, statistisch nicht signifikanten Einfluss hat (17,2-fach vs. 13,1-fach) (Abb. 9).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Kim-1 in-vitro die Aktivierung des Wnt Signalweges antagonisiert. Das konservierte Y350 könnte dabei von Bedeutung sein.

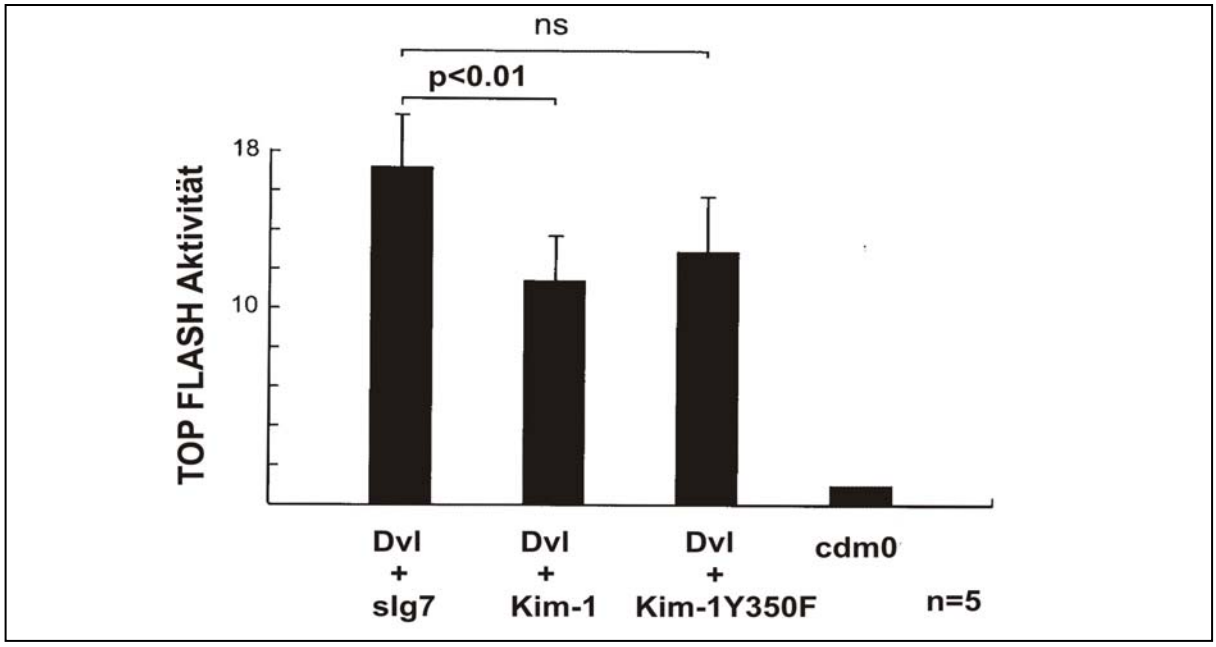

Abbildung 9: Kim-1 antagonisiert die Dvl vermittelte TOP FLASH Aktivität.

4.3.2 Kim-1 reduziert zytosolisches ß-Catenin

Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg fördert die Akkumulation von zytosolischem β-Catenin durch verminderte Degradation. Übereinstimmend mit dem hemmenden Effekt auf den kanonischen Weg verringert Kim-1 den zytosolischen Gehalt an β-Catenin in HEK 293t Zellen (Abb. 10). HEK 293t Zellen wurden mit *Kim-1 WT*, der Mutante *Kim-1Y350 F* und *SIg7* transfiziert. *SIg 7* ist ein Kontrollplasmid, das für ein glykosyliertes Transmembran Protein mit Immunglobulin Domäne codiert. Der Nachweis des ß-Catenins erfolgt mit Hilfe eines Western Blottes, bei dem als Primärantikörper anti-ß-Catenin verwendet wurde. ß-Catenin Gehalte sind im Vergleich zu Kim-1Y350F und Sig7 in der zytosolischen Fraktion von Kim-1 WT reduziert. Durch einen Re-Blot mit dem Antikörper p38 konnte eine gleichmäßige Beladung gezeigt werden.

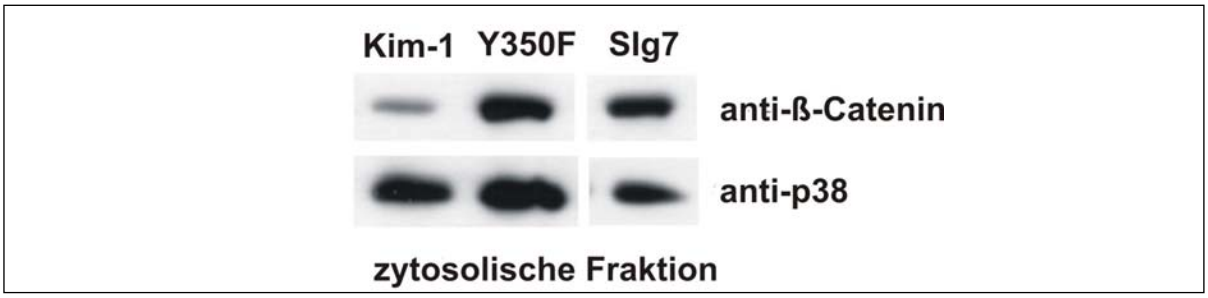

Abbildung 10: Kim-1 reduziert den zytosolischen ß-Catenin Gehalt.

4.3.3 Kim-1 aktiviert AP-1

AP-1 (Aktivator Protein-1) ist ein kollektiver Begriff für dimerische Transkriptionsfaktoren, die sich aus Jun-, Fos- und ATF (*activating transcription factor)* Proteinen zusammensetzen. Diese Untereinheiten binden an eine gemeinsame, spezifische DNA Sequenz, die AP-1 Bindungsstelle.

Im non-kanonischen, alternativen Wnt-Signalweg, kommt es über Aktivierung von JNK zur Rekrutierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren. Um zu untersuchen, ob Kim-1 den alternativen Wnt Signalweg aktiviert, wurde flag markiertes *Kim-1* zusammen mit *AP-1* Konstrukt transfiziert und die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Ergebnisse wurden mit Proben verglichen, bei denen entweder ein Kontrollprotein sIg7 oder das an Y350 mutierte Kim-1 kotransfiziert wurde. Wie in Abb. 11 dargestellt zeigte sich, dass Kim-1 und die Mutante Kim-1Y350F die AP-1 Aktivität von 1,0-fach auf 4,1-fach erhöhen.

Diese Resultate belegen, dass Kim-1 ein Signaltransduktionsmolekül ist und eine agonistische Rolle in der AP-1 vermittelten Transkription spielt. Hierbei scheint das konservierte Y350 unwichtig zu sein.

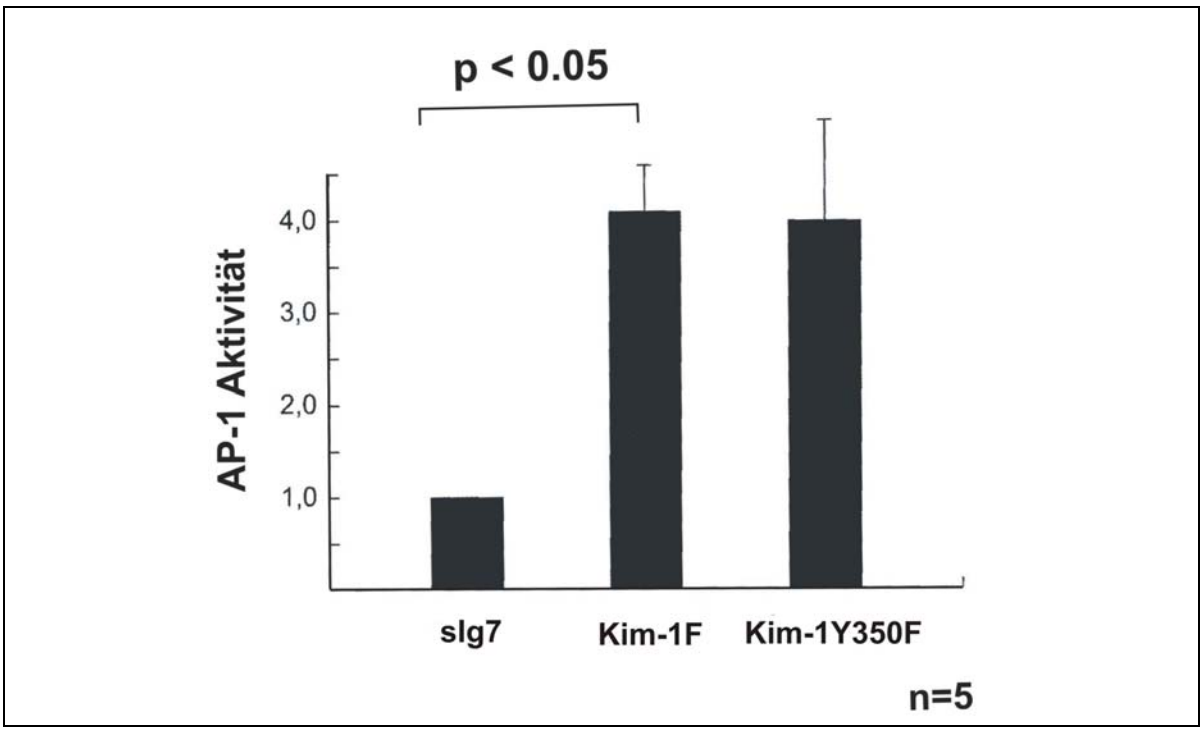

Abbildung 11: Kim-1 aktiviert den AP-1 vermittelten Signaltransduktionsweg.

4.4 Effizienter Knock-down von murinem und caninem Kim-1 in IMCD und MDCK-Zellen

Mit Hilfe der RNAi-Interferenz Methode lassen sich Genfunktionen gezielt ausschalten. In den folgenden Immunfluoreszenz Experimenten wurden *mkim-i-1 plvth* und *dkim-i-1 plvth* Knock-down Konstrukte stabil transduziert und ihre Einflüsse auf das Tight junction Protein ZO-1 und auf die Ziliogenese untersucht.

Exogene Expression von *mkim-i-1 plvth* und *Kim-1* in HEK 293t Zellen zeigen im Western-Blot eine massiv reduzierte Expression von Kim-1 im Vergleich zur Koexpression mit dem Leervektor cdm0, im Sinne eines effizienten Knock-downs. Das Interferenzkonstrukt *mkim-i-2* zeigt dagegen keine Wirkung.

Abbildung 12 zeigt den Effekt von *mKim-i-1* auf die Expression von Kim-1.

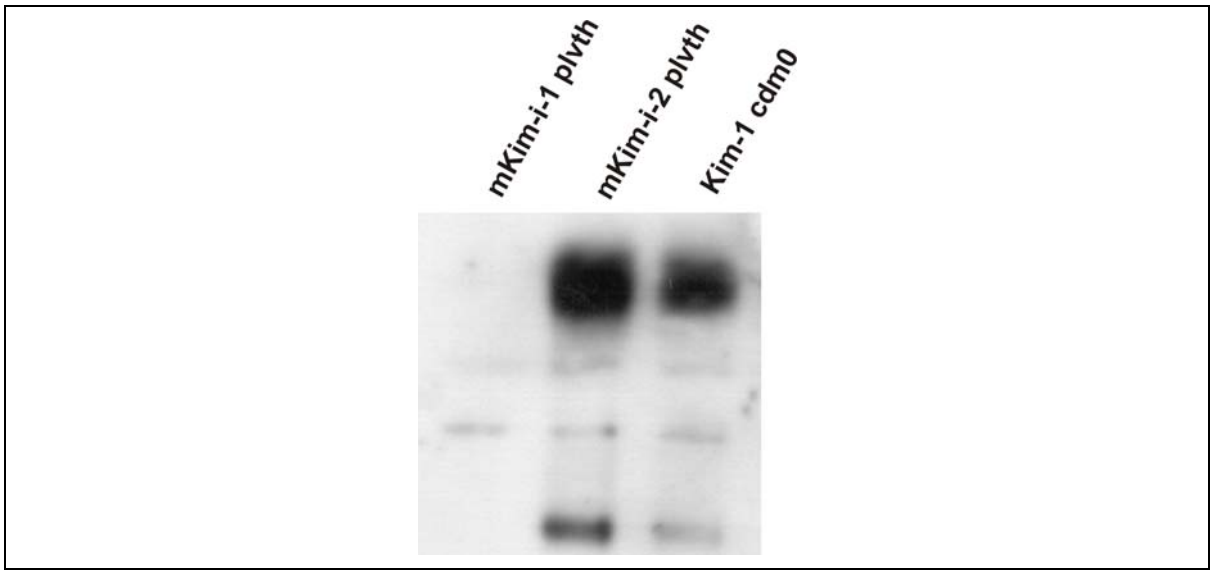

Abbildung 12: *Kim-1* Knock-down. Das Interferenz-Konstrukt *mkim-i-1 plvth* zeigt einen deutlichen Knock-down gegenüber dem Kontrollkonstrukt *cdm0*. Das Konstrukt *mkim-i-2 plvth ist dagegen wirkungslos.*

4.4.1 Einfluß der Kno ck-down Konstrukte *mkim-i-1* und *dkim-i-1* auf das Tight junction Protein ZO-1

Epithelien dienen als selektive Permeabilitätsbarrieren, die Flüssigkeiten mit unterschiedlicher Zusammensetzung trennen. Bei der Aufrechterhaltung dieser Barrierefunktion spielen die Tight junctions (Zonulae occludentes) eine doppelt wichtige Rolle. Zum einen bilden sie eine Barriere gegen das Hin- und Herdiffundieren der Membranproteine zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran, zum anderen verbinden die Tight junctions benachbarte Zellen so eng miteinander, dass wasserlösliche Moleküle nicht zwischen ihnen hindurchsickern können. Tight junctions bestehen aus eine Vielzahl von zytoplasmatischen und transmembranösen Proteinen, die mit einer ähnlichen Proteingruppe benachbarter Zellen interagieren. Eines dieser zytoplasmatischen Tight junction Proteine ist ZO-1.[27] Es fungiert in den folgenden Experimenten als Markerprotein für die Polarisierung der Epithelzellen, weil Tight junctions sich frühzeitig in-vitro ausbilden und die apiko-basolaterale Polarisierung einleiten.

Wie bereits erwähnt ist die Kim-1 Expression eng mit tubulären Schädigungen assoziiert. Dabei ist unklar, ob die erhöhte Expression eine passive Folge der Schädigung ist, oder ob Kim-1 eine aktive Rolle in der Redifferenzierung der Tubulusepithelzellen spielt. Um die Rolle von Kim-1 auf den Polarisierungsprozess der Tubulusepithelzellen zu untersuchen, sollte die Kim-1-Expression mittels Knock-down durch siRNA unterdrückt, und der Einfluss auf die Expression von ZO-1 beurteilt werden. Hierzu wurden IMCD und MDCK Zellen auf runden Deckgläschen ausgesät und mit den GFP markierten Kim-1 Knock-down Konstrukten *mKim-i-1* und *dKim-i-1* transduziert. Bei den folgenden Immunfluoreszenzuntersuchungen diente ZO-1 als Primärantikörper in einer 1:4000 Verdünnung. Sekundärantikörper waren Anti-Maus Cy-3 in einer 1:500 Verdünnung und ein Höchst 33342 Antikörper zur Kernfärbung in einer Konzentration von 1:1000. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte fluoreszenzmikroskopisch. Die dargestellten Resultate wurden mit Zellen verglichen, die mit einem Leervirus (*plvth*) in MDCK-Zellen und dem wirkungslosen siRNA exprimierenden Virus (*mKim-i-2 plvth*) in IMCD-Zellen transduziert waren.

In Abb.13 sind Kim-i-1 exprimierende Zellen durch die deutliche Expression des GFP Reporters zu erkennen. Die Tight junctions sind durch eine intensive Rotfärbung zu sehen. Eine Übereinanderlagerung zeigt, dass die Expression von Kim-i-1 keinen Einfluss auf die Ausbildung der Tight junctions hat.

- IMCD Zelllinie

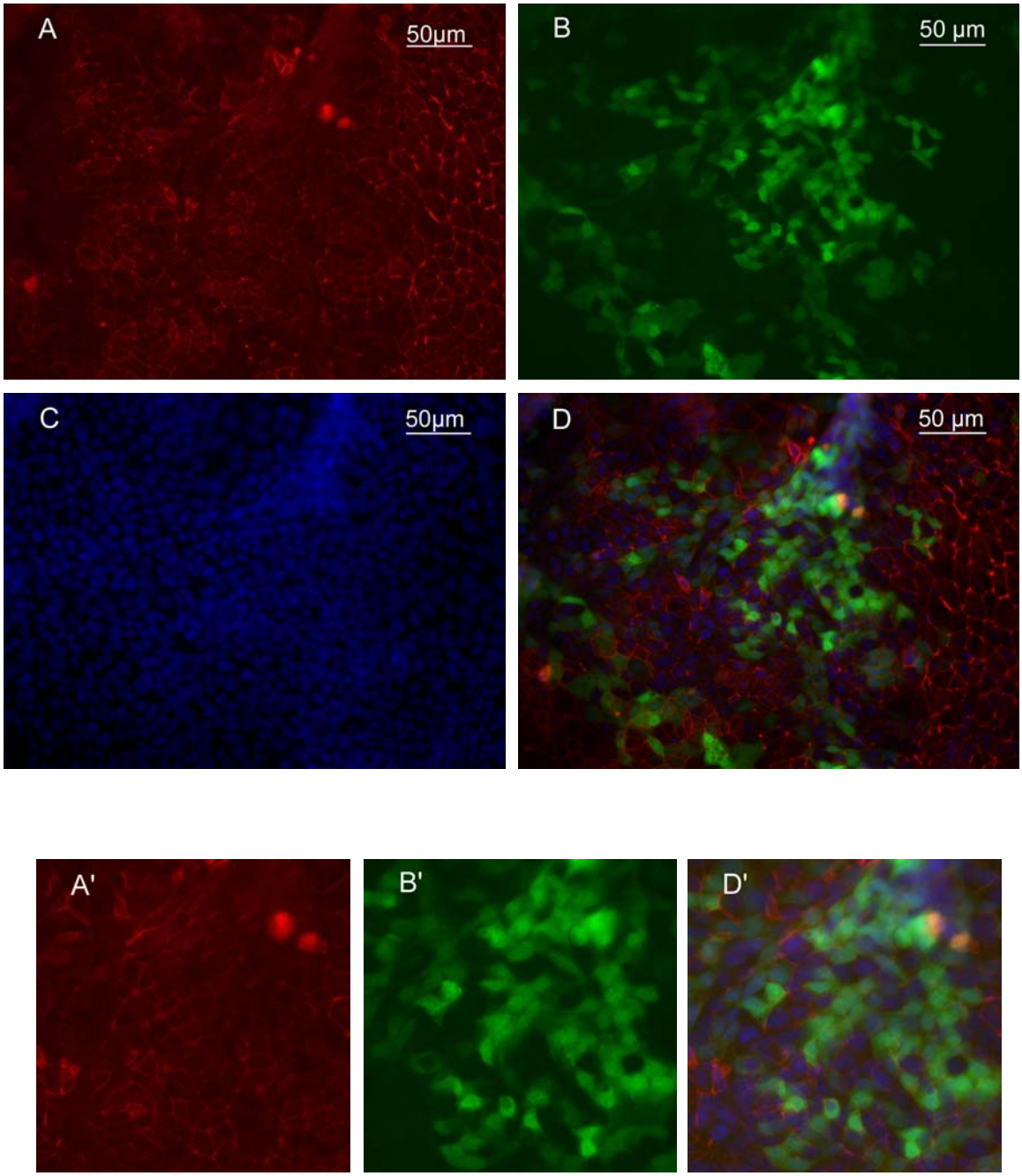

Abbildung 13: IMCD-Zellen mit murinem *mKim-i-1 plvth* stabil transduziert. Mit dem Knock-down *mkim-i-1 plvth* stabil transduzierte IMCD Zellen sind durch die Expression des GFP Reporters gekennzeichnet. Diese Zellen zeigen den gleichen Grad von ZO-1 Expression wie GFP negative, Kim-1 exprimierende Zellen. A: Tight junctions (rot), B: Knock-down *mkim-i-1* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (400-fache Vergrößerung); A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Abb. 14 zeigt das Kontrollexperiment mit dem wirkungslosen siRNA Konstrukt *mKim-i-2 plvth* zusehen (Grün dargestellt *mKim-i-2* exprimierende Zellen, Tight junctions in intensivem Rot). Eine Übereinanderlagerung der Bilder weist keine Unterschiede zu dem Ergebnis aus Abbildung 13 auf.

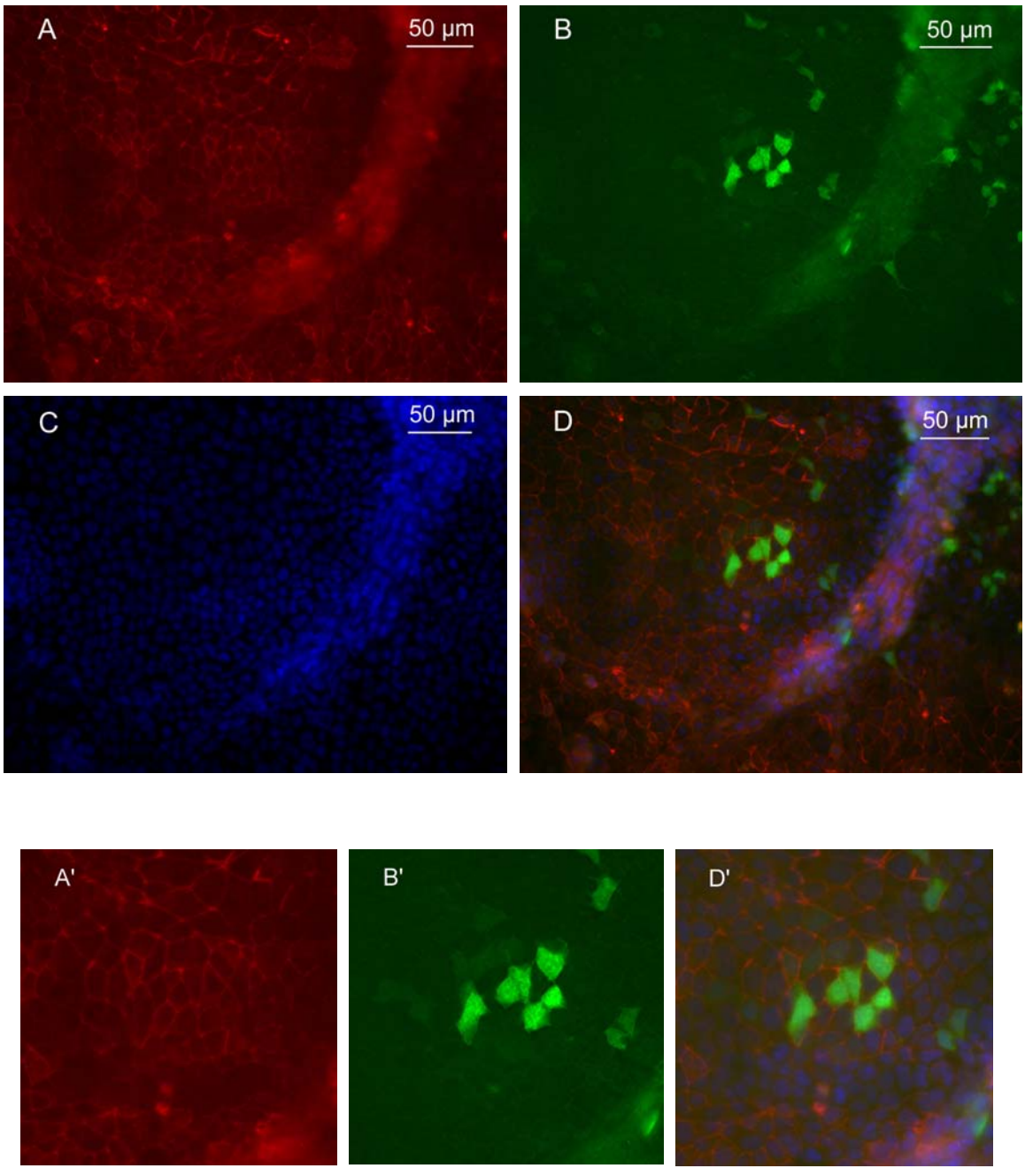

Abbildung 14: IMCD-Zellen mit dem Kontroll Konstrukt *mKim-i-2 plvth* stabil transduziert. Mit dem Knock-down *mkim-i-2 plvth* stabil transduzierte IMCD Zellen wurden gegen ZO-1 angefärbt. A: Tight junctions (rot), B: Knock-down *mkim-i-2,* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (400-fache Vergrößerung); A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Derselbe Versuch wurde mit *dKim-i-1 plvth* in MDCK-Zellen wiederholt. In Abb.15 sind *dKim-i-1* exprimierende Zellen durch Ihre Grünfärbung zu erkennen. Die Tight junctions, in rot dargestellt, erscheinen auch zwischen benachbarten Kim-1 Knock-down Zellen völlig normal.

- MDCK-Zelllinie

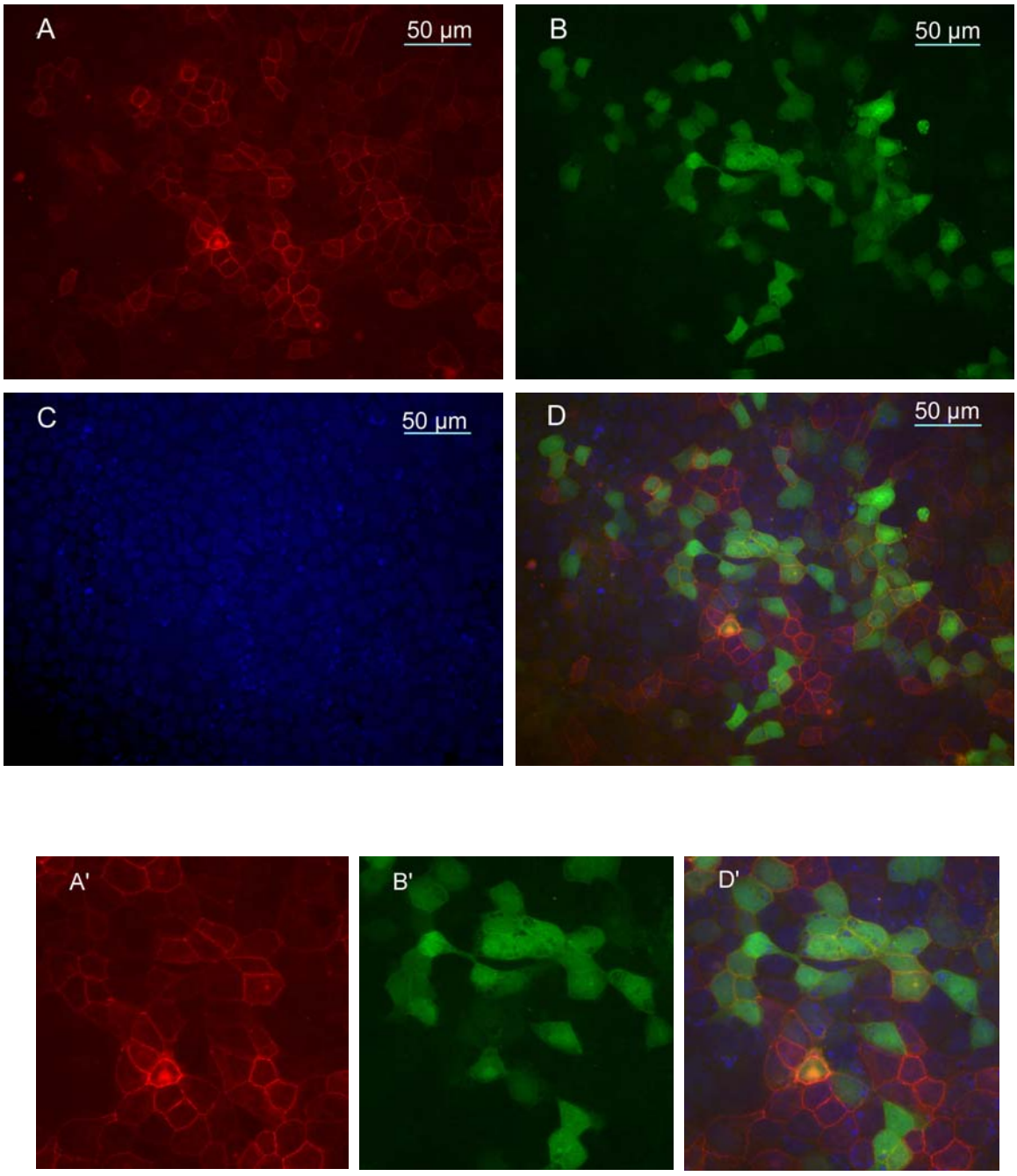

Abbildung 15: MDCK-Zellen mit dem caninen Knock-down Konstrukt dkim-i-1 *plvth* stabil transduziert. MDCK-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz gegen ZO-1 angefärbt. A: Tight junctions (rot), B: dkim-i-1 *plvth* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (400-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Das Kontrollexperiment (Abb. 16) mit dem Leervirus *plvth* (grün) und den Tight junctions (rot) zeigt im Vergleich der Expressionsmuster keinen Unterschied zu Abbildung 15.

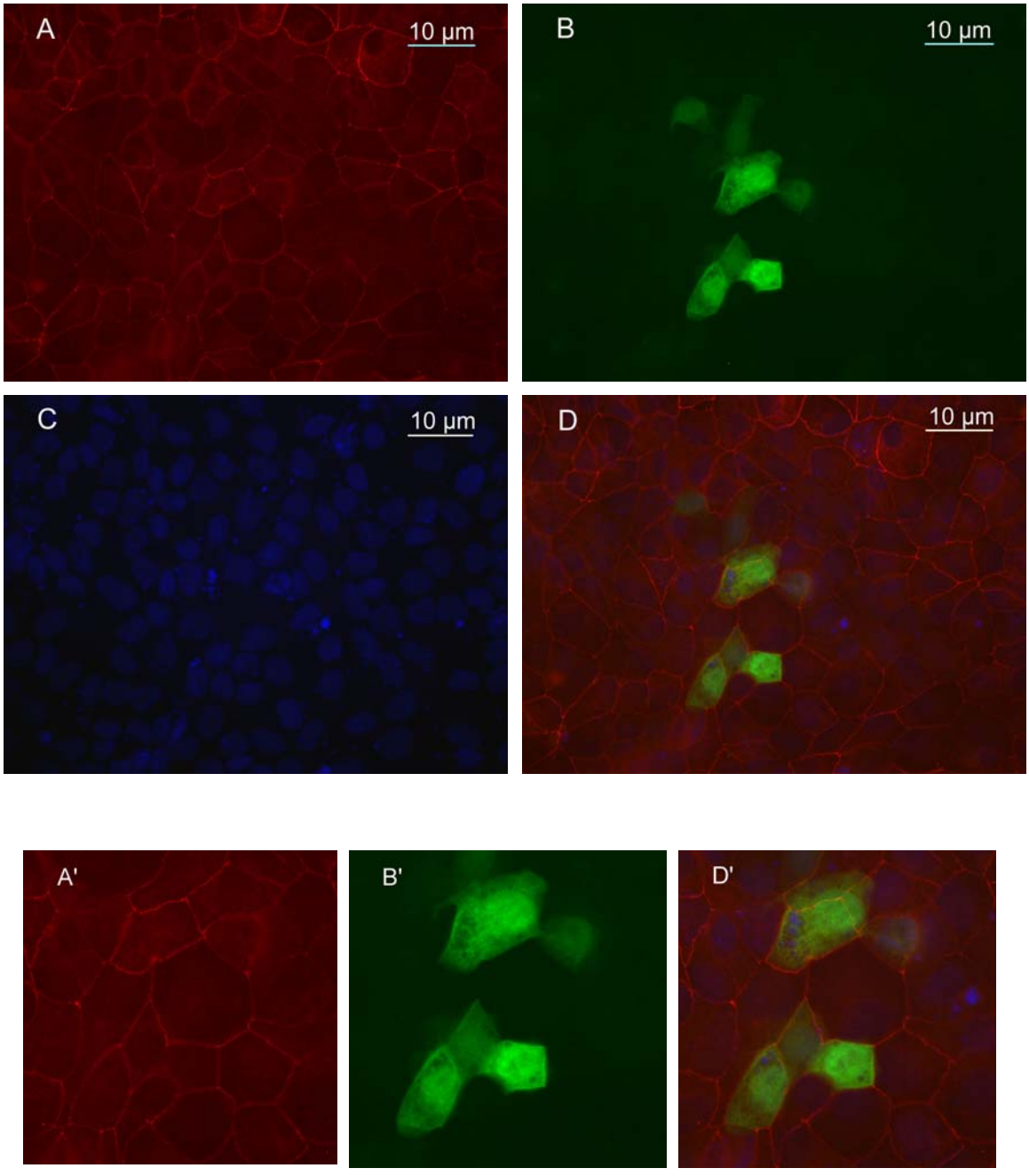

Abbildung 16: MDCK-Zellen stabil mit dem Leervirus *plvth* transduziert. Immunfluoreszenz mit *plvth* stabil transduzierten MDCK-Zellen gegen ZO-1 (A, rot) angefärbt. B: *plvth* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung von A, B und C (630-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Diese Daten zeigen, dass es keinen Unterschied im Expressionsmuster von ZO-1 zwischen Zellen mit unterschiedlichem Kim-1 Expressionsniveau gibt. Somit scheint Kim-1 keine Rolle in der apiko-basolateralen Polarisierung zu spielen.

4.4.2 Untersuchungen des Ein flusses der Knock- down Konstrukte *mkim-i-1 plvth* und *dkim-i-1* auf die Ziliogenese

Primäre Zilien sind nicht aktiv bewegliche, ins Lumen reichende mikrotubuläre Strukturen, die durch intraflagellaren Transport (IFT) vom Basalkörperchen aus aufgebaut werden.[68] Mikrotubuli bestehen aus Tubulin, dessen Untereinheiten nach einer Polymerisation kovalent modifiziert werden können. Zwei Modifikationen sind dabei besonders interessant, weil sie eine Art molekularer Uhr darstellen. Sie zeigt an, wie lange die Polymerisation eines Tubulins zurückliegt. Eine Modifikation ist die Acetylierung des α-Tubulins an einem bestimmten Lysinrest, die zweite die Entfernung des Tyrosins vom Carboxy-Ende des α-Tubulins. Besonders durch die Acetylierung lässt sich die Stabilität und Reifung eines Mikrotubulins nachweisen. Publizierte Daten konnten zeigen, dass Störungen des IFT durch Gendepletion mit einer gestörten Zilienbildung einhergehen können.[87]

Zur Klärung der Frage, inwieweit Kim-1 eine Rolle in der Zilienbildung spielt wurde das Kim-1 Expressionsniveau durch die siRNA Konstrukte *mKim-i-1 plvth* in IMCD und *dKim-i-1 plvth* in MDCK-Zellen reduziert. Die Ziliendarstellung erfolgte anhand einer Immunfluoreszenzfärbung gegen acetyliertes Tubulin.

MDCK und IMCD Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit den GFP markierten Kim-1 Knock-down Konstrukten *mKim-i-1* und *dKim-i-1* transduziert. Acetyliertes α-Tubulin wurde mit dem Primärantikörper anti-Maus-acetyliertes Tubulin (Verdünnung 1:4000) angefärbt. Als Sekundärantikörper wurden Anti-Maus-Cy-3 und Höchst 33342 für die Kernfärbung verwendet. Die Dokumentation erfolgte mittels eines Epifluoreszenzmikroskopes. Das Kontroll siRNA exprimierende Virus *mkim-i-2 plvth* in IMCD-Zellen und das Leervirus *plvth* in MDCK-Zellen stellten die Kontrollkonstrukte dar. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine mögliche veränderte Zilienstruktur oder Zilienlänge gelegt.

In Abb.17 sind erneut Kim-i-1 exprimierende Zellen durch ihre Grünfärbung zu erkennen. Das Zilium ist durch seine intensive Rotfärbung zu sehen. Die Übereinanderlagerung zeigt, dass auch GFP positive Zellen, welche das Knock-down Konstrukt exprimieren, normale Zilien aufweisen.

- IMCD-Zelllinie

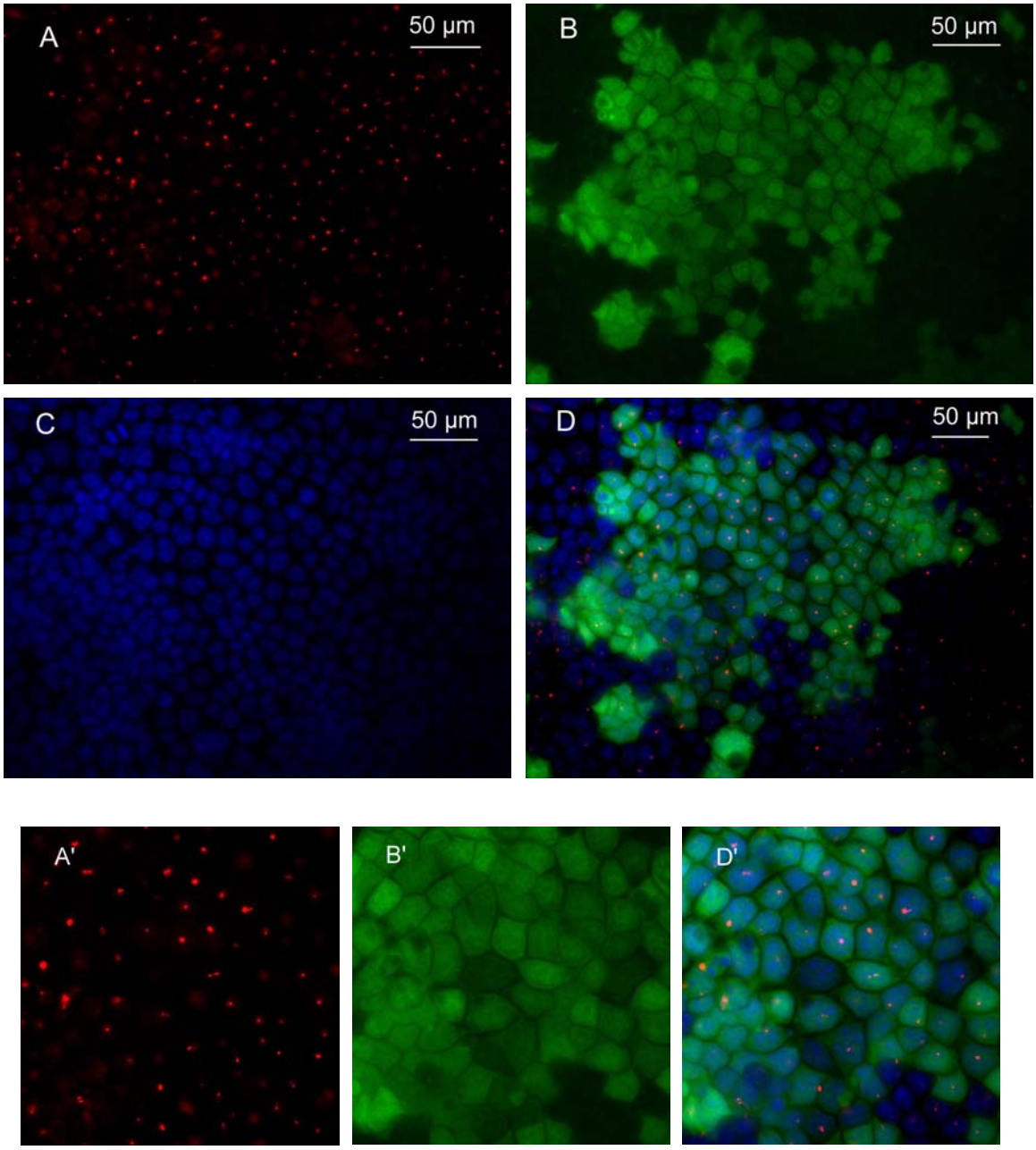

Abbildung 17: IMCD-Zellen mit murinem *mKim-i-1 plvth* stabil transduziert. Mit dem Knock-down *mkim-i-1* plvth stabil transduzierte IMCD Zellen wurden mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Acetyliertes Tubulin angefärbt. A: Darstellung der Zilien (rot), B: Kim Knock-Down *mkim-i-1 plvth,* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342, D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (400-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Im Kontrollexperiment (Abb. 18) mit dem siRNA Kontrollkonstrukt *mkim-i-2 plvth,* deutlich in grün erkennbar und den Zilien in rot, lässt sich bei der Übereinanderlagerung der Bilder kein Unterschied zu Abbildung 17 erkennen.

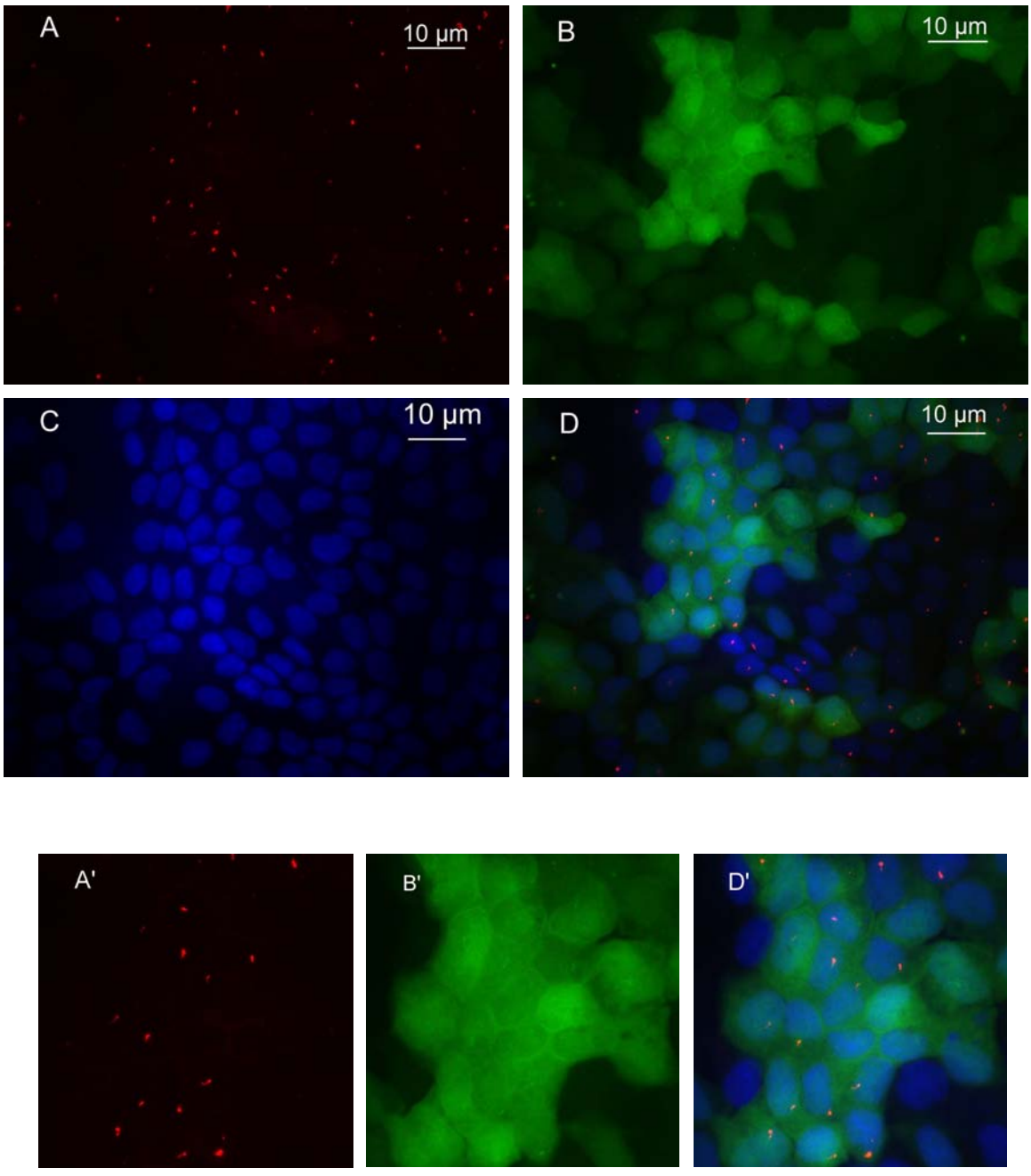

Abbildung 18: IMCD-Zellen mit dem murinem Kontrollkonstrukt *mKim-i-2 plvth* stabil transduziert**.** Mit *mKim-i-2 plvth* stabil transduzierte IMCD Zellen wurden mit einer Immunfluoreszenzfärbung gegen Acetyliertes Tubulin angefärbt. A: Darstellung der Zilien (rot), B: Kim Kontrollkonstrukt *mkim-i-2 plvth,* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342, D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (630-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

In Abb.19 sind *dKim-i-1 plvth* exprimierende MDCK Zellen grün markiert Die Zilien sind an der intensiven Rotfärbung zu erkennen. Eine Übereinanderlagerung der Bilder lässt keine veränderten Zilien erkennen.

- MDCK-Zelllinie

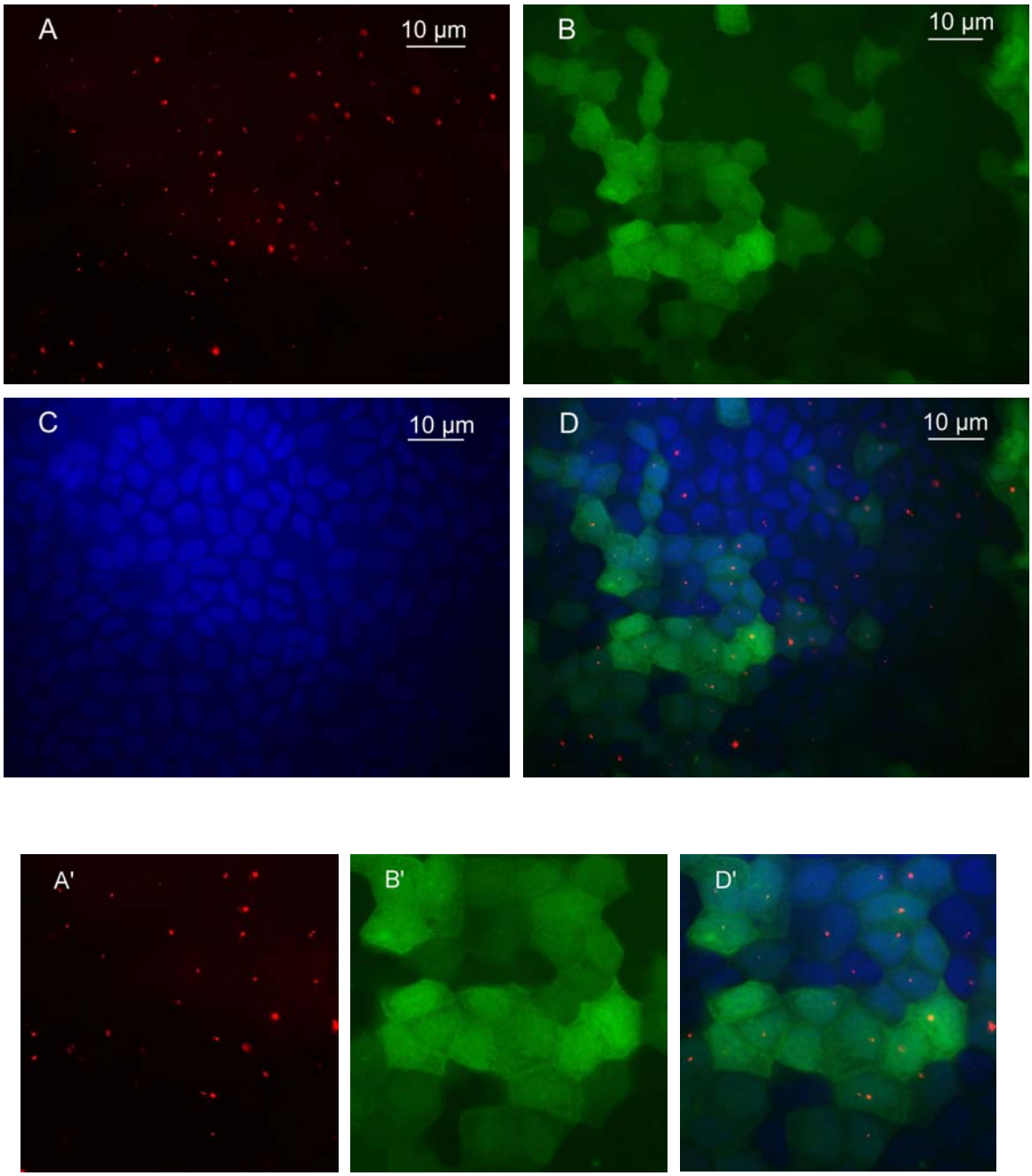

Abbildung 19: MDCK-Zellen mit dem caninen Knock-down Konstrukt dkim-i-1 *plvth* stabil transduziert. MDCK-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz gegen acetyliertes Tubulin angefärbt. A: Zilien Darstellung (rot), B: *dkim-i-1 plvth,* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (630-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Das Kontrollexperiment mit dem Leervirus *plvth* in grün ist in Abbildung 20 zu sehen. Die Zilien sind rot dargestellt. Auch hier zeigt die Übereinanderlagerung der Bilder keinen Unterschied im Expressionsmuster im Vergleich zu dem vorherigen Versuch (Abb. 19).

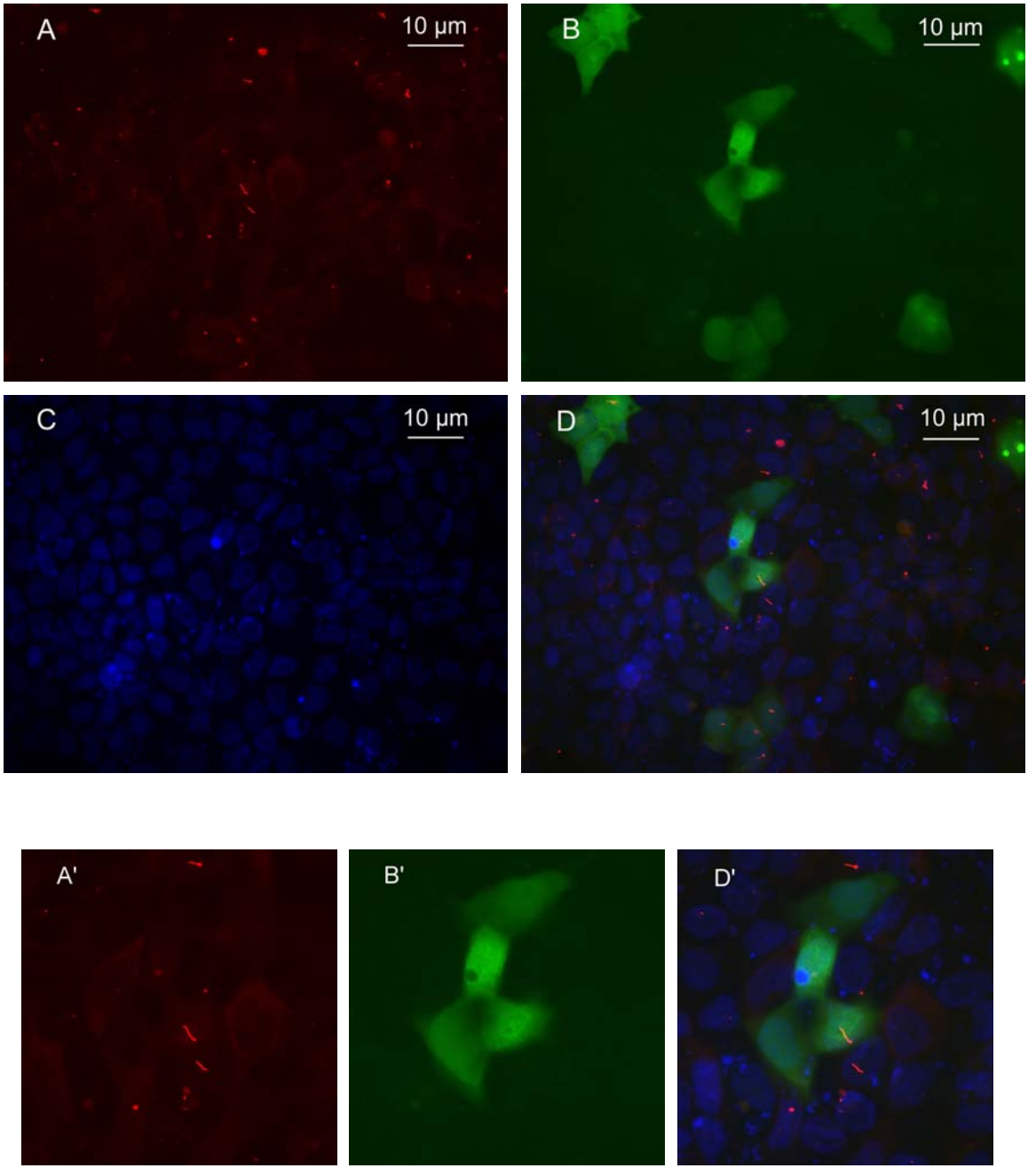

Abbildung 20: MDCK-Zellen mit dem Leervirus *plvth* stabil transduziert. MDCK-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz gegen acetyliertes Tubulin angefärbt. A: Ziliendarstellung (rot), B: *plvth* GFP markiert (grün), C: Kernfärbung mit Höchst 33342 (blau), D: Übereinanderlagerung der Bilder A-C (630-fache Vergrößerung). A', B' und D' sind Ausschnitte von A, B und D.

Bei diesen Knock-down Experimenten durch siRNA gegen Kim-1 in MDCK- und IMCD-Zellen zeigte sich kein anatomischer Ziliendefekt. Zilienlänge und Zilienstruktur waren im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert. Somit ergeben sich keine Hinweise einer Funktion von Kim-1 im Bereich der strukturellen Integrität von Zilien.

Kapitel 5
Diskussion

5.1 Kim-1 ist ein ziliäres Signaltransduktionsmolekül

Nachdem die Lokalisation von Kim-1 in Zilien kultivierter Epithelzellen nachgewiesen war, konnte Kim-1 erstmalig auch in Zilien von intakten Tubuli in-vivo detektiert werden.[40] Diese Erkenntnis unterstreicht die Möglichkeit einer Rolle von Kim-1 in der physiologischen Funktion des Primärziliums. Bereits die Struktur der Tim Proteine mit variabler IgV Domäne und hoch konserviertem zytoplasmatischen Schwanz deutet auf eine Funktion als Rezeptor in Signaltransduktionswegen hin. Zusätzlich ist ein Tyrosinkinase-Phosphorylierungsmotiv bei Tim-1, Tim-2 und Tim-3 beschrieben.[38] Vor Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass das konservierte Tyrosin350 in humanem Kim-1 durch ITK phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung dieses Tyrosins ist für die Interaktion von Kim-1 mit dem ziliären Protein Inversin notwendig.[39]

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Koexpression von Kim-1 die Wnt Aktvität in einem Luziferase-basierten in-vitro Ansatz antagonisiert. Der klassische, kanonische Wnt-Signalweg ist durch die Stabilisierung von zytosolischem ß-Catenin charakterisiert, welches in den Nukleus wandert, um dort die TCF/LEF abhängige Gentranskription zu aktivieren.[35,43,48] Tatsächlich konnte nachgewiesen werden, dass die Kim-1 Expression in HEK 293t Zellen zu einer reduzierten intrazellulären ß-Catenin Konzentration führt. Dieser Befund spricht ebenfalls dafür, dass Kim-1 den kanonischen Wnt Signalweg antagonisiert. In beiden experimentellen Ansätzen zeigt sich der antagonisierende Effekt deutlich reduziert, wenn das konservierte Tyrosin350 mutiert war, und somit nicht phosphorylierbar war. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Beobachtung, dass Kim-1 nur in Gegenwart von Tyrosin350 mit Inversin interagiert. Neben der antagonisierenden Rolle von Kim-1 im kanonischen Wnt Signalweg wurde umgekehrt ein agonistischer Effekt auf die AP-1 vermittelte Transkription gefunden. Im non-kanonischen, alternativen Wnt-Signalweg, kommt es über Aktivierung von JNK zur Rekrutierung von AP-1

Transkriptionsfaktoren,[1,2,15,82] so dass eine Aktivierung dieses Signalweges möglich erscheint. In den vorliegenden Daten zeigte sich für diese Funktion kein Hinweis auf eine Rolle des konservierten Tyrosin350.
Die hier dargestellten Ergebnisse sind mit einem Modell vereinbar, wonach Kim-1 in einem ziliären Komplex mit Inversin organisiert ist und die Funktion von Inversin als molekularer Schalter zwischen kanonischem und alternativem Wnt Signalweg unterstützt.[76] Unklar ist an dieser Stelle inwieweit Inversin oder Kim-1 die relevanten Signalüberträger sind. Ebenfalls ungeklärt ist die Rolle des Kim-1 Liganden Tim-4.[53]

5.2 Die Rolle von Kim-1 in der epithelialen Differenzierung

In verschiedenen Modellen, wie beispielsweise dem Ischämie/Reperfusionsmodell mit 5/6-Nephrektomie ist die Kim-1 Expression eng mit tubulärer Schädigung durch Ischämie oder Toxine assoziiert.[23,24,29,40] Unklar ist, ob Kim-1 Expression die passive Folge einer Schädigung ist, oder ob Kim-1 eine aktive Rolle in der Dedifferenzierung und Redifferenzierung der Tubulusepithelzellen spielt. Erste Hinweise auf eine Assoziation von Kim-1 Expression mit Dedifferenzierung ergaben sich aus der Beobachtung, dass Kim-1 in Tubuluszellen in Nierenzysten hochreguliert ist. Diese Zellen weisen einen Differenzierungsverlust auf und haben darüber hinaus eine Ziliendysfunktion. In der Folge gelang der Nachweis der Kim-1-Expression in der Mehrheit von Nierenzellkarzinomen.[23] Da Zellen dieser Tumorentität hochgradig undifferenziert sind, ergibt sich auch hier die Frage nach dem Kausalzusammenhang. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit fortschreitender Differenzierung von Tubuluszellen geringere Mengen an Kim-1 exprimiert werden. Diese Daten korrelieren eng mit den Ergebnissen von Dr. Gerke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Walz, der die Genexpression mittels Gene Array in differenzierenden IMCD Zellen untersuchte. Er konnte ebenfalls zeigen, dass Kim-1 zwischen dem 2. und 4. Tag nach Passagierung herabreguliert wird. Diese Resultate weisen erstmalig auf eine physiologische Rolle bei der Differenzierung von Epithelzellen hin und stehen im Gegensatz zur Assoziation mit einer möglichen De-differenzierung der Zellen im Falle pathologischer Prozesse. Die physiologische Rolle von Kim-1 wird zudem durch die subzelluläre Verteilung unterstrichen: Es wurde nämlich gezeigt, dass Kim-1 in der nicht polarisierten Zelle über die ganze

Zellmembran verteilt ist. Mit steigender Polarisation ist seine Expression jedoch nur noch auf die apikale Zellmembran und das Zilium beschränkt.[39]
Es gibt eine Reihe von Hinweisen darauf, dass das primäre Zilium eine große Rolle in der Polarität von Epithelzellen spielt.[28] Dieses wird durch die Tatsache unterstützt, dass dysfunktionale Zilien durch mutierte Proteine mit einer gestörten Zellpolarität, Proliferation und einem vergrößerten Tubuluslumen einhergehen, was letztlich zur Zystenbildung führt.[44,45,59,62,87] In dieser Arbeit wurde getestet, ob die Störung der Kim-1 Expression mittels Knock-down durch siRNA[8,9,52,73] die Polarisierung der Tubuluszellen beeinträchtigt. Als Markerprotein für die Polarisierung der Epithelzellen wurde das Tight junction assoziierte Protein ZO-1 (Zonula-occludens Protein 1) untersucht. Tight junctions sind apikal orientierte Strukturen, die eine Permeabilitätsbarriere gegen das willkürliche Hin- und Herdiffundieren der Membranproteine zwischen apikaler und basolateraler Plasmamembran bilden. Sie verbinden die Lateralmembran benachbarter Zellen so eng miteinander, dass wasserlösliche Moleküle nicht zwischen ihnen hindurchtreten können und erzeugen somit stabile chemische und elektrische Gradienten. Sie bilden sich bereits frühzeitig in-vitro aus und leiten die apiko-basolaterale Differenzierung der Epithelzellen ein.
Durch lentivirale Transduktion von siRNA konnte die Expression von endogenem Kim-1 in MDCK und IMCD Zellen effektiv unterdrückt werden. Unerwarteterweise zeigten jedoch Zellen mit erfolgreichem Kim-1 Knock-down, die durch eine starke GFP Expression gekennzeichnet waren, keinen Unterschied im Expressionsmuster von ZO-1, verglichen mit GFP negativen Zellen oder GFP positiven Zellen, die mit einem Leervirus oder einem Kontroll-siRNA exprimierenden Virus transduziert waren. Anhand dieser Daten, die mit unterschiedlichen Konstrukten in unterschiedlichen Zelllinien erhoben wurden, muss eine Rolle von Kim-1 in der apiko-basolateralen Polarisierung als unwahrscheinlich angesehen werden.

Andererseits kann auf der Grundlage der vorliegenden Daten eine Rolle von Kim-1 in der Differenzierung von Epithelzellen nicht ausgeschlossen werden. Im vorhergehenden Abschnitt wurde diskutiert, dass Kim-1 möglicherweise als Schalter im Wnt Signaltransduktionsweg fungiert. Die unkontrollierte Aktivierung des kanonischen Wnt Signalweges spielt eine wichtige Rolle bei der epithelialen Tumorentstehung, insbesondere bei Kolonkarzinomen.[67] Als ziliäres Protein dient Kim-1 möglicherweise der Antagonisierung des Wnt-Signalweges und erfüllt auf

diese Weise eine Funktion bei der Erhaltung der epithelialen Integrität und planaren Polarisierung von Tubuluszellen.
Die planare Polarität, beschrieben in der Flügelentwicklung von Drosophila durch die asymmetrische Lokalisation von Proteinen (z.B. Frizzled, Dishevelled, Flamingo), bezeichnet die laterale Polarisation der Zellen im Epithelverband. Sie erlaubt es den Zellen sich innerhalb eines Epithels zu orientieren, erkennt damit an sie adressierte Signale und kann eine gerichtete Reaktion zurückgeben. Man geht davon aus, dass die Zilienfunktion eine entscheidende Rolle für diesen Polarisierungprozess spielt. Verschiedene Autoren führen in diesem Zusammenhang den Phänotyp der polyzystischen Nierenerkrankung auf eine gestörte planare Polarisierung zurück.[20,76,19] Leider sind bisher keine Tiermodelle mit einer Kim-1 Gendeletion publiziert worden, weshalb die Aufgabe von Kim-1 bei der planaren Zellpolarität zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt ist.

5.3 Kim spielt keine essentielle Rolle in der Ziliogenese

Zilien weisen als wesentliche Struktur 9 paarige, im Kreis angeordnete Mikrotubuli auf, die neben einer Stützfunktion auch eine Funktion als Leitschiene für die ins Zilium zu transportierenden Proteine haben den so genannten intraflagellaren Transport (IFT).[61-63,68,71] Die Mikrotubuli sind an ihrem Ende im Basalkörperchen verankert. Störungen des IFT durch Gendeletion sind mit einer gestörten Zilienbildung verbunden. Jedoch führt der funktionelle Verlust von Zilienproteinen, wie zum Beispiel von Polycystin2, nicht immer zu deren Verlust. In dieser Arbeit wurde in Knock-down Experimenten durch siRNA gegen Kim-1 in MDCK- und IMCD-Zellen kein anatomischer Ziliendefekt gefunden. Der ziliäre Phänotyp war im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert. Diese Daten machen eine Funktion von Kim-1 für die strukturelle Integrität der Zilien unwahrscheinlich. Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen jedoch, dass das renale Primärzilium sowohl als Mechanosensor als auch als Chemosensor fungieren kann.[31,45,46,56,59,65,66] Da Kim-1 sowohl eine Rezeptorstruktur hat als auch - wie in dieser Arbeit gezeigt - Signaltransduktionsaktivität besitzt, ist es wahrscheinlich, dass Kim-1 in der Sensorfunktion des Primärziliums eine Rolle spielt.

5.4 Schlussbetrachtung und Ausblick

Die hier erhobenen Befunde eröffnen interessante Aspekte hinsichtlich der Frage der Funktion von Kim-1 in Tubulusepithelzellen. In Anbetracht der in-vitro gewonnen Ergebnisse über die Funktion von Kim-1 im Wnt-Signalweg ist es notwendig diese Funktion in-vivo zu untermauern. Hierbei ist der Xenopusembryo (Krallenfroschembryo) ein gutes Modell zur Erforschung des kanonischen Wnt Signalweges. Überexpression von Dvl durch Mikroinjektion in den Embryo bewirkt die Ausbildung einer zweiten Körperachse.[76] In Analogie zu Inversin wäre es interessant zu prüfen, ob die Koexpression von Kim-1 die Doppelachsenformation unterdrücken kann. Zur Klärung der Frage, ob Kim-1 oder Inversin die relevanten Signaltransduktoren für die modulatorische Funktion im Wnt Weg sind, würde eine Injektion von Dvl mit Inversin und der Kim-1 Mutante an Y350 in Xenopusembryos in entscheidendem Maße beitragen. Da diese Mutante nicht an Inversin bindet, ist es vorstellbar, dass die Kim-1 Mutante die Inversin-Funktion unterbindet. Dies würde dafür sprechen, dass Kim-1 das relevante Schaltermolekül im Wnt Signalweg ist.

Kim-1 scheint keine Rolle in der Ausbildung der apiko-basolateralen Polarität zu spielen. Ein nächster Schritt in diese Richtung könnte die Untersuchung des Verhaltens von Kim-1 Knock-downs Zellen in einer dreidimensionalen Gelmatrix sein. Sowohl IMCD als auch MDCK Zellen haben die Eigenschaften unter solchen Bedingungen Tubuli auszubilden. Sollte Kim-1 eine Funktion in der planaren Polarisierung spielen, so wäre zu vermuten, dass die Tubulusbildung in-vitro gestört ist. Ein weiteres Modellsystem zur Erforschung der Rolle von Kim-1 in der Differenzierung sowie der Zilienfunktion ist das Zebrafischmodell.[12] Im Zebrafischembryo lassen sich Gene in-vivo durch Injektion chemisch modifizierter RNAi herunterregulieren. Für Zilienproteine wie Inversin oder PKD2 sind mit diesem Ansatz Zystenbildungen beschrieben worden.[60] Durch elektronische Datenanalyse ist ein Zebrafisch-Ortholog für Kim-1 gefunden worden. Im Falle einer relevanten Funktion von Kim-1 für die planare Polarisierung wäre zu erwarten, dass die Herabregulierung der Kim-1 Expression durch RNAi im Zebrafisch zur Ausbildung von Zysten führt. Ein weiteres Modell zur Erforschung dieser Fragestellung ist die Knock-out Maus, die aber eine ungleich höhere Investition an Zeit und finanziellen Mitteln erfordert.

Zuletzt stellt sich die Frage nach der Rolle von Kim-1 in der sensorischen Funktion des Primärziliums. Bisherige Daten deuten darauf hin, dass die mechanische Auslenkung der Zilien, zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums führt. Sollte Kim-1 in dieser Funktion eine wesentliche Rolle spielen, dann würde man bei Kim-1 Knock-out Zellen ein Ausbleiben des Kalziumanstiegs nach mechanischer Stimulation erwarten. Angesichts der zentralen Rolle von Y350 für die Kim-1 Signaltransduktion ist es auch denkbar, dass die Überexpression der Y350F Mutante die Kalziumantwort verhindert. Da Tim-4 als extrazellulärer Ligand von Kim-1 beschrieben worden ist, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Bindung von Tim-4 an Kim-1 zum Kalziumanstieg in der Zelle führt, und inwieweit die Expression der Kim-1Y350F Mutante diesen Einstrom verhindert.

Kapitel 6
Zusammenfassung

Kim-1 (kidney injury molecule 1), ein Mitglied der TIM (T cell immunglobulin mucin) Familie ist ein glykosyliertes Typ 1 Transmembranprotein Es wird in Tubulusepithelzellen nach ischämisch induziertem akuten Nierenversagen oder nach chemisch-toxischem Schaden hochreguliert. Kim-1 wird zudem häufig in Nierenkarzinomen und in Nierenzysten bei der Polyzystischen Nierenerkrankung exprimiert, während es in gesunden Nierenzellen nur minimal nachweisbar ist.

Es häufen sich Hinweise, dass die Ausbildung von Nierenzysten eng mit einer Dysfunktion der primären Zilien verknüpft ist. Primäre Zilien sind fadenförmige Organellen, die im Basalkörperchen verankert aus der apikalen Zellmembran von Nierenepithelzellen herausragen und mechanosensorische Eigenschaften besitzen. Kim-1 ist in solchen Zilien von immortalisierten Tubulusepithelzelllinien lokalisiert und nimmt offenbar Einfluss auf die Wnt-Signaltransduktion. Die Expression der Wnt Proteine ist entwicklungsbiologisch essentiell für eine Reihe grundlegender zellulärer Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Polarisierung und Adhäsion. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle während der frühen Embryonalentwicklung.

Trotz deskriptiver Daten über die Expression von Kim-1 in dedifferenzierten Tubulusepithelzellen nach einer Schädigung, ist noch wenig über die funktionelle Rolle von Kim-1 in der Differenzierung von Nierenepithelzellen bekannt. Zielsetzung dieser Arbeit war es zu klären, ob Kim-1 Expression mit dem Differenzierungsgrad von Epithelzellen korreliert ist. Dabei konzentrierte sich das Interesse auf die epitheliale Polarisisierung und auf die Ziliogenese von Tubulusepithelzellen.

Tubulusepithelzellen wurden phänotypisch mittels Immunfluoreszenz untersucht. Proteinexpression wurde mit SDS Polyacrylgelelektrophorese und Western Blot dargestellt. Signaltransduktionsaktivität wurde durch Reporteranalysen mittels Luziferaseaktivität gemessen. Genüberexpression erfolgte durch transiente Transfektion von kultivierten Zellen mittels der Kalziumchloridmethode. Genreduktion erfolgte durch lentivirale Transduktion von short interfering RNA (siRNA) kodierenden cDNAs.

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gewebeschnitten von Mäusenieren ergaben, dass Kim-1 im primären Zilium von Tubulusepithelzellen in Mäusenieren lokalisiert ist. Die Expression korreliert mit dem Differenzierungsgrad von tubulären Epithelzellen. Unter Verwendung eines Reporters für den Wnt Signaltransduktionsweg wurde gezeigt, dass Kim-1 die aktivierende Funktion von Dishevelled antagonisiert, und dass die konservierte Tyrosindomäne dabei notwendig ist. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass dieser Effekt über eine Verminderung des cytosolischen ß-Catenin Gehalts vermittelt wird. In Reporteranalysen wurde weiterhin gezeigt, dass Kim-1 den alternativen Wnt Signalweg über JNK und die Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren aktiviert. In immortalisierten Tubulusepithelzelllinien zweier unterschiedlicher Spezies konnte nach Reduktion von Kim-1 Expression durch Knock-Down weder ein Einfluss auf die epitheliale Polarität noch auf die Ziliogenese des primären Ziliums gezeigt werden.
Diese Daten veranschaulichen, dass Kim-1 ein ziliäres Protein ist, das wahrscheinlich keine aktive Rolle in der Zellpolarität oder der Ziliogenese spielt, das aber in Signalprozesse des Wnt Signalweges verwickelt zu sein scheint und möglicherweise als molekularer Schalter zwischen kanonischem und non-kanonischem Wnt Signalweg eine Rolle in der epithelialen Differenzierung spielt.

Kapitel 7

Summary

Functional characterization of the role of Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) in the differentiation of mammalian tubular epithel cells

Kim-1 (kidney injury molecule-1), a member of the TIM (T-cell immunglobulin mucin) family is a glykosylated type 1 transmembrane protein, which is markley upregulated during the repair of renal epithel cells after ischemia and in malignant and cystic kidney disease, while expressed at low levels in normal kidneys. In previous experiments Kim-1 has been shown to localize in primary cilia of cultured renal epithelial cells in-vitro. Primary cilia have been shown to play a role in development and recently cilial dysfunction has been shown to be the unifying defect causing polycystic kidney disease. Kim-1 interacts with Inversin, a ciliary protein, which is mutated in Type 2 nephronophthisis, and which has been shown to modulate the Wnt pathway by targeting Dishevelled (Dvl) for proteasomal degradation. The expression of Wnt proteins is necessary for many fundamental processes in differentiation, proliferation, polarity and adhesion. Wnts play an important role in the early embryonic development. There is only limited knowledge on the physiological role of Kim-1 during differentiation, proliferation and survival of tubular epithel cells after renal injury. The aim of this study was to characterize the role of Kim-1 in epithelial polarization and ciliogenesis of tubular epithel cells outside of pathological injury models. Additionally the role of Kim-1 in the Wnt signaling pathway was examined. Renal tubular cells were analyzed phenotypically with immunfluorescence staining. Protein expression levels were detected by SDS PAGE and Western blot. Signaltransduction activity was measured in luciferase reporter assays. Protein overexpression was achieved with transient transfection of plasmid DNA in cultured cells after calcium chloride precipitation. Gene reduction was achieved through lentivirus-mediated transduction of short interfering RNAs. Examination of immunfluorescence stained cryosections showed, that Kim-1 is localized in-vivo in primary cilia of tubular epithelial cells in mouse kidneys. Kim-1 expression levels

correlate with the polarization of tubular epithel cells in-vitro. Reporter assays using TOP FLASH luciferase constructs revealed that Kim-1 reduced the Dvl-induced TOP FLASH activation and decreased steady-state levels of ß-Catenin in HEK 293t cells, suggesting that Kim-1 antagonizes the canonical Wnt pathway. Conversely Kim-1 expression increased AP-1 activity, which has been linked to the non-canonical Wnt pathway. Phenotypical characterization of two different immortalized renal epithelial cell lines after Kim-1 knock-down showed no changes in epithelial polarization, or ciliogenesis. These results suggest that Kim-1 is a ciliary protein that probably plays no active role in cell polarization or ciliogenesis, but may participate in the Wnt signaling pathway. Kim-1 may act as a molecular switch between the canonical and non-canonical Wnt pathway and thus may play a role in epithelial differentiation.

Literatur

1. Arnould, T. et al. The polycystic kidney disease 1 gene product mediates protein kinase C alpha-dependent and c-Jun N-terminal kinase-dependent activation of the transcription factor AP-1. *J Biol Chem* **273**, 6013-8 (1998).

2. Arnould, T. et al. Cellular activation triggered by the autosomal dominant polycystic kidney disease gene product PKD2. *Mol Cell Biol* **19**, 3423-34 (1999).

3. Bailly, V. et al. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* **277**, 39739-48 (2002).

4. Bonventre, J. V. & Weinberg, J. M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14**, 2199-210 (2003).

5. Boutros, M. & Mlodzik, M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* **83**, 27-37 (1999).

6. Boutros, M., Paricio, N., Strutt, D. I. & Mlodzik, M. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* **94**, 109-18 (1998).

7. Briskin, M. J., McEvoy, L. M. & Butcher, E. C. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* **363**, 461-4 (1993).

8. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**, 243-7 (2002).

9. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-3 (2002).

10. Chen, C. & Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **7**, 2745-52 (1987).

11. Chertow, G. M., Burdick, E., Honour, M., Bonventre, J. V. & Bates, D. W. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* **16**, 3365-70 (2005).

12. Clark, M., Johnson,S.L., Lehrach,H., Lee,R., Li,F., Marra,M.,Eddy,S., Hillier,L., Kucaba,T., Martin,J., Beck,C., Wylie,T., Underwood,K., Steptoe,M., Theising,B., Allen,M., Bowers,Y., Person,B., Swaller,T., Gibbons,M., Pape,D., Harvey,N.,Schurk,R., Ritter,E., Kohn,S., Shin,T., Jackson,Y., Cardenas ,M., McCann,R., Waterston,R., Wilson,R. WashU Zebrafish EST Project 1998. *unpublished* (1998).

13. Clewell, D. B. & Helinski, D. R. Supercoiled circular DNA-protein complex in Escherichia coli: purification and induced conversion to an opern circular DNA form. *Proc Natl Acad Sci U S A* **62**, 1159-66 (1969).

14. Corbit, K. C. et al. Vertebrate Smoothened functions at the primary cilium. *Nature* **437**, 1018-21 (2005).

15. de Souza, A. J., Oriss, T. B., O'Malley K, J., Ray, A. & Kane, L. P. T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17113-8 (2005).

16. Du, Z. et al. Mechanosensory function of microvilli of the kidney proximal tubule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13068-73 (2004).

17. Farr, G. H., 3rd et al. Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in Xenopus axis specification. *J Cell Biol* **148**, 691-702 (2000).

18. Feigelstock, D., Thompson, P., Mattoo, P., Zhang, Y. & Kaplan, G. G. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol* **72**, 6621-8 (1998).

19. Fischer, E. et al. Defective planar cell polarity in polycystic kidney disease. *Nat Genet* **38**, 21-3 (2006).

20. Germino, G. G. Linking cilia to Wnts. *Nat Genet* **37**, 455-7 (2005).

21. Graves, P. E., Siroux, V., Guerra, S., Klimecki, W. T. & Martinez, F. D. Association of atopy and eczema with polymorphisms in T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-IL-2-inducible T-cell kinase gene cluster in chromosome 5 q 33. *J Allergy Clin Immunol* **116**, 650-6 (2005).

22. Guay-Woodford, L. M. Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F1034-49 (2003).

23. Han, W. K. et al. Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1126-34 (2005).

24. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. & Bonventre, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* **62**, 237-44 (2002).

25. Han, W. K. & Bonventre, J. V. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* **10**, 476-82 (2004).

26. Hou, X. et al. Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* **109**, 533-40 (2002).

27. Huber, T. B. et al. The carboxyl terminus of Neph family members binds to the PDZ domain protein zonula occludens-1. *J Biol Chem* **278**, 13417-21 (2003).

28. Ibanez-Tallon, I., Heintz, N. & Omran, H. To beat or not to beat: roles of cilia in development and disease. *Hum Mol Genet* **12 Spec No 1**, R27-35 (2003).

29. Ichimura, T. et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* **273**, 4135-42 (1998).

30. Ichimura, T., Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L. & Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F552-63 (2004).

31. Igarashi, P. & Somlo, S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2384-98 (2002).

32. Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. *Immunologie* (ed. GmbH, Spektrum Akademischer Verlag) (Berlin, 2002).

33. Kaplan, G. et al. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *Embo J* **15**, 4282-96 (1996).

34. Khademi, M. et al. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* **172**, 7169-76 (2004).

35. Kim, E. et al. The polycystic kidney disease 1 gene product modulates Wnt signaling. *J Biol Chem* **274**, 4947-53 (1999).

36. Kreidberg, J. A. Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 548-53 (2000).

37. Kreidberg, J. A. & Symons, J. M. Integrins in kidney development, function, and disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F233-42 (2000).

38. Kuchroo, V. K., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Freeman, G. J. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 454-62 (2003).

39. Kuehn, E. W. The TIM family protein Kim1 is a signaling protein in the primary cilium of tubular epithel cells. *persönliche Mitteilung* (2005).

40. Kuehn, E. W., Park, K. M., Somlo, S. & Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1 expression in murine polycystic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* **283**, F1326-36 (2002).

41. Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. & Moon, R. T. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-83 (2000).

42. Kumanogoh, A. et al. Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2. *Nature* **419**, 629-33 (2002).

43. Li, L. et al. Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF-1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells. *J Biol Chem* **274**, 129-34 (1999).

44. Lin, F. et al. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5286-91 (2003).

45. Lina, F. & Satlinb, L. M. Polycystic kidney disease: the cilium as a common pathway in cystogenesis. *Curr Opin Pediatr* **16**, 171-6 (2004).

46. Liu, W. et al. Mechanoregulation of intracellular Ca2+ concentration is attenuated in collecting duct of monocilium-impaired orpk mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F978-88 (2005).

47. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 781-810 (2004).

48. Lyons, J. P. et al. Wnt-4 activates the canonical beta-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/beta-catenin activity in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* **298**, 369-87 (2004).

49. Mariat, C. et al. Regulation of T cell dependent immune responses by TIM family members. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360**, 1681-5 (2005).

50. McIntire, J. J., Umetsu, D. T. & DeKruyff, R. H. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin Immunopathol* **25**, 335-48 (2004).

51. McIntire, J. J. et al. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol* **2**, 1109-16 (2001).

52. McManus, M. T. & Sharp, P. A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet* **3**, 737-47 (2002).

53. Meyers, J. H. et al. TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* **6**, 455-64 (2005).

54. Monney, L. et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536-41 (2002).

55. Nagai, T. et al. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* **20**, 87-90 (2002).

56. Nauli, S. M. et al. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* **33**, 129-37 (2003).

57. Nelson, W. J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-7 (2004).

58. Nusse, R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* **15**, 28-32 (2005).

59. Ong, A. C. & Wheatley, D. N. Polycystic kidney disease--the ciliary connection. *Lancet* **361**, 774-6 (2003).

60. Otto, E. A. et al. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* **34**, 413-20 (2003).

61. Ou, G., Blacque, O. E., Snow, J. J., Leroux, M. R. & Scholey, J. M. Functional coordination of intraflagellar transport motors. *Nature* **436**, 583-7 (2005).

62. Pazour, G. J. Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2528-36 (2004).

63. Pazour, G. J. et al. The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J Cell Biol* **157**, 103-13 (2002).

64. Povelones, M. & Nusse, R. Wnt signalling sees spots. *Nat Cell Biol* **4**, E249-50 (2002).

65. Praetorius, H. A. & Spring, K. R. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* **184**, 71-9 (2001).

66. Praetorius, H. A. & Spring, K. R. Removal of the MDCK cell primary cilium abolishes flow sensing. *J Membr Biol* **191**, 69-76 (2003).

67. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843-50 (2005).

68. Rosenbaum, J. L. & Witman, G. B. Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 813-25 (2002).

69. Sanchez-Fueyo, A. et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol* **4**, 1093-101 (2003).

70. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7 (1977).

71. Scholey, J. M. Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 423-43 (2003).

72. Shakhov, A. N. et al. SMUCKLER/TIM4 is a distinct member of TIM family expressed by stromal cells of secondary lymphoid tissues and associated with lymphotoxin signaling. *Eur J Immunol* **34**, 494-503 (2004).

73. Sharp, P. A. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev* **13**, 139-41 (1999).

74. Sheridan, A. M. & Bonventre, J. V. Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **9**, 427-34 (2000).

75. Simons, K. & Gruenberg, J. Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol* **10**, 459-62 (2000).

76. Simons, M. et al. Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet* **37**, 537-43 (2005).

77. Simons, M., Kramer, E. M., Thiele, C., Stoffel, W. & Trotter, J. Assembly of myelin by association of proteolipid protein with cholesterol- and galactosylceramide-rich membrane domains. *J Cell Biol* **151**, 143-54 (2000).

78. Taulman, P. D., Haycraft, C. J., Balkovetz, D. F. & Yoder, B. K. Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* **12**, 589-99 (2001).

79. Umetsu, D. T. & Dekruyff, R. H. Regulation of tolerance in the respiratory tract: TIM-1, hygiene, and the environment. *Ann N Y Acad Sci* **1029**, 88-93 (2004).

80. Umetsu, D. T., McIntire, J. J. & DeKruyff, R. H. TIM-1, hepatitis A virus and the hygiene theory of atopy: association of TIM-1 with atopy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **40 Suppl 1**, S43 (2005).

81. Umetsu, S. E. et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nat Immunol* **6**, 447-54 (2005).

82. Veeman, M. T., Axelrod, J. D. & Moon, R. T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* **5**, 367-77 (2003).

83. Watnick, T. & Germino, G. From cilia to cyst. *Nat Genet* **34**, 355-6 (2003).

84. Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C. & Bonventre, J. V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* **93**, 2175-88 (1994).

85. Wiznerowicz, M. & Trono, D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* **77**, 8957-61 (2003).

86. Wodarz, A. & Nusse, R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 59-88 (1998).

87. Yoder, B. K., Hou, X. & Guay-Woodford, L. M. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* **13**, 2508-16 (2002).

88. Zhu, C. et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* **6**, 1245-52 (2005).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Struktur der Tim-Familie bei Maus und Mensch…… 5

Abbildung 2: Eine Ischämie resultiert in reversiblen und irreversiblen Schädigungen des proximalen Tubulusepithels. 6

Abbildung 3: Intrazelluläre Region von humanem und murinem Kim-1 und Tim-3. .. 9

Abbildung 4: Darstellung des Wnt/β-Catenin Signalweges: 11

Abbildung 5: Inversin, ein Schaltermolekül zwischen dem kanonischen und non-kanonischen Wnt Signalweg. 12

Abbildung 6: Wirkmechanismus der *plvth* Kim-1 Konstrukte. 29

Abbildung 7: Lokalisation von Kim-1 im primären Zilium und der apikalen Membran in einem distalen Tubulus in der Maus. 31

Abbildung 8: Kim-1 ist hoch exprimiert in undifferenzierten IMCD Zellen. 32

Abbildung 9: Kim-1 antagonisiert die Dvl vermittelte TOP FLASH Aktivität. 34

Abbildung 10: Kim1 reduziert den zytosolischen ß-Catenin Gehalt. 34

Abbildung 11: Kim-1 aktiviert den AP-1 vermittelten Signaltransduktionsweg. 35

Abbildung 12: *Kim-1* Knock-down. 36

Abbildung 13: IMCD-Zellen mit murinem *mKim-i-1 plvth* stabil transduziert. 38

Abbildung 14: IMCD-Zellen mit dem Kontroll Konstrukt *mKim-i-2 plvth* stabil transduziert. 39

Abbildung 15: MDCK-Zellen mit dem caninen Knock-down Konstrukt dkim-i-1 *plvth* stabil transduziert. 40

Abbildung 16: MDCK-Zellen stabil mit dem Leervirus *plvth* transduziert. 41

Abbildung 17: IMCD-Zellen mit murinem *mKim-i-1 plvth* stabil transduziert. 43

Abbildung 18: IMCD-Zellen mit dem murinem Kontrollkonstrukt *mKim-i-2 plvth* stabil transduziert. 44

Abbildung 19: MDCK-Zellen mit dem caninen Knock-down Konstrukt dkim-i-1 *plvth* stabil transduziert. 45

Abbildung 20: MDCK-Zellen mit dem Leervirus *plvth* stabil transduziert. 46

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADPKD	*Autosomal Dominante Polycystische Nierenerkrankung*
AHR	engl.: *airway hypersensitivity reaction*
AK	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAM	engl.: *cell adhesion molecule*
CD	engl.: *cluster of Differentiation*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DNA	Desoxyribonukleinsäure
CPK	engl.: *congenital polycystic kidney*
Dvl	engl.: *Dishevelled*
EAE	experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
ECL	engl.: *enhanced chemiluminescence*
E-Coli	*Escherichia Coli*
EDTA	Ethylamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
GBP	GSK3 Bindeprotein
GFP	engl.: *green fluorescence protein*
HAVCR	engl.: *Hepatitis A virus cellular receptor*
Hepes	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HEK 293t	engl.: *human embryonic kidney* Zellen + SV40 Large-T-Antigene
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN	Interferon
IFT	Intraflagellarer Transport
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin Superfamilie

IL	Interleukin
IMCD	engl.: *Inner medullary collecting duct*, Maus-Zellen
ITK	engl.: *inducted T-cell Kinase*
Jak	Januskinase
JNK	c-jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
Kim	engl.: *Kidney injury molecule*
LB	engl.: *Luria broth*
MadCAM	engl.: *mucosal adressin cell adhesion molecule*
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDCK	engl.: *Madin Darby Canine Kidney*
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
ORPK	engl.: *oak ridge polycystic kidney*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCP	engl.: *planar cell polarity*
RNA	Ribonukleinsäure
RLU/s	engl.: *relative light units per second*
Rpm	engl.: *rounds per minute*
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfat)
SEM	engl.: *Standard error of the mean* / Standardabweichung vom Mittelwert
SH_2	src Homologie Domäne Typ
SMUCKLER	engl.: *spleen mucin containing knockout of lymphotoxin*
s.u.	siehe unten
Tapr	engl.: *T-cell and airway phenotype regulator*
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
Tim	engl.: *T-cell immunglobulin mucin*
Tris	α,α,α-Tris(hydroxymethyl)methylamine
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus
Wnt	Wingless Proteine
WT	Wildtyp

Formelzeichen und Einheiten

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
h	Stunde
L	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
nm	Nanometer
®	eingetragenes Warenzeichen
sec	Sekunde
V	Volt

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. W. Schmahl danken, der es mir überhaupt erst ermöglichte eine tiermedizinische externe Doktorarbeit in Freiburg anzufertigen.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. W. Kühn für seine engagierte Betreuung und jederzeit gewährte Unterstützung. Seine Begeisterung für die Arbeit und seine vielen guten Ratschläge waren mir insbesondere in schwierigen Zeiten eine große Hilfe und Ermutigung.

Herrn Prof. Dr. G. Walz danke ich besonders, dass ich in seinem sehr gut ausgestatteten Labor meine Doktorarbeit durchführen durfte.

Ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter des „Walz-Lab“ für die vielen kleinen Ratschläge, Hilfen und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt Birgit Rimili, die tapfer bei jeder Fragestellung hilfsbereit zur Seite stand. Meinen Mitdoktoranden Michael Mühlfeit und Anne John verdanke ich eine schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Frau Dr. Birgit Stierstorfer (früher München, jetzt Boehringer Ingelheim) danke ich für die aufmerksame Durchsicht des Manuskriptes und ihre andauernde Bereitschaft für mich da zu sein.

Meiner Mutter danke ich ganz herzlich für ihre großartige Unterstützung in allen Phasen meines Lebens und die immerwährende Aufmunterung in schwierigen Zeiten.

Lebenslauf

Name: Petra Mühlenhardt

Geburtsdatum: 9.12.1971, München

Schule:

1977-1981	Grundschule Ingolstadt
1981-1991	Gymnasium, Freiburg
1991	Abitur in Freiburg

Studium:

1993 (Okt)- 1999 (Okt)	Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg
1999	Diplomarbeit: „In Vivo Ableitungen im Kleinhirn der Ratte“ Abschluß: Diplom-Biologin
1999 (Nov)- 2005 (Jan)	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2005	Abschluß: Tierärztin

Promotion:

2005-2006	Experimentelle Arbeit an der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg, Abteilung Nephrologie Thema: Funktionelle Untersuchungen zur Bedeutung des Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1) bei der Differenzierung der Tubulusepithelzellen von Säugetieren

Tätigkeiten:

1991-1992	Freiwilliges Soziales Jahr, Uni-Klinik Freiburg
1997-1999	Hilfswissenschaftlerin am MPI für Immunbiologie, Freiburg
2000-2004	Hilfswissenschaftlerin am Lehrstuhl für Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät München