

Aus dem Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin
der Universität zu Köln

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Untersuchungen zur molekularen Pathogenese von zwei genetisch bedingten Nierenerkrankungen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Alina Braun
aus Münster

promoviert am 05. September 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Professor Dr. med. M. C. Liebau
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. B. B. Beck

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau
Frau Dr. Claudia Dafinger
Proteomics Facility des CECAD Cologne
Frau Dr. Katrin Bohl

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Claudia Dafinger und Herrn Prof. Dr. Max C. Liebau von mir selbst ausgeführt worden. Bei der Vorbereitung der Proben für die Massenspektrometrie wurde ich von der medizinisch-technischen Assistentin Frau Ruth Herzog unterstützt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Boston, den 16.03.2024

Unterschrift:

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mir geholfen haben, meine experimentelle Doktorarbeit im Nephrolab Cologne zu absolvieren.

Zunächst richte ich meinen aufrichtigen Dank an Herrn Prof. Dr. Bernhard Schermer, den Leiter dieses herausragenden Labors. Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. Jörg Dötsch und Herrn Prof. Dr. Thomas Benzing für die Gelegenheit, für den Zeitraum meiner Doktorarbeit Teil ihrer Teams sein zu dürfen.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Max Liebau, der mir den Weg geebnet und meine Arbeit von Anfang bis Ende begleitet hat. Seine unermüdliche Unterstützung, wissenschaftliche Expertise und konstruktive Kritik haben mir geholfen, meine Fähigkeiten weiterzuentwickeln und mich zu einer besseren Forscherin und Ärztin gemacht. Genauso hervorheben möchte ich meine aufrichtige Dankbarkeit gegenüber meiner Betreuerin, Frau Dr. Claudia Dafinger. Ihre herausragende fachliche Kompetenz und ihre engagierte Anleitung haben maßgeblich zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen. Durch ihre klugen Ratschläge, ihre Hilfsbereitschaft und ihre aufmerksame Betreuung habe ich mich stets ermutigt und unterstützt gefühlt.

Ich möchte auch dem gesamten Labor-Team danken, insbesondere dem medizinisch-technischen Personal, einschließlich Frau Stefanie Keller, Frau Martyna Brütting und Frau Ruth Herzog. Ihre Geduld und ihre Bereitschaft, ihr Wissen mit mir zu teilen, haben mir geholfen, die komplexen Experimente erfolgreich durchzuführen. Ein besonderer Dank gilt meinen Kolleginnen und Kollegen, die während meiner Arbeit Teil des Teams waren. Es war eine Freude, mit ihnen zusammenzuarbeiten.

Ich möchte mich zudem bei meiner Familie und meinen Freundinnen bedanken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben. Auch meinem Partner möchte ich von ganzem Herzen meine Dankbarkeit aussprechen. Seine bedingungslose Unterstützung, seine Liebe und sein Glaube an mich haben mir unermessliche Kraft gegeben.

Schließlich möchte ich mich bei allen anderen bedanken, die an meiner Forschung beteiligt waren. Insgesamt war meine Erfahrung im Nephrolab Cologne eine erstaunliche Reise, die mir die Möglichkeit gab, tief in die Welt der Nierenforschung einzutauchen. Ich bin dankbar für all die Unterstützung und Hilfe, die ich auf dem Weg erhalten habe, und freue mich, meine Ergebnisse mit der wissenschaftlichen Gemeinschaft zu teilen. Ich hoffe, dass meine Arbeit zum Verständnis genetisch bedingter Nierenerkrankungen und zur Entwicklung effektiver Behandlungsmöglichkeiten beitragen wird.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1 Die funktionelle Bedeutung von FC und DZIP1L im SRC-STAT3-Signalweg für die molekulare Pathogenese der ARPKD	12
2.1.1. Das Krankheitsbild der ARPKD	12
2.1.2. Genetik und Funktionen der mit ARPKD assoziierten Proteine FC und DZIP1L	13
2.1.3. Die Rolle des STAT3-Signalwegs bei der Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen	15
2.1.4. Die Rolle des STAT3-Signalwegs bei der Pathogenese der ARPKD	16
2.2 Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD	18
2.2.1. Das Krankheitsbild der ADKH-RRAGD	18
2.2.2. Die Regulation des mTor-Signalwegs als pathogenetische Grundlage	18
2.3 Zielsetzung der Arbeit	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1 Material	21
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	21
3.1.2. Puffer und Lösungen	24
3.1.3. Assays und Kits	27
3.1.4. Verbrauchsmaterial	27
3.1.5. Geräte	29
3.1.6. Antikörper	31
3.1.7. Plasmide	32
3.1.8. Oligonukleotide/ Primer	33
3.1.9. Software	34
3.2 Methoden	35
3.2.1. Zellkultur	35
3.2.2. Transfektion	35
3.2.3. Ernte und Lyse von Zellen	36
3.2.4. Immunopräzipitation	37
3.2.5. Koimmunopräzipitation für Massenspektrometrie	37

3.2.6.	SDS-PAGE und Western Blot	38
3.2.7.	Immunfluoreszenzfärbung	39
3.2.8.	Luciferase Assay	40
3.2.9.	Generierung einer Flp-In Zelllinie	40
3.2.10.	Klonierungen und Plasmide	41
4.	ERGEBNISSE	46
4.1	Funktion von FC im SRC-STAT3-Signalweg bei der molekularen Pathogenese der ARPKD	46
4.1.1.	SRC phosphoryliert FC ³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992	46
4.2	Funktion von DZIP1L im SRC-STAT3-Signalweg bei der molekularen Pathogenese der ARPKD	48
4.2.1.	STAT3 und SRC kopräzipitieren mit DZIP1L	48
4.2.2.	SRC Expression oder mFC ³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ Expression vermindern die DZIP1L Expression- dabei zeigt sich ein additiver Effekt	49
4.3	Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD	51
4.3.1.	Erstellung stabiler IMCD Flp-In Zelllinien mit Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP	51
4.3.2.	Kolokalisation von mRragd WT und mRragd S75L mit mTor und phospho-mTor in IMCD Flp-In Zelllinien	54
4.3.3.	mRragd S75L zeigt eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie Komponenten der V-ATPase und von Ragulator	56
5.	DISKUSSION	61
5.1	Die Rolle von FC bei der Pathogenese der ARPKD	61
5.1.1.	SRC und FC stehen über die Phosphorylierung an Tyrosin 3992 in direkter Interaktion	61
5.2	Die Rolle von DZIP1L bei der Pathogenese der ARPKD	66
5.2.1.	DZIP1L interagiert mit Komponenten des STAT3-Signalwegs	66
5.3	Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD	70
5.3.1.	Die IMCD Flp-In Zelllinien exprimieren GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP	70
5.3.2.	Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen eine Kolokalisation von mRragd WT und mRragd S75L mit mTor und phospho-mTor	71
5.3.3.	MRragd S75L zeigt eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie von Komponenten der V-ATPase und von Ragulator	72

6.	LITERATURVERZEICHNIS	79
7.	ANHANG	88
7.1	Abbildungsverzeichnis	88
7.2	Tabellenverzeichnis	88
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	89

Abkürzungsverzeichnis

ADAM12	ADAM metallopeptidase domain 12
ADKH-RRAGD	Autosomal dominant kidney hypomagnesemia
ADP	Adenosindiphosphat
ADPKD	Autosomal dominant polycystic kidney disease
ARPKD	Autosomal recessive polycystic kidney disease
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
β-Tub	β-Tubulin
cAMP	cyclic adenosine monophosphate, zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
cFC	zytoplasmatischer C-terminaler Teil von Fibrozystin
C-Terminus	Carboxyterminus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCM	dilated cardiomyopathy, dilatative Kardiomyopathie
DCT	distal convoluted tubule, pars convoluta des distalen Tubulus
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
ddNTP	Dideoxy-Nukleotid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPM	ductal plate malformation
DTT	Dithiothreitol
DZIP1L	Daz-interacting protein 1-like
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
F9	pcDNA6.F9, pcDNA6 Expressionsvektor mit Flag- und His-Tag
FBS	fetales bovines Serum
FC	Fibrozystin (/Polyductin)
Flp	Flippase
FRT	Flippase recombinase target
GFP	Green fluorescent protein
GO	Gene Ontology
GOI	Gene of interest
GTP	Guanosintriphosphat

GTPase	Guanosintriphosphatase
h	human
HEBS	Hepes buffered saline
HEK	Human embryonic kidney
IMCD	Inner medullary collecting duct, inneres medulläres Sammelrohr
IP	Immunopräzipitation
JAK	Janus kinase
k.A.	keine Angabe
KD	kinase dead, ohne Kinasefunktion
L, Leu	Leucin
m	murine
mFC	membrangebundener C-terminaler Teil von Fibrozystin
min	Minute(n)
MiT-TFE	Microphthalmia family of transcription factors
MKS	Meckel Syndrom
mTor	mammalian/ mechanistic target of rapamycin
mTorC1	mammalian/ mechanistic target of rapamycin complex 1
mTorC2	mammalian/ mechanistic target of rapamycin complex 2
n	Größe der Stichprobe
NDS	normal donkey serum
NPHP	Nephronophthisis protein
N-Terminus	Amino Terminus
p	phosphoryliert
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered saline
PC1	Polyzystin 1
PC2	Polyzystin 2
PC1-p30	Polycystin 1 cytoplasmatic tail (Polyzystin 1 Fragment von ~30 kDa)
PCR	Polymerase chain reaction
Phospho	phosphoryliert
PIM	Protease Inhibitor Mix
PKD	Polycystic kidney disease
PKD 1	Polycystic kidney disease 1
PKD 2	Polycystic kidney disease 2
PKHD1	Polycystic kidney and hepatic disease 1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RACK1	Receptor for activated C-kinase 1

RagA	Rag GTPase A
RagB	Rag GTPase B
RagC	Rag GTPase C
RagD	Rag GTPase D
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RNA	Ribunucleic acid
RRAGA	Ras-related GTP-binding A
RRAGC	Ras-related GTP-binding C
RRAGD	Ras-related GTP-binding D
RagD S75L	Ras-related GTP-binding D Serine 75 Leucine
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde(n)
S6K1	S6 Kinase 1
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEPT2	Septin 2
Ser	Serin
SH2	Src Homology 2
SH3	Src Homology 3
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SRC	Sarcoma (tyrosine kinase)
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	thick ascending limb, dicker aufsteigender Teil der Henle Schleife
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TFEB	Transkriptionsfaktor EB
TFE3	Transkriptionsfaktor E3
TRPM6	transient receptor potential cation channel subfamily M member 6
U	Unit
V-ATPase	Vacuolar H ⁺ -Adenosintriphosphatase
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1. Zusammenfassung

Genetisch bedingte Nierenerkrankungen zählen bei Kindern und Jugendlichen zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenfunktionsstörung ¹⁻³.

Bei der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) handelt es sich um eines der schwerwiegendsten nephrologischen Krankheitsbilder der Pädiatrie. Ursächlich sind in den meisten Fällen Varianten des für Fibrozystin (FC) kodierenden Gens *PKHD1* ⁴. Mit dem für Daz-interacting protein 1-like (DZIP1L) kodierenden Gen *DZIP1L* wurde 2017 ein zweites krankheitsverursachendes Gen publiziert ⁵. Klinisch ist die klassische Form der ARPKD durch einen fulminanten Verlauf mit massiv vergrößerten Nieren und eine meist bereits intrauterin beginnende Zystenbildung gekennzeichnet ⁶. Der Pathomechanismus der ARPKD ist bislang unzureichend verstanden. Sowohl FC als auch DZIP1L werden wesentliche Funktionen innerhalb des primären Ziliums zugeschrieben ^{5 7}. Aus Vorarbeiten unseres Labors ergab sich die Hypothese, dass dem SRC-STAT3-Signalweg eine zentrale Bedeutung bei der molekularen Pathogenese der ARPKD zukommt ⁸. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Tyrosin 3992 von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ als Ziel einer Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase SRC identifiziert. DZIP1L zeigte eine Koimmunopräzipitation von STAT3 und SRC. Zudem wurde eine Verminderung der DZIP1L Expression bei Koexpression von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ oder SRC nachgewiesen. Gleichzeitige Expression resultierte in einem additiven Effekt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass FC und DZIP1L mit Komponenten des SRC-STAT3-Signalwegs interagieren und bei der Pathogenese der ARPKD möglicherweise eine Verschiebung des quantitativen Gleichgewichts der beteiligten Proteine von Bedeutung ist.

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich der Untersuchung der Rag GTPase D (RagD). Varianten des kodierenden Gens *RRAGD* wurden als Ursache der autosomal dominant kidney hypomagnesemia-RRAGD (ADKH-RRAGD) identifiziert. Am häufigsten wurde hierbei die Variante RagD Serin 76 Leucin (*RRAGD S76L*) nachgewiesen. Das klinische Erscheinungsbild kennzeichnet sich durch eine schwere renale Tubulopathie in Kombination mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) ⁹. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei stabile Flp-In Sammelrohrepithelzelllinien mit Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP generiert. In Immunfluoreszenzfärbungen war eine Kolo-kalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L mit mTor sowie phospho-mTor nachweisbar. In einem massenspektrometrischen Verfahren zeigte GFP.mRragd S75L nach Präzipitation über einen Anti-GFP Antikörper eine im Vergleich zu GFP.mRragd WT signifikant erhöhte Kopräzipitation von Raptor sowie von Komponenten der V-ATPase und von Ragulator als Komponenten des mTor-Signalwegs. Die Ergebnisse weisen auf mutationsbedingte Veränderungen der Interaktionspartner von Rragd S75L im Vergleich zu Rragd WT hin und unterstreichen die zentrale Rolle der Rag GTPase D als Teil des mTor-Signalwegs.

2. Einleitung

2.1 Die funktionelle Bedeutung von FC und DZIP1L im SRC-STAT3-Signalweg für die molekulare Pathogenese der ARPKD

Bestehend aus über 20 spezialisierten Zelltypen¹⁰ stellt die Niere mit ihrer differenzierten Funktionsweise eines der faszinierendsten Organe des menschlichen Körpers dar. In ihrer Physiologie ist die Niere hoch komplex, in ihrer Leistung beeindruckend anpassungsfähig: durch Sekretion und Resorption, Hormonproduktion und Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts dient die Niere der Homöostase des Organismus. Makroskopisch lässt sich das paarig angelegte Organ in das Parenchym, bestehend aus Nierenrinde und Nierenmark, und das Nierenbeckenkelchsystem einteilen. Das Nephron bildet die kleinste funktionelle Einheit der Niere. Es umfasst das Nierenkörperchen mit Glomerulus und dazugehörigem Tubulussystem. Teile der renalen Funktionsweise auf molekularer Ebene sind bis heute unverstanden. Unumstritten ist dagegen die lebenswichtige Bedeutung des Organs. Dies verdeutlichen die weitreichenden Auswirkungen auf den gesamten Organismus bei graduelltem Verlust der Nierenfunktion, wie es bei der chronischen Nierenerkrankung der Fall ist¹¹.

Die chronische Nierenerkrankung stellt ein wachsendes Gesundheitsproblem dar, von dem weltweit schätzungsweise über 800 Millionen Menschen betroffen sind¹². Bei Kindern und Jugendlichen zählen genetisch bedingte Nierenerkrankungen zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung¹⁻³. Genetisch bedingte Nierenerkrankungen umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, charakterisiert durch genetische Varianten, die Funktion und Struktur der Niere beeinträchtigen^{13,14}. Die unterschiedlichen Phänotypen lassen sich im Allgemeinen einteilen in kongenitale Anomalien der Nieren und Harnwege, Ziliopathien, Glomerulopathien, Nierensteinerkrankungen, tubulointerstitielle Nierenerkrankungen und Tubulopathien. Viele dieser pathologischen Zustände führen potenziell zu einem Nierenversagen^{13,15}.

2.1.1. Das Krankheitsbild der ARPKD

Bei der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) handelt es sich um eines der schwerwiegendsten nephrologischen Krankheitsbilder der Pädiatrie. Mit einer Inzidenz von 1:20.000 gilt sie als seltene Erkrankung¹⁶. Dennoch zählen polyzystische Nierenerkrankungen zu den häufigsten monogenetischen Ursachen terminalen Nierenversagens bei Kindern und Erwachsenen⁶. Ätiologisch liegen der ARPKD nach aktuellem Kenntnisstand in den allermeisten Fällen pathophysiologisch relevante Varianten des für Fibrozystin (FC) kodierenden Gens *Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1 (PKHD1)* zu Grunde^{4 17}. Im Jahr 2017 wurde *DZIP1L*, kodierend für das gleichnamige Protein DAZ Interacting Zinc Finger Protein 1 Like (DZIP1L), von Lu et al. als zweites

krankheitsverursachendes Gen publiziert ⁵. Als polyzystische Nierenerkrankung konnte die ARPKD den Ziliopathien zugeordnet werden. Die Gemeinsamkeit dieser Erkrankungsgruppe liegt in der Beeinträchtigung der Zilienfunktion bei Dysfunktion der betroffenen Proteine. Diese lokalisieren häufig innerhalb der primären Zilien oder an ihrer Basis ¹⁸. Bei primären Zilien handelt es sich um mikrotubulusbasierte Membranausstülpungen an der Oberfläche nahezu aller sich derzeit nicht in Teilung befindenden Zellen. Ihnen werden neben Chemo- und Mechanosensation wichtige Funktionen in der Regulation des Zellzyklus und der Polarität sowie weiterer elementarer Signalkaskaden zugeschrieben ¹⁹.

Ein fulminanter klinischer Verlauf ist typisch für die klassische Form der ARPKD, wenn auch in den vergangenen Jahren deutlich wurde, dass weniger schwerwiegende Verläufe häufiger sind als lange Zeit vermutet ²⁰. Die Zystenbildung beginnt bei der ARPKD meist intrauterin und bilateral ⁶. Dabei gehen die Zysten als flüssigkeitsgefüllte Hohlräume vom Sammelrohr aus ⁶ und führen zur Abnahme der Nierenfunktion. Durch die bereits intrauterin auftretende Nierenfunktionsstörung besteht das Risiko eines Oligohydramnions, welches in einer pulmonalen Hypoplasie resultieren kann. Viele Patienten zeigen direkt postpartal eine mit erhöhter Mortalität einhergehende respiratorische Insuffizienz ²¹. Als hepatorenale fibrozystische Nierenerkrankung ist die ARPKD durch hepatobiliäre Beteiligung gekennzeichnet. Die mit der kongenitalen hepatischen Fibrose einhergehende portale Hypertension stellt eine der extrarenalen Manifestationen dar. Bei Gallengangsdilatation kommt es nicht selten zu einer Cholangitis. Die weitere Entwicklung der betroffenen Kinder ist durch eine Gedeihstörung deutlich beeinträchtigt ²².

Bislang existiert für die ARPKD keine kurative Therapie. Die Empfehlungen bezüglich der üblicherweise durchgeführten symptomatischen Behandlung beruhen auf Expertenmeinungen ²². Die zur autosomal dominanten polyzystischen Nierenerkrankung (ADPKD) durchgeführten pharmakologischen Studien lassen sich nicht direkt auf die Therapie der ARPKD übertragen. Bei der Entscheidungsfindung entstehen vielschichtige ethische Fragestellungen, beispielsweise bezüglich der Indikationsstellung zu einer Dialysetherapie bei sehr schwer betroffenen Patienten. Diese Überlegungen bedürfen einer umfassenden interdisziplinären Beteiligung ^{22 23 24}.

2.1.2. Genetik und Funktionen der mit ARPKD assoziierten Proteine FC und DZIP1L

Durch die Identifikation als Ziliopathien gelang ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen polyzystischer Nierenerkrankungen. Die mit polyzystischen Nierenerkrankungen assoziierten Proteine konnten als Bestandteile multimerischer Komplexe innerhalb primärer Zilien identifiziert werden ^{25 26 19}. Die gezielte Deaktivierung essentieller ziliärer Gene führte im Tiermodell zu einem renalen zystischen Phänotyp ²⁷. Somit rückte die

Dysfunktionalität primärer Zilien als möglicher Ursprung zystischer Nierenerkrankungen in den Fokus. Es gelang die Identifikation verschiedenster ziliärer Funktionen sowie assoziierter Signalwege. Das ziliäre Axonem ist über das Basalkörperchen in der Zelle verankert und wird nach außen von der ziliären Membran umgeben, an der verschiedene Proteinkomplexe zu finden sind. Zwischen Basalkörperchen und Axonem befindet sich die ziliäre Transitionszone, welche eine wichtige Diffusionsbarriere für den selektiven Proteintransport zwischen Zilium und dem übrigen intrazellulären Raum darstellt ^{28 29 7}.

Das FC kodierende Gen *PKHD1* ⁴ zählt mit einem full length Transkript von 67 Exons, kodierend für 4074 Aminosäuren, zu den längsten krankheitsverursachenden Genen des menschlichen Genoms ³⁰. *PKHD1* wird hauptsächlich zelltypspezifisch in der Niere, Leber, Lunge und im Pankreas exprimiert ^{4 17 31}. In der Niere wurde eine Expression insbesondere im Sammelrohr und im dicken aufsteigenden Teil der Henle Schleife nachgewiesen ^{31 32 33}. In renalen Tubuluszellen und biliären Epithelzellen lokalisiert FC unter anderem an der apikalen Membran sowie am primären Zilium ^{34 32 33 35}.

In Zusammenschau der funktionellen Domänen, der Lokalisation sowie der transmembranären Eigenschaften könnte FC als membrangebundener Rezeptor wirken ^{17 36}. Daneben sind die Regulation von Zell-Zell-Kontakten, den sogenannten Adhäsionen, und die Proliferation, passend zur ARPKD typischen Histologie, als mögliche Einflussbereiche in Betracht zu ziehen ¹⁷. FC beinhaltet neben einer hochglykolisierten extrazellulären Domäne und dem transmembranären Segment einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt ³⁰. Dieser aus circa 190 Aminosäuren bestehende C-terminale Teil enthält potenzielle Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A ³⁷ sowie ein ziliäres und ein nukleäres Lokalisationssignal ^{36 38 39}. Die Funktion von FC ist bislang nicht vollständig verstanden.

Als DAZ-interacting protein 1-like (*DZIP1L*) kodierendes Gen konnte *DZIP1L* über die Entdeckung in Patienten mit moderatem klinischem Verlauf in Zusammenhang mit der ARPKD gebracht werden. Studien im Maus- und Zebrafischmodell sowie in der Zellkultur bestätigten die Bedeutung von *DZIP1L* für ziliären Transport und renale Zystogenese. Bei *DZIP1L* handelt es sich um ein aus 767 Aminosäuren bestehendes Protein, welches an den Zentriolen beziehungsweise am distalen Ende der Basalkörperchen lokalisiert ist. Funktionell wurde eine Interaktion mit dem an der Aufrechterhaltung der periziliären Diffusionsbarriere beteiligten Protein Septin 2 (*SEPT2*) nachgewiesen. Einvernehmlich mit dieser Erkenntnis wurde eine Beeinträchtigung der membranären Translokation der PKD Proteine Polyzystin 1 (*PC1*) und Polyzystin 2 (*PC2*) in *DZIP1L* mutierten Zellen beschrieben ⁵. Mit der Bedeutung von *DZIP1L* für die Aufrechterhaltung der Transitionszonenintegrität und dem aus Varianten resultierenden

polyzystischen Phänotyp hebt die Arbeit von Lu et al.⁵ die Relevanz der ziliären Transitionszone für die Pathogenese der ARPKD hervor.

2.1.3. Die Rolle des STAT3-Signalwegs bei der Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen

Bei Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor der STAT Proteinfamilie, welche sieben Mitglieder umfasst⁴⁰. Die Proteine der STAT Proteinfamilie sind als intrazelluläre Transkriptionsfaktoren maßgeblich an der Regulation zellulärer Immunität, Proliferation und Differenzierung beteiligt. STAT3 vermittelt unter anderem Apoptoseresistenz und *STAT3* gilt somit als Onkogen^{41 42}. In Reaktion auf zelluläre Stimuli wird STAT3 durch Phosphorylierung des Tyrosinrests 705 innerhalb der Aktivierungsdomäne aktiviert. Bei den zellulären Stimuli handelt es sich um Wachstumsfaktoren oder aktivierte Zytokine wie die Interleukin-6 Familie⁴³. Die aktivierende Phosphorylierung von STAT3 durch Rezeptor assoziierte Tyrosinkinase der JAK Familie, Rezeptor-Tyrosinkinase oder Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase wie SRC⁴⁴ moduliert die genregulatorische Aktivität von STAT3^{44 43}.

Die Tyrosinkinase SRC ist Teil der SRC Protein Tyrosinkinase Familie, welche neun Nicht-Rezeptor Tyrosinkinase umfasst^{45 46 47}. Ihnen gemeinsam ist die Regulation fundamentaler Prozesse der zellulären Signalgebung wie Zellwachstum, Differenzierung, Migration und Überleben⁴⁸. Dazu verbinden sie von Rezeptoren an der Zelloberfläche detektierte extrazelluläre Signale mit dem zytoplasmatischen Signalregulationsapparat⁴⁵. SRC weist die für die Proteinfamilie typischen Bestandteile einer Amino-terminalen Domäne, einer Src Homology (SH) 2 und SH3 Domäne, einer Tyrosinasedomäne und eines negativ regulatorischen Elements am C-Terminus auf⁴⁸. Verschiedene Wachstumsfaktorrezeptoren binden als Rezeptortyrosinkinase an die SH2 Domäne und ermöglichen über Translokation des negativ regulatorischen Tyrosins 530 die aktivierende Autophosphorylierung von SRC an Tyrosin 419. Nach Dissoziation liegt SRC bedingt durch intramolekulare Interaktion wieder in inaktiver Form vor. Die Aktivierung von SRC bewirkt die Tyrosinphosphorylierung nachgeschalteter Proteine⁴⁹.

Im Falle des Transkriptionsfaktors STAT3 erzeugt SRC dadurch eine Homo- oder Heterodimerisierung des Transkriptionsfaktors, gefolgt von der Translokation zum Zellkern, wo STAT3 die Genexpression über Bindung an spezifische DNA-Sequenzen reguliert^{44 43}. Weitere Funktionen wie Wirkung auf fokale Adhäsionen, Schutz vor Apoptose sowie allgemein Tumorzellinvasion und Metastasierung verdeutlichen die enorme Wichtigkeit der Tyrosinkinaseaktivität von SRC. Mutationen oder Aberrationen innerhalb der beteiligten Signalkaskaden legen einen hyperproliferativen Effekt nahe, weshalb die Betrachtung von SRC als Protoonkogen einleuchtet. Die Fähigkeit von SRC unter anderem über den STAT3-

Signalweg erhöhte Proliferation zu erzeugen ⁴⁸ könnte auch bei der Entstehung polyzystischer Nierenerkrankungen eine Rolle spielen.

Für die ADPKD konnte die Arbeitsgruppe um Thomas Weimbs bereits die ätiologische Bedeutung des STAT3-Signalwegs hervorheben ^{50 51 52}. ADPKD Zystepithelzellen und PKD-Mausmodelle zeigten eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3/ Stat3. Diese wird unter anderem als Resultat Src abhängiger Tyrosinphosphorylierung verstanden ⁵². In ADPKD Zellen konnte eine Überexpression des proteolytischen Polyzystin-1 Fragments PC1-p30 aufgezeigt werden. Dieses interagiert mit SRC und verstärkt eine SRC-vermittelte Aktivierung von STAT3, welche zu einer proliferativen Zellantwort führen könnte. PC1-p30 vereint vermutlich zusätzlich Signale von Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) und zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), wobei cAMP unter dem Einfluss des Vasopressin V2 Rezeptor zu stehen scheint ⁵². Die Vasopressin Signalgebung und die damit einhergehende intrazelluläre Erhöhung von cAMP ist als treibende Kraft des Zystenwachstums bei der ADPKD bekannt ^{53 54}. Eine Abmilderung des polyzystischen Phänotyps durch Vasopressin V2 Rezeptor Antagonisten wurde bereits in verschiedenen Tiermodellen für ADPKD ⁵⁵, ARPKD ⁵⁶ und Nephronophthise ⁵⁷ nachgewiesen ⁵⁴. Diese Erkenntnis führte zur Etablierung des Vasopressin V2 Rezeptor Antagonisten Tolvaptan als wichtige Therapieoption für Patienten mit ADPKD ⁵³.

Initiale Versuche, Stat3 Aktivierung in einem PKD-Mausmodell pharmakologisch zu unterdrücken, zeigten eine Reduktion des renalen Zystenwachstums ⁵⁸. Anhand zweier etablierter ARPKD-Tiermodelle konnte eine Korrelation zwischen Src Aktivierung und Progression des polyzystischen Phänotyps nachgewiesen werden. In beiden Modellen war durch spezifische pharmakologische Inhibition von Src eine Milderung des renalen und biliären Phänotyps zu beobachten ⁵⁹. Auch bei Behandlung mit dem Multikinase-Inhibitor Tesevatinib konnte im Tiermodell eine Verbesserung des zystischen Phänotyps gezeigt werden ⁶⁰. Aus den präklinischen Daten ergaben sich klinische Studien zur Therapie polyzystischer Nierenerkrankungen mit Multikinase-Inhibitoren ⁶¹ (ClinicalTrials.gov: NCT01233869; NCT03096080).

Somit konnte der SRC-STAT3-Signalweg bereits als potenzieller Angriffspunkt einer medikamentösen Therapie polyzystischer Nierenerkrankungen identifiziert werden.

2.1.4. Die Rolle des STAT3-Signalwegs bei der Pathogenese der ARPKD

Der SRC-STAT3-Signalweg konnte in Vorarbeiten unseres Labors in Zusammenhang mit der Pathogenese der ARPKD gebracht werden ⁸. Über einen Yeast two-Hybrid Screen und unabhängige Koimmunopräzipitationsexperimente wurde STAT3 als Komponente des FC-Proteinkomplexes identifiziert. Über die Phosphorylierung an Tyrosin 705 wurde eine STAT3 Aktivierung in Nierenepithelzellen in ARPKD Patientenproben nachgewiesen ⁸. Im

Zusammenhang mit dem STAT3-Signalweg rückte auch die Tyrosinkinase SRC in den Vordergrund. Interessanterweise führte im STAT3 Luciferase Reporterassay die Koexpression des membrangebundenen C-terminalen Teils von Fibrozystin (mFC, FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴) zu einer Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung. Die Verwendung verschiedener SRC Varianten, denen zum Teil die Kinasefunktion fehlte, und Forskolinstimulation führten zu der Erkenntnis, dass FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ höchstwahrscheinlich direkt Einfluss auf die SRC Aktivierung nimmt und dieser nicht nachgeschaltet ist. Weitere Koimmunopräzipitationsexperimente wiesen auf eine Interaktion zwischen SRC und dem zytoplasmatischen Teil von FC (cFC, FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴) hin. In der Western Blot Analyse fiel hierbei eine Doppelbande auf, die sich bei Verwendung von SRC in wildtypischer Form, nicht aber bei Verwendung von SRC ohne Kinasefunktion, zeigte ⁸. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Vermutung der direkten Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ durch SRC, welche durch den Nachweis der Bande bei Anfärbung phosphorylierten Tyrosins (Anti-pY99-Färbung) unterstützt wurde ⁸. Diese Erkenntnisse bieten die Grundlage für die vorliegende Arbeit.

2.2 Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD

Eine Vielzahl von Transportproteinen in renalen Tubulusepithelzellen spielt über Sekretion und Absorption von Flüssigkeit und gelösten Stoffen eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase des gesamten Organismus⁶². Defekte dieser Transportprozesse werden als Tubulopathien klassifiziert. Die Identifikation genetischer Ursachen von Tubulopathien hat zum Verständnis des Elektrolyttransports entlang des Nephrons beigetragen^{9 62 63}. Magnesium ist als zweithäufigstes intrazelluläres Kation, unter anderem als enzymatischer Kofaktor⁶², von hoher Bedeutung für zahlreiche zelluläre Prozesse⁶³. Magnesiumsresorptionsstörungen resultieren in Hypomagnesiämie, welche sich klinisch unter anderem in Form von neuromuskulärer Irritabilität, Krampfereignissen und kardialen Arrhythmien manifestiert⁶³.

2.2.1. Das Krankheitsbild der ADKH-RRAGD

In einer Kohorte von Patienten mit Hypomagnesiämie wurde eine Gruppe von Patienten mit renalem Salzverlust, schwerer Hypomagnesiämie und Nephrokalzinose in Kombination mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) identifiziert⁹. Über Exom- und Genomsequenzierung wurden Varianten in *Ras-related GTP binding D (RRAGD)* in acht nicht verwandten Patienten sowie in acht Mitgliedern einer großen Familie als Ursache des genannten klinischen Erscheinungsbildes identifiziert. Hierbei handelte es sich um zumeist *de novo* auftretende, heterozygote missense Varianten. Die neu identifizierte genetisch bedingte Tubulopathie wurde als autosomal dominant kidney hypomagnesemia-RRAGD (ADKH-RRAGD) klassifiziert⁹.

RRAGD kodiert mit RagD (RRAGD) eine kleine Rag Guanosintriphosphatase (GTPase) der Ras Familie GTP-bindender Proteine^{9 64}. Im Mausmodell zeigte sich eine ubiquitäre Expression mit signifikanten Transkriptionsleveln von *Rragd* im Herzen und in der Niere. Innerhalb der Niere wurde Expression im aufsteigenden Teil der Henle Schleife (TAL, thick ascending limb) sowie in der pars convoluta des distalen Tubulus (DCT, distal convoluted tubule) nachgewiesen⁹.

2.2.2. Die Regulation des mTor-Signalwegs als pathogenetische Grundlage

Die Rag Proteine sind wichtige Regulatoren des mammalian (/mechanistic) target of Rapamycin (mTor)-Signalwegs und beeinflussen somit eine zentrale Komponente der Kontrolle zellulären Wachstums. Dies ist grundlegend für das Wachstum des gesamten Organismus^{65 66 67 68}. Hierbei ermöglicht der mTor-Signalweg über die Vermittlung bedeutender Umgebungssignale wie Wachstumsfaktoren, dem zellulären Energie-/Oxygenierungsstatus und der Verfügbarkeit von Aminosäuren die zelluläre Anpassung an variable Umwelteinflüsse⁶⁵.

Die evolutionär konservierte Serin/ Threonin Proteinkinase mTor gehört zur „Phosphatidylinositol kinase related kinase family“⁶⁸. Mit mTorC1 und mTorC2 existiert sie in Form zweier Komplexe mit biochemischen und funktionellen Unterschieden^{69 67}.

Eine Dysregulation des mTorC1 Proteinkinasekomplexes wurde bereits als Ursache verschiedener Krankheitsbilder wie Tumorerkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 und Neurodegeneration identifiziert^{70 71}. Beispielsweise führt der Verlust des Tumorsuppressorgens *TP53* zu einer mTorC1 Aktivierung^{70 72}. Die akute Nierenschädigung, polyzystische Nierenerkrankungen und die chronische Nierenerkrankung sind Beispiele für bedeutende renale Erkrankungen, die mit Veränderungen des mTor-Signalwegs assoziiert sind⁷³. In proximalen Tubuluszellen wurde ein von mTor abhängiges regulatorisches Netzwerk für Nährstofftransport und Endozytose charakterisiert⁷⁴. Zudem wird mTorC1 die Kontrolle energieabhängiger Urinkonzentrationsmechanismen über mitochondriale Biogenese zugeschrieben. Der Verlust von mTorC1 erzeugt einen Konzentrationsdefekt, eine beschleunigte tubuläre Schädigung mit Verlust einer regenerativen proliferativen Reaktion sowie langsam progressive renale Fibrose⁷⁵. Auch für kardiale Funktionen spielt der mTor-Signalweg eine essenzielle Rolle. Eine mTorC1 Überaktivierung konnte unter anderem über pathologische Hypertrophie und gesteigerte Proteinsynthese als bedeutende Komponente der Entstehung einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) identifiziert werden⁷⁶.

Bei der Aminosäure sensitiven Aktivierung von mTorC1 spielen die kleinen Rag GTPasen eine entscheidende Rolle. In Form von Heterodimeren, bestehend aus Rag A/B und Rag C/D, bewirken die Rag Proteine die Translokation von mTorC1 innerhalb des endomembranären Systems der Zelle zur lysosomalen Membran. Somit befindet sich mTorC1 im gleichen Zellkompartiment wie sein Aktivator Ras homolog enriched in brain (Rheb) und die Aminosäure induzierte mTorC1 Aktivierung kann stattfinden⁷⁷. Bei der Assoziation der GTPasen mit mTorC1 kommt dem Nukleotidstatus der Rag Heterodimere eine wichtige Bedeutung zu^{78 77 79}. Nukleotidabhängige Konformationsänderungen der Rag Proteine gelten als Voraussetzung für die Bindung an mTorC1⁸⁰.

Alle als für die ADKH-RRAGD ursächlich identifizierten Varianten von *RRAGD* betreffen evolutionär unveränderte Aminosäurereste in Guanyl-Nukleotid Bindungsstellen, die in den kleinen GTPasen hoch konserviert sind. Diese Motive vermitteln die Interaktion mit der Phosphateinheit der Nukleotide⁹. *In vitro* Daten aus Vorarbeiten deuteten in Form erhöhter Bindung der RRAGD Varianten an essenzielle Komponenten von mTorC1 sowie eine Erhöhung der Phosphorylierung der S6 Kinase 1 (S6K1) als Substrat von mTorC1 auf eine erhöhte Aktivierung des mTor-Signalwegs als pathogenetische Grundlage der ADKH-RRAGD

hin⁹. Im Rahmen dieser Arbeit wird die am häufigsten gefundene Variante RRAGD Serin 76 Leucin (RRAGD S76L)⁹ untersucht.

2.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit besteht in der Erforschung der Rolle von FC und DZIP1L im SRC-STAT3-Signalweg für die Pathogenese der ARPKD.

Bei Betrachtung der Proteinstruktur von FC wurden die Tyrosine 3992 und 4009 im zytoplasmatischen Teil von FC als potenzielle Zielstrukturen der Phosphorylierung durch SRC identifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion von FC und SRC auf molekularer Ebene mit Fokus auf der Bedeutung der Tyrosine 3992 und 4009 von FC untersucht werden. Auch die Pathogenese der durch Varianten in *DZIP1L* bedingten ARPKD ist im Detail noch unverstanden. Besonders interessant ist an dieser Stelle die Frage nach einem funktionellen Zusammenhang zwischen DZIP1L und FC sowie Komponenten des SRC-STAT3-Signalwegs.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Pathogenese der ARPKD leisten. Die weitere Erfassung der Rolle des SRC-STAT3-Signalwegs bei der Pathogenese der ARPKD kann möglicherweise eine medikamentöse Therapieoption eröffnen. Als genetisch bedingte polyzystische Nierenerkrankung handelt es sich bei der ARPKD um ein seltenes, aber eines der schwerwiegendsten nephrologischen Krankheitsbilder der Pädiatrie. Damit wird die Erfassung der molekularen Pathogenese zu einem hoch relevanten Forschungsziel.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Variante RRAGD S76L als Ursache der ADKH-RRAGD auf molekularer Ebene untersucht.

Im Laufe der letzten Jahre entstand ein tiefergehendes Verständnis des mTor-Signalwegs und seiner Komplexität auf Grund der regulatorischen Beteiligung an zahlreichen grundlegenden zellulären Prozessen. Im Zuge dessen konnte auch die Rolle der Rag GTPasen für die Aktivierung des mTor-Signalwegs genauer erarbeitet werden. Die hier untersuchte und für die ADKH-RRAGD am häufigsten als ursächlich identifizierte Variante RRAGD S76L ist dagegen bislang unerforscht.

In dieser Arbeit wird insbesondere die Auswirkung der Variante RRAGD S76L auf den mTor-Signalweg untersucht. Ferner besteht das Ziel der Identifikation potenzieller Angriffspunkte einer medikamentösen Therapie für die ADKH-RRAGD. Zunächst dienen die hier dargestellten Experimente allerdings grundlegenden Erkenntnissen, die richtungsweisend für weitere Forschungsvorhaben sein könnten. Wie bei der im ersten Teil untersuchten ARPKD soll ein tieferer Einblick in die beteiligten Signalwege zum Gesamtverständnis der Pathogenese beitragen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen mit Artikelnummer und Hersteller.

Chemikalie/ Reagenz/ Lösung	Artikelnummer	Hersteller
5X GreenGoTaq@FlexiBuffer	M891A	Promega
5X Q5 High GC Enhancer	B9028A	New England Biolabs
5X Q5 Reaction Buffer	B9027S	New England Biolabs
5X Sequencing Buffer	4336697	Thermo Fisher Scientific
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (37, 5:1)	T802.1	Carl Roth
Agarosepulver	A9539	Sigma Aldrich
Ammoniumbicarbonat [10 mM] (AmBic)	A6141-25G	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	A0834	PanReac AppliChem
Ampicillin-Natriumsalz	K029.2	Carl Roth
Anti-GFP paramagnetische Beads	130-091-125	Miltenyi Biotec
Bovines Serum Albumin (5%) (BSA)	A6588.0100	AppliChem
Bromphenolblau	A512	Carl Roth
Calcium-Chlorid Dihydrat >99% Zellkultur	C7902	Sigma Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	102382	Merck
Cumarinsäure	c_9008	Sigma Aldrich
D (+) Glucose	1.08342.1000	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Zellkultur	A3672,0100	PanReac AppliChem
Diethiothreitol (DTT)	R0862	Thermo Fisher Scientific
dNTP mix 25mM	R0182	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	31966-021	Gibco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ F12	D6421-24	Sigma Aldrich
Dynabeads Protein G	10004D	Thermo Fisher Scientific
Essigsäure	49199	Sigma Aldrich
Ethanol	9065,3	Carl Roth
Ethidiumbromidlösung (1%)	2218.2	Carl Roth

Chemikalie/ Reagenz/ Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	60-00-4	Sigma Aldrich
Fetales bovines Serum (FBS)	10270106	Thermo Fisher Scientific
Flüssig-Stickstoff	2210112	Linde
Formaldehydlösung (16%)	28906	Life Technologies
Forskolin	F-6886	Sigma Aldrich
Fumarylacetoacetase (FAA, 100%)		
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM0311	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	N3236L	New England Biolabs
GlutaMAX (100x)	1157446	Thermo Fisher Scientific
Glycerol	3783	Carl Roth
Glycin	3908.2	Carl Roth
Hefeextrakt	212750	BD
HEPES	H0887-100ML	Sigma Aldrich
Hygromycin B Gold	ant-hg-5	Invivogen
Incidin Plus	3011520	Ecolab
Incuwater-Clean	A5219,0100	PanReac AppliChem
Indol-3-essigsäure (IAA) [200 mM]		
Isopropanol 100%	5752	Carl Roth
Kaliumchlorid (KCl)	6781	Carl Roth
KH ₂ PO ₄	6575.1	Carl Roth
LB-Agar	X965.1	Carl Roth
LB-Medium	X964.2	Carl Roth
Lipofectamine® 2000	11668019	Thermo Fisher Scientific
Luminol	09253	Fluka
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1.05833.0250	Merck
Methanol	4627.5	Carl Roth
Natriumchlorid (NaCl)	3957.1	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	CN30.3	Carl Roth
Natriumfluorid (NaF)	P756.2	Carl Roth
(tetra-)Natriumdiphosphat (Na ₄ P ₂ O ₇)	T883.1	Carl Roth
(di-)Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	S9390	Sigma Aldrich
Natriumhydroxidlösung (NaOH)	T135	Carl Roth

Chemikalie/ Reagenz/ Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	S6508-50G	Sigma Aldrich
Normal Donkey Serum (NDS), Normalserum Esel unkonjugiert	017-000-121	Dianova/ Jackson ImmunoResearch
Not1	R0189L	New England Biolabs
Nuclease-freies destilliertes Wasser	10977049	Invitrogen
Opti-MEM (Optimem)	31985047	Thermo Fisher Scientific
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Fisher Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	P6148	Sigma Aldrich
pH Papier McolorpHast 2.5-4.5	1.095.410.001	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	A0999	PanReac AppliChem
Polyacrylamid (PAA)		Carl Roth
Polysorbat 20	3472	Caelo
ProLong Diamond antifade reagent	P36970	Thermo Fisher Scientific
ProLong Diamond antifade reagent + DAPI	P36971	Thermo Fisher Scientific
Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-Free	539134-1ML	Merck
Protein G Sepharose	GE17-0618-01	Sigma Aldrich
Q5 Hot Start High Fidelity DNA Polymerase 2U/ μl	M0493	New England Biolabs
Restriktionspuffer		New England Biolabs
10X Puffer 3.1	B7203	
10X Puffer 2.1	B7202	
10X EcoRI Puffer	B0101	
SDS (Transfer-Puffer)	A2263, 0500	PanReac AppliChem
SDS Pellets (Laufpuffer)	CN 30.3	Carl Roth
Stage Tip (3 M SPE empore extraction disc C18 (octadecyl) 47 mm)	66883-U	Sigma Aldrich
Tetramethylethylendiamin >98,5% p.a. für die Elektrophorese	2367	Carl Roth
Taq DNA Ligase	M0208L	New England Biolabs
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.3	Carl Roth
Tris (Trizma Base)	T1503	Sigma Aldrich
Triton X-100	A4975,1000	PanReac AppliChem

Chemikalie/ Reagenz/ Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Trypsin	T6567	Sigma Aldrich
Trypsin-EDTA Lösung (0,05%)	25300054	Thermo Fisher Scientific
Urea	U1250	Sigma Aldrich
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	1.07210	Merck
Water PCR Reagent	R2523	Sigma Aldrich

3.1.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung.

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Detektionslösung (Enhanced Chemiluminescence, ECL)	100 mM Tris 2,5 mM Luminol 0,5 mM Cumarinsäure 1,5 % H ₂ O ₂ pH 8,5
Elutionspuffer (Massenspektrometrie)	75 µl Urea Puffer [8 M] 22,5 µl AmBic [10 mM] 6 µl IAA [200 mM] 25 mM Tris
HEBS Puffer (2x)	50 mM HEPES 280 mM NaCl 10 mM KCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,08
IP Puffer	20 mM Tris 7,5 1% TritonX-100 50 mM NaCl 12,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 25 mM NaF 2 mM Na ₃ VO ₄ (20 µl/ ml) 0,25 mM PMSF (4,4 µl/ ml) pH 7,5
Laemmli Puffer (1x)	50 mM Tris 2% SDS

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Laemmli Puffer (2x)	10% Glycerol Bromphenolblau 50 mM DTT pH 6,8 33,3 ml 1,5M Tris HCl 100 ml 20% SDS 100 ml Glycerol 1 g Bromphenolblau 100 mM DTT pH 6,8
Laufpuffer (SDS PAGE)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1% SDS
Lysepuffer	100 mM Tris 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ -EDTA pH 8,2
Lysepuffer (Massenspektrometrie)	1 % Triton X-100 20 mM Tris (pH 7,5) 25 mM NaCl 50 mM NaF 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 1 mM EDTA 1x PIM 5 mM Na ₃ VO ₄
PBS-Puffer	134 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄
Phosphatgepufferte Salzlösung nach Dulbecco (DPBS)	PBS-Puffer (siehe oben) 0,5 mM MgCl ₂ 1 mM CaCl ₂
Sammelgel (SDS PAGE)	250 mM Tris 5 % Polyacrylamid 0,1 % SDS 0,05 % Ammoniumperoxidisulfat

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
SOC Medium	0,1 % TEMED pH 6,8 2% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 8,6 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glukose pH 7,0
Transferpuffer (Western Blot)	22 mM Tris (pH 8,3) 166 mM Glycin 0,1% SDS 12% Methanol
Trenngel (SDS PAGE)	375 mM Tris 10 % Polyacrylamid 0,1 % SDS 0,05 % Ammoniumperoxidisulfat 0,05 % TEMED pH 8,8
Tris Puffer	10 mM Tris pH 8,0
Verdaupuffer (Massenspektrometrie)	50 µl Urea Puffer [8 M] 150 µl AmBic [10 mM] 1 µl DTT [200 mM] 1 µl Trypsin [1 µg/ µl]
Waschpuffer (Proteinwaschpuffer)	27 mM Tris 273 mM NaCl 2,2 mM Polysorbat 20 pH 7,5
Waschpuffer I (Massenspektrometrie)	50 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl 5 % Glycerol 0,05 % IPGal-CA-630 (oder Triton X-100)
Waschpuffer II (Massenspektrometrie)	50 mM Tris (pH 7,5) 150 mM NaCl

3.1.3. Assays und Kits

Tabelle 3 Assays und Kits mit Artikelnummer und Hersteller.

Assay/ Kit	Artikelnummer	Hersteller
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337455	Applied Bio Systems
Dual-Luciferase Reporter Assay System	E1960	Promega
GeneJET Gel Extraction Kit	K0692	Thermo Fisher Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	K0503	Thermo Fisher Scientific
GeneJet PCR Purification Kit	K0702	Thermo Fisher Scientific
Invitrogen Flp In Komplettsystem	10729364	Thermo Fisher Scientific
KOD Hot Start DNA Polymerase Kit	71086	Merck/ Novagen
Nucleobond Xtra Midi Kit	740410.100	Macherey Nagel
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	M0493L	New England Biolabs
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	R2523-100RXN	Sigma Aldrich
T4 DNA Ligase	EL0011	Thermo Fisher Scientific

3.1.4. Verbrauchsmaterial

Tabelle 4 Verbrauchsmaterial mit Artikelnummer und Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Artikelnummer	Hersteller
Blotting Papier	FT-2-521-580600 G	Sartorius Stedium Biotech
CoolCell™ 5 mL LX Cell Freezing Container for 12 x 3.5 ml to 5 ml cryogenic vials	BCS-406	Sigma Aldrich
CryoPure Gefäß 1,0 ml weiß	72.377	Sarstedt
Deckglas rund 18 mm, Stärke Nr. 1,5 (12-well)	CB00180RAC	Menzel
Eppendorf® Reaktionsgefäße 1,5 ml	72.706.201	Sarstedt
Eppendorf® Reaktionsgefäße 2 ml	72.691	Sarstedt
Eppendorf® Reaktionsgefäße Safe Lock PCR clean 2 ml	EP0030123344	Eppendorf

Verbrauchsmaterial	Artikelnummer	Hersteller
Eppendorf® Reaktionsgefäße Safe Lock PCR clean 1,5 ml	EP0030123328	Eppendorf
Eppendorf® Pipette Research plus, 8-Kanal, 10-100 µl	3122000035	Eppendorf
Erlenmeyer-Kolben	VWRI214-1133	VWR
Gelkassette leer, mini, 1,0 mm	NC2010	Thermo Fisher Scientific
Hamilton Pipette 50 µl	705	Hamilton
Handschuhe, Größe S	224685	Zentrallager
Immobilon®-P Polyvinylidene difluoride Transfermembran	T831.1	Carl Roth
Kamm 10 wells (für Polyacrylamidgele)	NC3010	Thermo Fisher Scientific
Kamm 12 wells (für Polyacrylamidgele)	NC3012	Thermo Fisher Scientific
Kamm 15 wells (für Polyacrylamidgele)	NC3015	Thermo Fisher Scientific
Multiply µStrip 0,2 ml 8er Kette ohne Deckel	72985002	Sarstedt
Multiply Deckelkette für 8er Kette	65989002	Sarstedt
Objektträger adhäsiv 90° 75x25x1 mm	7695021	Geyer
Petrischale 10 cm für LB Agar	82.1473.001	Sarstedt
Pipettierwanne		
Säulenhalter MACS® MultiStand	130-042-303	Miltenyi Biotec
Stripetten 5 ml	4051	Corning/ LMS
Stripetten 10 ml	4101	Corning/ LMS
Stripetten 25 ml	4251	Corning/ LMS
Stripetten 50 ml	4501	Corning/ LMS
TipOne Pipettenspitzen 10/20 µl, refill	S1110- 3700- c	Starlab
TipOne Pipettenspitzen 200 µl, refill	S1111- 1700- c	Starlab
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl, refill	S1111- 6700- c	Starlab
TipOne Pipettenspitzen steril 0,1-10 µl	S1110- 3810- c	Starlab
TipOne Pipettenspitzen steril 1-200 µl	S1111- 1816- c	Starlab
TipOne Pipettenspitzen steril 1000 µl	S1111- 6811- c	Starlab
Ultrazentrifugen-Röhrchen	357448	Beckman Coulter
µMACS Säulen	130-042-701	Miltenyi Biotec

Verbrauchsmaterial	Artikelnummer	Hersteller
µMACS Separator	130-042-602	Miltenyi Biotec
Wägeschale	2150.1	Carl Roth
Zellkulturschale (100 mm x 20 mm)	430167	Corning
Zellkulturschale 6-well	3516	Corning
Zellkulturschale 12-well	3513	Corning
Zellkulturschale 96-well	655180	Greiner BioOne
Zellschaber	3008	Corning
Zellzählkammer Neubauer Improved	T729.1	Carl Roth
Zentrifugenröhrchen 15 ml	188271	Greiner BioOne
Zentrifugenröhrchen 50 ml	227261	Greiner BioOne

3.1.5. Geräte

Tabelle 5 Geräte mit Modell und Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systec
Branson Ultrasonics™ S-250D Model Sonifier® Digital Cell Disrupter	101-063-670	Branson Ultrasonics
Elektrophoresekammern (Agarosegelelektrophorese)	Owl EasyCast 11932935	Thermo Fisher Scientific
Elektrophoresekammern (SDS PAGE)	XCell Surelock™ Novex® Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
Elektrophorese-Netzgerät (Agarosegelelektrophorese)	E425	Consort
Elektrophorese-Netzgerät (SDS PAGE)	E831	Consort
EnSpire Multimode Plate Reader	2300-0000	Perkin Elmer
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Axiovert 200M Fluorescence Microscope	Carl Zeiss
Hamilton Spritze 50µl	549-1155	VWR
Heizblock digital		VWR
Heizschüttler Thermomixer comfort		Eppendorf
Inkubator, Zellkultur	Serie CB	BINDER
Inkubator Function Line	50042307	Heraeus

Gerät	Modell	Hersteller
Inkubator, schüttelnd (Multitron Pro)	S-000120234-003	Infors HT
Inverses Labormikroskop	DM IL LED	Leica
MACSmix Tube Rotator	MX100	Miltenyi Biotec
Massenspektrometer	2 Q-Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS System	Thermo Fisher Scientific
Mehrkanalpipette (8er) 10-100µl	3122000043	Eppendorf
MiniStar Silverline (Zentrifuge)		VWR
Multifuge	4KR	Heraeus
NanoDrop Spektrophotometer	1000	PeqLab
PerfectBlue™ Semi-Dry Elektrobloetter Sedec™		PeqLab
Pipetboy Acu	1550	Integra Biosciences
Pipetman Classic Micro Volume Kit (2µl, 10µl, 100µl)	F167500	Gilson
Pipetman Classic Starter Kit (20µl, 200µl, 1000µl)	F167300	Gilson
Plattenschüttler	KS260	IKA
PowerPac™ HC power supply	164-5052	Bio-Rad
Power supply unit for HBO 50	432607-0000-000	Carl Zeiss
AC L1 (F) Roller Mixer	SRT6	Stuart
Schüttler	KS 260 basic	IKA
Smart Fluorescent Cell Analyser	JuLI™	Ruskinn
Sterile Werkbank	Mars Safety Class 2	SCANLAF
Thermal Cycler	MJ Mini	Bio-Rad
Thermal Cycler	S1000	Bio-Rad
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	1703940	Bio-Rad
Ultrazentrifuge Optima TLX 120	CTX 94H02	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP		Beckman Coulter
UV-Kamera (Agarosegelelektrophorese)		INTAS UV-Systeme
UV-Kamera (Western Blot)	Fusion	PeqLab
Vakuumpumpe	CVC 3000	Vacuubrand
Vortexmischer		Janke&Kunkel; VWR int.
Wasserbad	HBR4 digital	IKA
Zentrifuge Avanti	J-26S XPI	Beckman Coulter

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifugen	5415R; 5810R; 5417R; 5424; 5430R	Eppendorf

3.1.6. Antikörper

Tabelle 6 Primärantikörper mit Antigen, Typ, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.

Antigen	Typ	Wirt	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
β-Tubulin	monoklonal	Maus	1:1000; 1:500	AB_2315513	DSHB‡
Flag (M2)	monoklonal	Maus	1:10000	F3165	Sigma Aldrich
Flag	polyklonal	Kaninchen	1:2000; 1:500	F7425	Sigma Aldrich
GFP	monoklonal	Maus	1:1000	sc-9996	Santa Cruz
GFP	polyklonal	Kaninchen	1:1000	sc-8334	Santa Cruz
mTor	monoklonal	Kaninchen	1:1000	2983S	Cell Signaling
Phospho-mTor (Ser2448)	monoklonal	Kaninchen	1:1000	5536	Cell Signaling
V5 Epitop Tag	polyklonal	Kaninchen	1:1000	AB3792	Millipore

Tabelle 7 Sekundärantikörper mit Antigen, Spezifität, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.

Antigen	Spezif.	Wirt	Verdünnung	Artikelnummer	Hersteller
IgG (H+L), Horseradish Peroxidase konjugiert	Maus	Ziege	1:30.000	11503 5003	Jackson Immuno Lab
IgG (H+L), Horseradish Peroxidase konjugiert	Kaninchen	Ziege	1:30.000	11103 5003	Jackson Immuno Lab
IgG (H+L), Cyanine Cy™3 konjugiert	Kaninchen	Esel	1:1.000	711-165-152	Jackson Immuno Lab

3.1.7. Plasmide

Tabelle 8 Plasmide mit Vektor und Hersteller.

Plasmid	Vektor	Hersteller
F9.hSRC	pcDNA6	Nephrolab Cologne
F9.hSRC K298M (KD)	pcDNA6	Nephrolab Cologne
F9.hSTAT3 WT FL	pcDNA6	Nephrolab Cologne
F9.GFP	pcDNA6	Nephrolab Cologne
GFP	pgLap5	Nephrolab Cologne
GFP.mRragd WT	pgLap3	Für diese Arbeit kloniert
GFP.mRragd S75L	pgLap3	Für diese Arbeit kloniert
pcDNA6 V5 His B	pcDNA6 His B	Nephrolab Cologne
pGL4.74 (Renilla)	pGL4.74 (hRluc/TK)	Nephrolab Cologne
p4x M67-luciferase (STAT1/3)		Zur Verfügung gestellt von T. Weimbs
pOG44 (Flp Recombinase)		Invitrogen
V5.GFP	pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.hEPS15L1 [1-225]	pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.hDZIP1L WT FL	pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.hPKHD1[3882-4074] WT (w/o TEV)	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
V5.hPKHD1[3882-4074] Y399F (w/o TEV)	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
V5.hPKHD1[3882-4074] Y4009F (w/o TEV)	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
V5.hPKHD1[3882-4074] Y3992F,Y4009F (w/o TEV)	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
V5.hSRC	pcDNA6	Nephrolab Cologne
V5.hSTAT3	pcDNA6	Nephrolab Cologne
sV5.hPKHD1 3472-4074.Flag	pcDNA6	Nephrolab Cologne
sV5.hPKHD1 3472-4074.Flag Y3992F	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
sV5.hPKHD1 3472-4074.Flag Y4009F	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert
sV5.hPKHD1 3472-4074.Flag Y3992F Y4009F	pcDNA6	Für diese Arbeit kloniert

Anmerkung: F9 indiziert die Verwendung eines modifizierten pcDNA6 Vektors, welcher ein Flag- sowie ein His-Tag enthält.

3.1.8. Oligonukleotide/ Primer

Tabelle 9 Primer mit Anwendung, Hersteller und Sequenz.

Primer	Anwendung	Hersteller	Sequenz (5'-3')
hDZIP1L qPCR fp1	Klonierung	k.A.	CCCCACCAACTCGTCAGAG
hDZIP1L qPCR rp1	Klonierung	k.A.	GGCTGTAGAGACACACGCTG
hPKHD1 Y3992F QC	Quick Change	IDT	GCTCCTGCTCAGCAGGTGTTC
fp	Mutagenese		CTGCAAGAGACTGGGAAC
hPKHD1 Y3992F QC	Quick Change	IDT	GTTCCCAGTCTCTTGCAGGAA
rp	Mutagenese		CACCTGCTGAGCAGGAGC
hPKHD1 Y4009F QC	Quick Change	IDT	GCCAAGAGCAGTTGCTCAGAT
fp	Mutagenese		TCCAGCTGGCAGGCCAAAATC
hPKHD1 Y4009F QC	Quick Change	IDT	GATTTTGGCCTGCCAGCTGGA
rp	Mutagenese		ATCTGAGCAACTGCTCTTGGC
mRragd Mlul 1 fp	Klonierung	k.A.	CGCGGGACGCGTATGAGCCA AGTGCTGGGCA
mRragd NotI* 399 rp	Klonierung	k.A.	CGCGGGGCGGCCGCCCTACA GCAGCACTCTAGGG
mRragd S75L gt fp1	Genotypisierung	k.A.	CTGTTTGTGTTCCAGAGTCC
mRragd S75L gt rp1	Genotypisierung	k.A.	TCGATGACGAAGATCAGTGC
mRragd S75L qc fp2	Quick Change	k.A.	GTCTCAGGAGGAGCGGCAAG
	Mutagenese		TTGTCTATCCAGAAAGTCGTCT TTCAC
mRragd S75L qc rp2	Quick Change	IDT	GTGAAAGACGACTTTCTGGAT
	Mutagenese		AGACAACCTTGCCGCTCCTCCT GAGAC
pcDNA6 (-mlu) fsp1	Sequenzierung	k.A.	CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
pcDNA6 (-mlu) rsp 1	Sequenzierung	k.A.	AGGAAAGGACAGTGGAGTG
V5.pcDNA6 w/o TEV	Quick Change	k.A.	AGCTTACCATGGGTAAGCCTA
fp	Mutagenese		TCCCTAACCTCTCCTCGGTC TCGATTCTACGCCG
V5.pcDNA6 w/o TEV	Quick Change	k.A.	GATCCGGCGTAGAATCGAGAC
rp	Mutagenese		CGAGGAGAGGGTTAGGGATA GGCTTACCCATGGTA
V5 w/o TEV gt rp	Genotypisierung	k.A.	AGCCGGGATCCGGCGTAG

3.1.9. Software

Tabelle 10 Software mit Angabe weiterer Informationen.

Software	Details
Adobe Acrobat Reader DC	2020.012.20048
Ensembl Genome Browser	https://www.ensembl.org/index.html
Excel 2016	Microsoft Office 365 ProPlus
Fiji	ImageJ 1.52p
GeneCards	5.0; https://www.genecards.org/
Gene Ontology	http://geneontology.org/
Image Studio	Version 5.2.5, LI-COR Inc.
KEGG	https://www.genome.jp/kegg/kegg1.html
NCBI BLAST Basic Local Alignment Search Tool	2.10.1 (protein/nucleotide)
NCBI Pubmed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/
Powerpoint	Microsoft Office 365 ProPlus
STRING	Version 11.5, https://string-db.org/
Word	Microsoft Office 365 ProPlus
ZEN Mikroskopie-Software	ZEISS ZEN 2.5 Pro (blue edition)

3.2 Methoden

3.2.1. Zellkultur

Humane embryonale Nierenzellen (Human embryonal kidney cells, HEK293T-Zellen) wurden in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultiviert. Die Bebrütung fand in einem befeuchteten Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zur Subkultivierung wurde das Medium mit einer Vakuumpumpe vollständig abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden mit 4-5 ml Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) gewaschen und durch Zugabe von 1 ml Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach vollständiger Ablösung durch 2- bis 3-minütige Inkubation bei 37 °C wurde eine der Zelldichte entsprechende Menge aufgewärmten Mediums (9 ml oder 11 ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden unter Verwendung des Pipettierhelfers resuspendiert und als Einzelzellsuspension auf neue Zellkulturschalen mit vorgelegtem Medium gleichmäßig verteilt.

Für die Durchführung des Luciferase Assays wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer improved Zählkammer gezählt und auf eine Dichte von 40×10^4 Zellen pro ml in eine 96-well Schale gesät.

3.2.2. Transfektion

Bei der Transfektion handelt es sich um das Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen. Es existieren verschiedene Transfektionsmethoden, die sich unter anderem in ihrer Effizienz und Toxizität unterscheiden⁸¹. Zur transienten Überexpression von Proteinen durch HEK293T-Zellen wurden sowohl die Calciumphosphatmethode als auch die Lipofektion durchgeführt.

Bei der chemischen Transfektionsmethode mittels Calciumphosphat bildet die Plasmid-DNA Kopräzipitate mit Calciumphosphat, welche per Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden und über das Endosom in den Zellkern gelangen^{82,83}. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde in ein Reaktionsgefäß zu 500 µl CaCl₂-Lösung gegeben. Die tropfenweise Zugabe von 500 µl Phosphatpuffer (2x HEBS-Puffer) unter Verwendung des Vortexmischers sorgte für einen konstanten pH-Wert während der Transfektion. Nachfolgend wurden 970 µl dieser Lösung mit der Pipette tropfenweise gleichmäßig auf das Medium der Zellen verteilt. Nach 6- bis 8-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Prozess durch einen Mediumwechsel abgestoppt. Die Zellen waren nach circa 12 Stunden weiterer Inkubation zur Ernte bereit.

Zur Durchführung der Luciferase Assays und zur Erstellung der IMCD Flp-In Zelllinien wurde die biologische Transfektionsmethode der Lipofektion genutzt. Hierbei findet eine ionische Bindung der Plasmid-DNA an die Oberfläche der Liposomen statt⁸⁴. Die Komplexe aus DNA und Liposomen binden an der Zelloberfläche und gelangen ebenfalls über endosomale Aufnahme in den Zellkern⁸⁵.

Für die Luciferase Assays wurde zunächst ein Mastermix aus Optimem® und den Reporterplasmiden Renilla und Firefly Luciferase beziehungsweise einem Kontrollplasmid erstellt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Messwerte zu erreichen. Nach Aufteilung auf die Reaktionsgefäße konnte die entsprechende Plasmid-DNA für die einzelnen Triplikate hinzugegeben werden. Ein Mastermix aus Optimem® und Lipofectamine 2000 wurde nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zusätzlich auf die Reaktionsgefäße verteilt. Es folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurden 50 µl des Optimem-Plasmid Gemisches pro Vertiefung (well) auf die 96-well Platte gegeben.

Zur Generierung der Flp-In Zelllinien wurde zunächst pro Punkt der Mastermix A bestehend aus 150 µl Optimem® und 1 µg der jeweiligen Plasmide erstellt. Diese waren zum einen die DNA des zu untersuchenden Gens im pGLap Vektor und zum anderen das pOG44 Plasmid, das die Flippase exprimiert. Es folgte die Anfertigung von Mastermix B. Dazu wurden pro Punkt 9 µl Lipofectamine 2000 zu 36 µl Optimem® hinzugefügt und mit Hilfe des Vortexmischers gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden in jedes Reaktionsgefäß 45 µl Mastermix B zu dem vorgelegten Mastermix A gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nun wurden nach einem Mediumwechsel 190 µl des Transfektionsgemisches auf die Zellen gegeben.

Die Ernte der Zellen erfolgte in beiden Fällen ohne weiteres Abstoppen des Prozesses nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C.

3.2.3. Ernte und Lyse von Zellen

Nach Absaugen des Mediums und Zugabe von 8 ml kaltem PBS-Puffer wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von der Zellschale gelöst und in ein vorgekühltes 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon) überführt. Zur Herstellung eines Lysats, bestehend aus den gesamten Zellbestandteilen (whole cell lysate), wurde 1 ml der Zellsuspension abgenommen und für 3 min bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 50 µl 1xLaemmli+ dTT gelöst (10 min bei 95 °C). Vor der Verwendung des Lysats erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, fullspeed).

Zur Durchführung einer Koimmunopräzipitation oder zur Anfertigung von Zelllysaten wurde das Lysat bei 1000 rpm für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet zur Überführung in das 1,5 ml Eppendorfgefäß in je 1 ml Immunopräzipitationspuffer (IP-Puffer) gelöst. Dieser enthielt 200 µl/ 10 ml 100 mM Na₃VO₄ als Phosphataseinhibitor und 44 µl/ 10 ml 57 mM PMSF als Proteaseinhibitor zur Erhaltung der Funktion und Integrität der Proteine. Es folgte eine Lyse auf dem Überkopfschüttler für 20 bis 30 min bei 4 °C. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (4 °C, 30 min, fullspeed) sammelten sich die restlichen Zellbestandteile im Pellet und das Lysat konnte in Form des Überstands in ein weiteres Eppendorfgefäß transferiert werden.

3.2.4. Immunopräzipitation

Im Anschluss an die beschriebene Ernte und Lyse der Zellen wurden von dem Überstand 930 µl abgenommen. Davon wurden 30 µl als Lysat in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und die übrigen 900 µl für die Koimmunopräzipitation verwendet. Bei dieser Methode werden Sepharose Beads verwendet, welche an IgG-bindendes Protein gekoppelt sind. Über einen passenden Antikörper lassen sich spezifische Proteine binden und es folgt die Präzipitation eines isolierten Proteinkomplexes. Durch anschließende Denaturierung geben mitpräzipitierte Proteine Hinweise auf eine mögliche Interaktion ⁸⁶.

Pro 900 µl Lysat wurde 1 µg eines murinen Anti-V5-Antikörpers zugegeben. Nach einer Inkubation auf dem Überkopfschüttler (1h, 4 °C) wurden 30 µl Protein G Beads, die an den murinen Antikörper binden, pro Lysatprobe hinzugefügt. Über Nacht folgte eine weitere Inkubation bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler. Im Anschluss wurden drei aufeinander folgende Waschschriffe (3x jeweils 3 min Zentrifugation bei 5.000 rpm bei 4 °C) durchgeführt. Anschließend wurden jedem Pellet 30 µl 2xLaemmli+ dTT hinzugefügt und es erfolgte eine 5-minütige Denaturierung bei 95°C. Zuletzt wurden die Proben für zwei Minuten bei fullspeed zentrifugiert. Der Überstand enthielt den präzipitierten Proteinkomplex und konnte zur weiteren Analyse in Form eines Western Blots verwendet werden.

3.2.5. Koimmunopräzipitation für Massenspektrometrie

Zur Untersuchung der Interaktionspartner eines Proteins wurde dieses zunächst über eine Immunopräzipitation isoliert. Anschließend wurden über eine unverzerrte Interaktomanalyse durch markierungsfreie quantitative Proteomik Interaktionspartner identifiziert. Diese bieten Informationen über die Funktion und die molekularen Mechanismen, in die das zu untersuchende Protein im physiologischen Kontext involviert ist. In dieser Arbeit wurden die IMCD Flp-In Zelllinien GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L und GFP.GFP (siehe 3.2.9.) untersucht.

Pro Zelllinie wurden zehn konfluente 10 cm-Zellschalen geerntet und gegebenenfalls bis zur weiteren Durchführung der Zellyse bei -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren gelagert. Zur vollständigen Lyse wurde das Zellpellet in 12 ml Lysepuffer resuspendiert und anschließend bei einer Amplitude von 30 % für 9 Sekunden (0,1 s Sonifizierung und 0,9 s Pause) sonifiziert. Es folgte eine Inkubation auf dem Überkopfschüttler (4 °C, 15 min). Nach einem Zentrifugationsschritt (10500 rpm für 30 min bei 4 °C) konnten die Lysate in ein 15 ml Falcon überführt werden.

Zur Immunopräzipitation wurden im Anschluss pro Probe 50 µl paramagnetische MicroBeads, gebunden an einen monoklonalen Anti-GFP Antikörper, hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde auf dem Überkopfschüttler bei 4 °C. Zur Auftrennung dienten µMACS Säulen (Miltenyi Biotec). Vor der Verwendung wurden diese zur Vorreinigung und Befeuchtung mit jeweils 200 µl Lysepuffer beladen. Danach wurde die Probe blasenfrei auf die Säulen

verbracht. Die Proteine wurden durch die gebundenen Anti-GFP Beads im Magnetfeld des Säulenhalters in der Säule zurückgehalten und isoliert. Nach der Reinigung der Proben (3x 200 µl gekühlter Waschpuffer I, 5x 100 µl gekühlter Waschpuffer II) wurde der Verdau der Proben in der Säule durchgeführt. Dazu wurden pro Säule 25 µl Verdauopuffer hinzugefügt. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Elution durch zweimalige Zugabe von 50 µl Elutionspuffer. Sowohl die Elution als auch die direkt darauffolgende Fortsetzung des Verdau bei Raumtemperatur über Nacht fanden unter lichtgeschützten Bedingungen statt. Am Folgetag wurden den Proben 100 %ige FAA in einer Konzentration von 4 µl pro 100 µl Verdau beigefügt. Dabei wurde die Unterschreitung eines pH-Werts von 3,6 vermieden. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei Raumtemperatur, fullspeed) konnte das Stagetipping zur Reinigung und Vorfragmentierung der Proben durchgeführt werden. Die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie zur Identifikation der potenziellen Interaktionspartner der zu untersuchenden Proteine wurde anschließend durch die Proteomics Core Facility des CECAD Cologne nach dem dortigen Standardprotokoll durchgeführt⁹. Zur Separierung der Peptide wurde das 2 Q-Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS System (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Mit bioinformatischer Unterstützung konnten mit Hilfe einer hierarchischen Clusterung der Proteinintensitäten aus dem Datensatz Proteine identifiziert werden, die signifikante Unterschiede in der Kopräzipitation mit GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT zeigten. Zur Visualisierung von bekannten und vorhergesagten Protein-Protein-Interaktionen zwischen den bei GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT signifikant angereicherten Proteinen wurde die STRING Datenbank verwendet (Version 11.5, <https://string-db.org>)^{87,88}.

3.2.6. SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts durch ihre dazu proportionale Ladung⁸⁹. Die Tertiärstruktur der Proteine muss aufgebrochen werden, damit diese als lineare Proteine vorliegen und durch die zwei aufeinander folgenden Phasen größenabhängig im elektrischen Feld getrennt werden können⁹⁰.

Im Anschluss an Lyse und Denaturierung waren die mit 2x Laemmli+dTT versetzten Proben auf Eis zu lagern. Die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt. Unter Verwendung der Hamilton Spritze wurden jeweils 15 µl der Proben in die Geltaschen geladen. Bestimmt durch die Zusammensetzung des Gels begann die Gelelektrophorese mit der Sammelphase, bei der eine Spannung von 70 V für 30 min angelegt wurde. Es folgte die Trennphase mit einer Stromstärke von 25 mA pro Gel für 100 min.

Nach der Gelelektrophorese wurden die separierten Proteine zur Detektion in einem Semi-Dry Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid-Trägermembran (PVDF-Membran) übertragen. Zunächst musste die positive Ladung der Membran durch vollständige Benetzung mit

Methanol für 30 Sekunden aktiviert werden. Alle Komponenten wurden in Transfer-Puffer getränkt, bevor die Transfereinheit aufgebaut wurde. Diese bestand aus Membran und dem luftblasenfrei aufliegenden Gel, oben und unten umgeben von jeweils einem Blottingpapier. Der Transfer fand senkrecht zur Trennrichtung der Gelelektrophorese statt, sodass die Proteine unter Anlegen einer Spannung von 12 V für 56 min von der Kathode zur Anode wanderten und somit auf der Membran fixiert wurden.

Zur Blockade der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran nach Beendigung des Transfers für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) inkubiert und anschließend für 3x 10 min mit Proteinwaschpuffer gewaschen. Im Rahmen der Immunfärbung inkubierte zunächst der Primärantikörper und nach einem Waschschrift folgend der an konstante Bereiche des Primärantikörpers bindende Sekundärantikörper. Die Inkubationen fanden für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf dem Wipp- oder Rotationsschüttler statt. Zur Detektion der auf der Membran fixierten Proteine wurde das Prinzip des enzymmarkierten Sekundärantikörpers zur Signalverstärkung genutzt. Die auf die Membran transferierten Proteine wurden unter Anwendung der Chemilumineszenzreaktion sichtbar. Nach Zugabe des Substrats Luminol in Form von ECL als Verstärkersystem entstand ein lichtemittierendes Produkt. Dessen Signal konnte nach zwei bis drei Minuten mit Hilfe der Fusion Kamera visualisiert werden.

3.2.7. Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung dient der Detektion von Antigenen im zellulären Kontext. Der spezifische Primärantikörper erkennt das zu untersuchende Protein als Antigen. Über einen an ein Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper entsteht ein Fluoreszenzsignal mit charakteristischer Wellenlänge. Die konfluenten Zellen wurden in einer 12-well Platte auf Deckgläsern subkultiviert. Am Folgetag wurde das Medium gegebenenfalls durch DMEM-F12Ham ohne jegliche Zusatzprodukte ausgetauscht, um den Einfluss der Aminosäureverfügbarkeit zu untersuchen. Am dritten Tag begann die Immunfluoreszenzfärbung in Form eines Waschschruttes mit 0,5 bis 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung nach Dulbecco (DPBS). Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Während drei 10-minütiger Waschschruttes mit DPBS wurden die Deckgläser in eine lichtgeschützte Färbekammer transferiert. Anschließend fand die Blockade unspezifischer Bindungsstellen sowie die Permeabilisierung der Zellmembran durch Zugabe von 100 µl 5 % Normalserum vom Esel in PBS+Triton pro Deckglas statt. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Deckglas 100 µl des Primärantikörpers in entsprechender Verdünnung in PBS+Triton hinzugegeben. Die Inkubation fand lichtgeschützt bei 4 °C über Nacht statt.

Am Folgetag wurde der Sekundärantikörper verdünnt in PBS+Triton nach drei Waschschruttes mit DPBS für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Es folgten drei weitere

Waschschritte von jeweils 10 min, bevor die Deckgläser mit den Zellen auf die Objektträger transferiert wurden. Hierzu wurden die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen des Eindeckmediums Prolong Diamond gelegt. Dieses enthält 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches über Anlagerung an die DNA zur Darstellung der Zellkerne durch Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von 461 nm dient. Über Nacht trockneten die Färbungen lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Zur Auswertung der Immunfluoreszenzsignale wurden das Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop von Carl Zeiss und die dazugehörige Software Zeiss Zen (Blue Edition) verwendet.

3.2.8. Luciferase Assay

Zur Durchführung des Dual Luciferase Assays wurde eine 10 cm Schale konfluenter HEK293T-Zellen 1:5 wie in 3.2.1. beschrieben auf einer 96-well Platte subkultiviert. Mit Hilfe der Multipipette wurden 100 µl der Zellsuspension pro Vertiefung (well) verteilt. Am folgenden Tag wurden die Plasmide wie in 3.2.2. dargestellt mittels Lipofektion zur transienten Überexpression in die Zellen eingebracht. Dabei wurden pro Punkt drei technische Replikate erstellt. Nach 24-stündiger Kultivierung wurden die Messdaten erhoben. Dazu wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums für 15 min auf dem Plattenschüttler durch Zugabe von 100 µl passiven Lyse Puffers pro Vertiefung lysiert. Anschließend wurden 25 µl pro Vertiefung abgenommen und zur Messung durch den Perkin Elmer Enspire Plate Reader eingesetzt. Im Rahmen des Dual Luciferase Reporter Assays diente das Lumineszenzsignal der Firefly Luciferase normalisiert auf das Signal der Renilla Luciferase als Reporter für die transkriptionelle Aktivität von STAT3⁵⁰.

3.2.9. Generierung einer Flp-In Zelllinie

Die Flp-In Technologie ermöglicht über eine transgene FRT-Site eine einmalige, stabile Integration eines spezifischen Gens in das Genom von kultivierten Zellen⁹¹. Ein pgLap3/FRT beziehungsweise pgLap5/FRT Expressionsvektor, der das gene of interest (GOI) enthält, wird mit Hilfe der Flp Rekombinase vermittelten DNA-Rekombination über die FRT-Stellen in das Genom integriert⁹¹. Die Expression des GOI ist durch den vorgeschalteten humanen CMV-Promotor reguliert. Zusätzlich enthält der Vektor ein für Hygromycinresistenz kodierendes Gen, dem allerdings der Promotor und das ATG Startcodon fehlen. Die Kotransfektion des pOG44 Plasmids, welches die Flp Rekombinase unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors konstitutiv exprimiert⁹²⁻⁹⁴, ermöglicht die homologe Rekombination über die FRT-Stellen des Vektors und der Wirtszellen. Die Insertion des pgLap3/FRT beziehungsweise pgLap5/FRT Expressionsvektors bringt den CMV-Promotor und das ATG Startcodon des pFRT/lacZeo Vektors zusammen, welche das Hygromycinresistenzgen umschließen und gleichzeitig das lacZ-Zeocin Fusionsgen inaktivieren. Es entsteht eine Flp-In-Zelllinie mit

stabiler Expression des zu untersuchenden Gens, die nach Hygromycinresistenz selektiert werden kann.

Der das zu untersuchende Protein kodierende DNA-Abschnitt wurde als Plasmid über etablierte Klonierungsmethoden in den pgLap3/FRT beziehungsweise pgLap5/FRT Expressionsvektor integriert. Die für das Flp-In-System benötigten Plasmide wurden mittels Lipofektion wie in 3.2.2. beschrieben in die Flp-In IMCD Zellen, die hier als Wirtszellen dienen, eingebracht. Die Selektion der Zellen erfolgte mittels Zugabe von Hygromycin B Gold.

3.2.10. Klonierungen und Plasmide

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die 1988 von Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion dient der exponentiellen Vervielfältigung einzelner DNA-Abschnitte ⁹⁵. Aufgebaut ist die *in vitro* stattfindende DNA-Replikation aus der zyklischen Wiederholung der Vorgänge der Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Die Primer, bei denen es sich um sequenzspezifisch synthetisierte DNA-Nukleotide handelt, lagern sich im Rahmen der Hybridisierung an die als Einzelstrang vorliegende DNA an und dienen der thermostabilen Polymerase als Startpunkt der DNA-Synthese. Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Zur Analyse des verdauten PCR-Produktes diente die Gelelektrophorese. Schlussendlich konnte das PCR-Produkt unter Verwendung des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Fisher Scientific) nach dem dazugehörigen Standardprotokoll aus dem Gel aufgereinigt werden.

Tabelle 11 Pipettierprotokoll PCR

Material	Menge
Q5 Puffer	5 µl
GC Enhancer	5 µl
Fp Primer (1:10)	0,5 µl
Rp Primer (1:10)	0,5 µl
NTP	0,2 µl
Q5 Polymerase	0,25 µl
Plasmid DNA	100 ng
H ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 12 Programm Thermocycler PCR

Phase	Temperatur	Zeit
Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
Hybridisierung	58 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 min
Elongation	72 °C	2 min
Kühlung	15 °C	∞

Wiederholung der Schritte 2 bis 4 für 34 Zyklen

Zielgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe der zirkulären Mutagenese können in einer PCR gezielt Mutationen in Plasmide eingefügt werden. Dazu werden Primer verwendet, die mittig die gewünschte Mutation enthalten, was zum Einbau dieser in den neu synthetisierten Strang führt ⁹⁶. Mit Hilfe des Restriktionsenzym Dpn1, welches ausschließlich methylierte DNA (hier aus den Bakterien) verdaut, werden die Ausgangsplasmide, die ursprünglich als Matrize dienten, entfernt. Die durch die PCR *in vitro* erzeugten mutierten Kopien wurden zur Amplifikation und späteren Analyse in Bakterien transformiert (siehe 3.2.10. Transformation und Amplifikation von Bakterien).

Ligation

Bei der Ligation handelt es sich um eine Methode zur Herstellung rekombinanter DNA-Plasmide bestehend aus dem zu untersuchenden Gen in Form des Inserts und einem Vektor. Durch den zuvor durchgeführten Restriktionsverdau der beiden DNA-Fragmente entstanden kompatible Schnittstellen, welche die Bildung kovalenter Phosphodiesterbrücken, katalysiert durch die T4-Ligase, ermöglichten ⁹⁷. Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle diente eine Probe, bei der kein Insert hinzugefügt wurde.

Tabelle 13 Pipettierprotokoll Ligation

Material	Menge
T4 Puffer	2 µl
T4 Ligase	0,4 µl
Vektor	2 µl
Insert	4 µl
H ₂ O	11,6 µl

Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h

Transformation und Amplifikation von Bakterien

Die Transformation beschreibt das Einbringen von exogener DNA in Bakterien ⁹⁸. Die Durchführung des Protokolls fand auf Eis statt. Zunächst wurden 25 µl chemokompetenter E. coli Bakterien (DH10Bt1) mit 2,5 µl DNA versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben für 45 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt, um die DNA-Aufnahme über die bakterielle Zellwand zu erhöhen. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis wurden den Bakterien 250 µl SOC-Medium (Super Optimal Broth Medium, komplexes Nährmedium, hier mit Glucose versetzt) hinzugefügt und es folgte eine Inkubation von einer Stunde auf dem Schüttler bei 600-1000 rpm und 37 °C. Anschließend wurden 50 µl des Gemischs auf vorgewärmtes Nährmedium ausgestrichen, welches ein selektives Antibiotikum enthielt. Dies ermöglichte während der Inkubation bei 37 °C über Nacht die Selektion der Bakterien, die zuvor das rekombinante Plasmid mit der Antibiotikaresistenz aufgenommen hatten. Am nächsten Tag folgte die Ernte der Bakterien. Dazu wurde eine einzelne Kolonie in ein 15 ml Falcon mit 3 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Es folgte eine circa 12-stündige Inkubation bei 37 °C und 100 rpm.

Am nächsten Tag wurde das GeneJet Plasmid Mini Prep Kit zur Isolierung der DNA aus den Bakterien nach Herstellerangaben verwendet. Mit Hilfe des NanoDrops wurde die DNA-Konzentration des Eluats gemessen. Durch einen Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese konnte das extrahierte DNA-Produkt analysiert werden. Nach Identifizierung einer positiven Kolonie wurde von dieser eine Midi Kultur angesetzt. Dazu wurden 4 g LB-Medium in 200 ml destilliertem Wasser gelöst und in einem Verhältnis von 1:1000 mit dem entsprechenden Antibiotikum (hier 200 µl Ampicillin) versetzt. Nach Zugabe von 100 µl Bakterienkultur fand über Nacht die Inkubation bei 37 °C und 100-120 rpm statt. Die DNA wurde am nächsten Tag unter Nutzung des MidiPrep Kits nach dem dort enthaltenen Standardprotokoll präpariert und anschließend erneut mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese analysiert. Bei Bedarf wurde das Plasmid sequenziert.

Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Erkennungssequenzen in der DNA und schneiden diese an einer bestimmten Stelle ⁹⁹. So werden DNA-Fragmente mit Überhang, den sticky ends, oder ohne Überhang erzeugt. Diese können durch Ligation mit anderen passend geschnittenen DNA-Abschnitten zusammengefügt werden. Analytisch lässt sich der Restriktionsverdau durch die vorhersehbare Länge der bei erfolgreichem Verdau entstehenden DNA-Fragmente nutzen. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Pipettierschema zusammengestellt und für 1-2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 14 Pipettierprotokoll Restriktionsverdau

Material	Menge
NEBuffer 3.1	1,5 µl
Enzym 1 (Mlu)	0,5 µl
Enzym 2 (Not)	0,5 µl
DNA	0,5 µg
H ₂ O	ad 15 µl
Inkubation bei 37 °C für 1 h	

Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die größenabhängige Auftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld ¹⁰⁰. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in DNA und bietet die Möglichkeit, diese bei einer Wellenlänge von 320 nm unter UV-Licht sichtbar zu machen ¹⁰¹. Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst. Die Probe wurde mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Die Auftrennung der DNA-Stränge erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 90-120 V für 30 min. Hier diente die Agarosegelelektrophorese sowohl der Analyse als auch der Isolierung von Nukleinsäuren.

Sequenzierung

Zur Sequenzierung diente die Kettenabbruchmethode nach Sanger. Dabei wird ein Reaktionsansatz verwendet, der Didesoxynukleotide enthält, welche durch die fehlende Hydroxygruppe zum Abbruch der DNA-Synthese führt ¹⁰². Somit entstehen bei der Synthese des komplementären DNA-Strangs durch die Polymerase DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Aus der Auswertung der Fluorophormarkierung der ddNTPs am Ende der Fragmente lässt sich nach elektrophoretischer Auftrennung nach Größe die Basenabfolge des sequenzierten DNA-Abschnitts identifizieren. Die Sequenzierungs-PCR wurde nach dem folgenden Schema angesetzt. Die Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte durch das Cologne Center for Genomics (CCG). Die Ergebnisse konnten über den internen Server abgerufen werden.

Tabelle 15 Pipettierprotokoll Sequenzierung

Material	Menge
Big Dye Terminator	0,25 µl
5x Big Dye Puffer	2,25 µl
Primer (1:100)	2 µl
DNA Template	100 ng
H ₂ O	ad 10 µl

Tabelle 16 Programm Thermocycler Sequenzierung

Phase	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96 °C	10 s
Hybridisierung	55 °C	5 s
Elongation	60 °C	4 min
Kühlung	4 °C	∞

Wiederholung Hybridisierung für 32 Zyklen

4. Ergebnisse

4.1 Funktion von FC im SRC-STAT3-Signalweg bei der molekularen Pathogenese der ARPKD

4.1.1. SRC phosphoryliert FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992

Vordaten aus Koimmunopräzipitationsexperimenten unseres Labors wiesen auf eine Interaktion zwischen der Tyrosinkinase SRC und dem zytoplasmatischen Teil FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ von FC hin. Die Western Blot Analyse ließ eine direkte Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ durch SRC vermuten, welche in dieser Arbeit näher untersucht wird.

Die beiden Tyrosine 3992 und 4009 von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ wurden durch gezielte Mutagenese durch Phenylalanin ersetzt. Daraus resultierten die jeweiligen Einzelmutanten (FC^{3882-4074.Y3992F} und FC^{3882-4074.Y4009F}) sowie eine Doppelmutante (FC^{3882-4074.Y3992,4009F}). Um zu prüfen, ob SRC die verschiedenen Varianten von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ phosphorylieren kann, wurden diese jeweils mit der wildtypischen Form von SRC und zusätzlich mit einer Variante von SRC ohne Kinaseaktivität (KD, kinase dead) in HEK293T-Zellen koexprimiert. Die Varianten von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ wurden mittels Koimmunopräzipitation angereichert und in einer Western Blot Analyse dargestellt.

Die Western Blot Analyse bestätigt die Abhängigkeit der Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ von der Kinaseaktivität von SRC (Abb. 1A). Die Anfärbung von phosphoryliertem Tyrosin (Anti-pY99 Färbung) verdeutlicht, dass die Tyrosinphosphorylierung von präzipitiertem FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ nur bei intakter Kinasefunktion von SRC mittels Antikörper als Bande nachweisbar ist. Die Bande verschwindet, sobald Tyrosin 3992 zu Phenylalanin mutiert ist, wie es bei der Einzelmutanten FC^{3882-4074.Y3992F} und der Doppelmutanten FC^{3882-4074.Y3992,4009F} der Fall ist, im Gegensatz zu der Variante FC^{3882-4074.Y4009F} mit isolierter Veränderung des Tyrosins 4009. Somit ermöglicht die Anti-pY99 Färbung der präzipitierten Varianten von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ die Identifizierung des Tyrosins 3992 als Ziel der Phosphorylierung durch SRC.

Der Einfluss der Mutationen der Tyrosine 3992 oder 4009 des membrangebundenen C-terminalen Fragments von FC (mFC, FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴) auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 wurde im STAT3 Luciferase Assay untersucht. Die Tyrosine 3992 und 4009 von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ wurden ebenfalls durch gezielte Mutagenese durch Phenylalanin ersetzt. Anschließend wurden HEK293T-Zellen wie in Abbildung 1B dargestellt mit FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ in wildtypischer sowie in den mutierten Formen in Kombination mit SRC transfiziert. Die Auswertung des Luciferase Assays zeigt keinen Einfluss der Mutationen der Tyrosine auf die transkriptionelle Aktivität von STAT3 (Abb. 1B). Die aus Vorarbeiten bekannte Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung durch Koexpression von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ in wildtypischer Form bleibt bei Verwendung der Varianten FC^{3472-4074.Y3992F}, FC^{3472-4074.Y4009F} oder FC^{3472-4074.Y3992,4009F} unverändert.

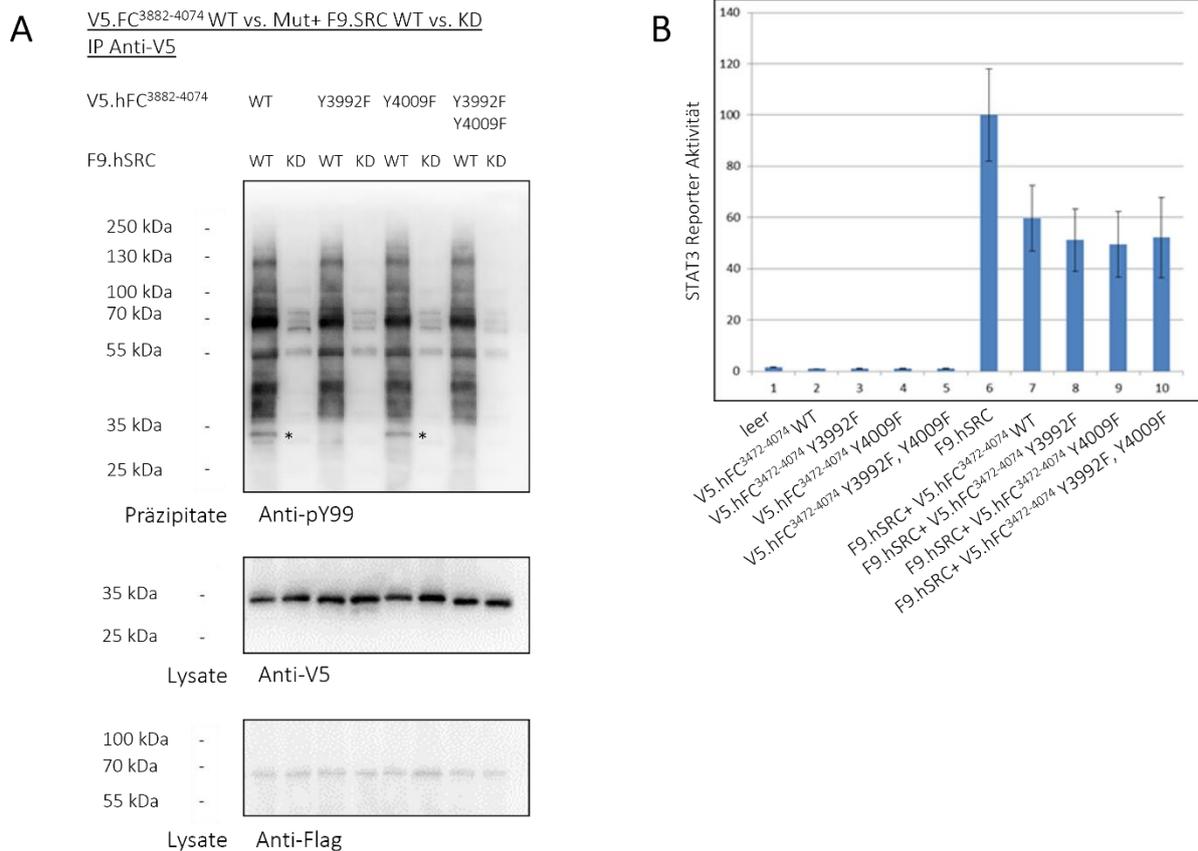


Abbildung 1 SRC phosphoryliert FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992. Die Mutationen der Tyrosine von FC haben keinen Einfluss auf die Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung durch FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.

A. SRC phosphoryliert FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hFC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴, V5.hFC^{3882-4074.Y3992F}, V5.hFC^{3882-4074.Y4009F} oder V5.hFC^{3882-4074.Y3992,Y4009F} und mit F9.hSRC (WT) oder F9.hSRC^{K298M} (KD, kinase dead, SRC Variante ohne Kinaseaktivität) transient transfiziert. Es wurde eine Immunopräzipitation mit einem Anti-V5 Antikörper und daran bindenden Protein G Sepharose Beads durchgeführt. Die Western Blot Analyse zeigt eine Abhängigkeit der Phosphorylierung von V5.hFC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ von der Kinaseaktivität von F9.hSRC. In der Anti-pY99 Färbung zeigt sich eine Bande, wenn das Tyrosin 3992 von V5.hFC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ vorhanden ist, wie es bei V5.hFC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ (Spur 1, mit * markiert) und V5.hFC^{3882-4074.Y4009F} (Spur 5, mit * markiert) der Fall ist. Diese Bande verschwindet, sobald die Mutation des Tyrosins zu Phenylalanin entweder in Form der Einzelmutanten V5.hFC^{3882-4074.Y3992F} (Spur 3) oder der Doppelmutanten V5.hFC^{3882-4074.Y3992,4009F} (Spur 5) vorliegt. V5.hFC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ sowie die mutierten Formen wurden im pcDNA6 Vektor nach Entfernung der TEV-Sequenz verwendet. Die Lysate zeigen in der Anti-V5 Färbung gleichmäßige Proteinlevel aller Varianten von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴. F9.hSRC ist mittels monoklonalem Anti-Flag Antikörper in allen Lysaten nachweisbar (n= 3).

B. Die Mutationen der Tyrosine haben keinen Einfluss auf die Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung durch FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴. Dargestellt ist der Einfluss der Expression von F9.hSRC allein und in Kombination mit V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag sowie mit den Varianten V5.hFC^{3472-4074.Y3992F}.Flag, V5.hFC^{3472-4074.Y4009F}.Flag oder V5.hFC^{3472-4074.Y3992,Y4009F}.Flag auf die Aktivität von STAT3. Diese wurde anhand der Reportergene der Luciferasen aus Firefly und Renilla im Rahmen des Luciferase Reporter Assays gemessen. Punkt 6 zeigt die bekannte STAT3 Aktivierung durch Expression von F9.hSRC. Punkt 7 stellt die Abschwächung dieser Aktivierung durch Koexpression von V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag dar. Die Punkte 8 bis 10 zeigen, dass dieser Effekt durch die Mutationen der Tyrosine von V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag unbeeinflusst bleibt. Der Fehlerbalken gibt den mittleren Standardfehler an (n= 5).

4.2 Funktion von DZIP1L im SRC-STAT3-Signalweg bei der molekularen Pathogenese der ARPKD

4.2.1. STAT3 und SRC koprizipitieren mit DZIP1L

Auf Grund der Identifizierung von *DZIP1L* als neues ursächliches Gen der ARPKD⁵, war es interessant, auch *DZIP1L* im Zusammenhang mit dem SRC-STAT3-Signalweg zu untersuchen. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L oder V5.hEPS¹⁻²²⁵ und F9.hSTAT3 transient transfiziert. Bei der Immunopräzipitation von V5.hDZIP1L über einen Anti-V5 Antikörper und Protein G Beads ist die Koprizipitation von F9.hSTAT3 in der Anti-Flag Färbung der Präzipitate in der Western Blot Analyse nachweisbar (Abb. 2A).

Im nächsten Schritt wurde *DZIP1L* in Bezug zur Tyrosinkinase SRC untersucht. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L oder mit V5.hEPS¹⁻²²⁵ und F9.hSRC transient transfiziert. Es erfolgte erneut die Immunopräzipitation von V5.hDZIP1L über einen Anti-V5 Antikörper und Protein G Beads. In der Western Blot Analyse lässt sich die Koprizipitation von F9.hSRC mit V5.hDZIP1L in der Anti-Flag Färbung der Präzipitate nachweisen (Abb. 2B).

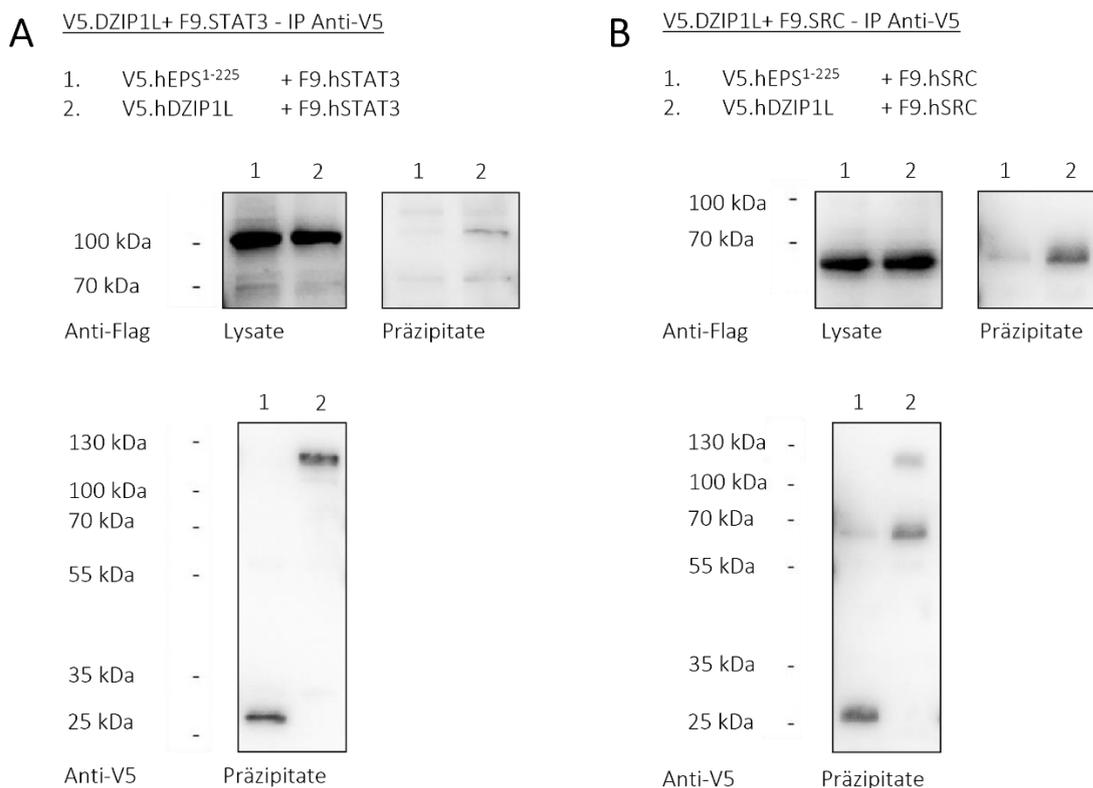


Abbildung 2 DZIP1L bildet Proteinkomplexe mit STAT3 und SRC.

A. STAT3 koprizipitiert mit DZIP1L. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L oder V5.hEPS¹⁻²²⁵ und F9.hSTAT3 transient transfiziert. In der Western Blot Analyse sind in den Lysaten mittels monoklonalem Anti-Flag Antikörper gleichmäßige Proteinlevel von F9.hSTAT3 nachweisbar. Die Immunopräzipitation über einen Anti-V5 Antikörper und daran bindende Protein G Beads zeigt in der Anti-Flag Färbung der Präzipitate die Koprizipitation von

F9.hSTAT3 mit V5.hDZIP1L. Die Anti-V5 Färbung der Präzipitate bestätigt die erfolgreiche Präzipitation von V5.hDZIP1L (n= 4).

B. SRC kopräzipitiert mit DZIP1L. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L oder V5.hEPS¹⁻²²⁵ und F9.hSRC transient transfiziert. In der Western Blot Analyse sind in den Lysaten mittels monoklonalem Anti-Flag Antikörper gleichmäßige Proteinlevel von F9.hSRC nachweisbar. Die Immunopräzipitation über einen Anti-V5 Antikörper und daran bindende Protein G Beads zeigt in der Anti-Flag Färbung der Präzipitate die Kopräzipitation von F9.hSRC mit V5.hDZIP1L. Die Anti-V5 Färbung der Präzipitate bestätigt die erfolgreiche Präzipitation von V5.hDZIP1L (n= 4).

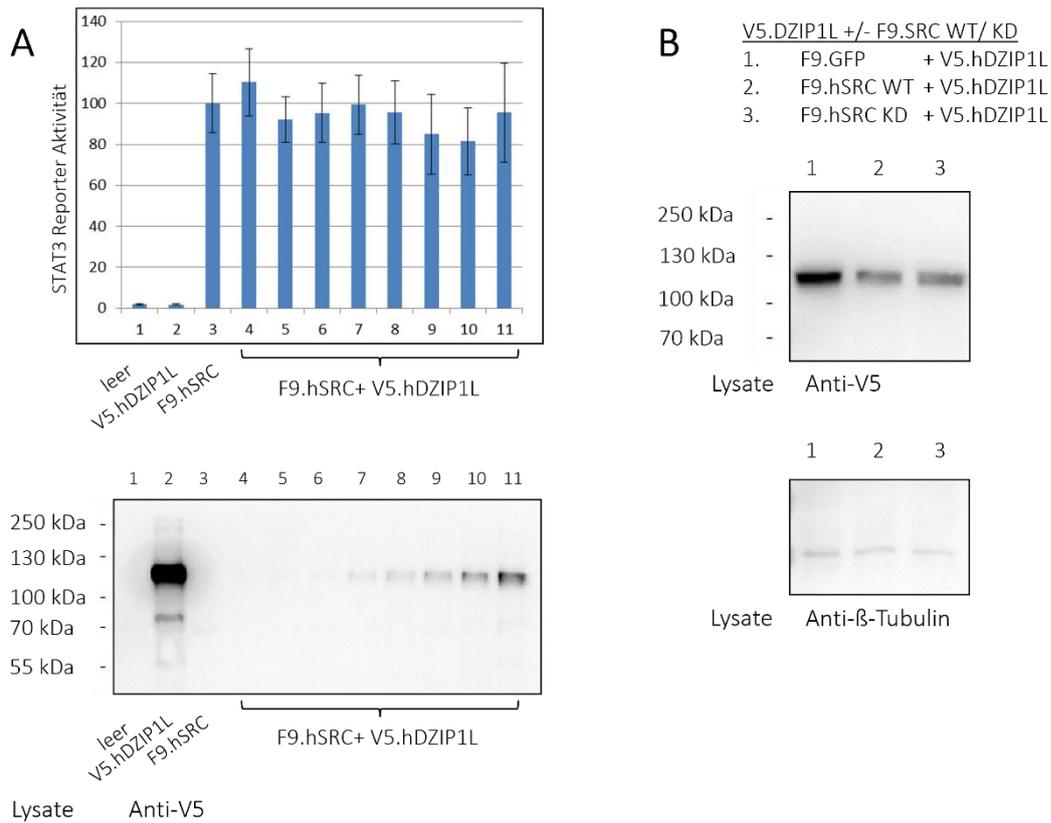
4.2.2. SRC Expression oder mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ Expression vermindern die DZIP1L Expression- dabei zeigt sich ein additiver Effekt

Zur Untersuchung eines möglichen funktionellen Zusammenhangs zwischen DZIP1L und der Tyrosinkinase SRC sowie dem Transkriptionsfaktor STAT3 wurde ein STAT3 Luciferase Reporter Assay verwendet. Als Kontrolle wurden HEK293T-Zellen mit einem Leervektor transfiziert. SRC und DZIP1L wurden jeweils einzeln exprimiert. Zusätzlich wurde SRC in Kombination mit DZIP1L in aufsteigender Konzentration transfiziert.

Im Luciferase Assay zeigt die Expression von DZIP1L keinen Effekt auf die Aktivierung von STAT3 durch SRC (Abb. 3A). Der aktivierende Effekt von SRC bleibt in allen getesteten Konzentrationen unbeeinflusst.

Die Western Blot Analyse der Lysate zeigt eine Auffälligkeit in der DZIP1L Expression. Die aufsteigende Konzentration von 1 bis 105 ng ist in der Anti-V5 Färbung sichtbar. Allerdings ist eine deutlich niedrigere Expression von DZIP1L in Anwesenheit von SRC erkennbar (Abb. 3A). Die Maximalkonzentration von 105 ng wurde sowohl bei Transfektion von DZIP1L und SRC (Spur 11) als auch bei alleiniger Transfektion von DZIP1L (Spur 2) verwendet. Dennoch zeigt sich in Anwesenheit von SRC eine Abschwächung des Proteinlevels von DZIP1L (Spur 11). Zur Untersuchung der Bedeutung der Kinaseaktivität von SRC für den Effekt auf das Expressionslevel von DZIP1L wurde DZIP1L in Kombination mit SRC WT (Wildtyp) oder SRC KD (kinase dead, ohne Kinasefunktion) transient transfiziert. In beiden Fällen zeigt sich im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollprotein GFP eine Verminderung der DZIP1L Expression (Abb. 3B). Der Effekt von SRC bleibt durch den Verlust der Kinaseaktivität unbeeinflusst.

Nach dem Nachweis des regulierenden Effekts der SRC Expression auf die Expression von DZIP1L wurde ermittelt, ob auch andere Proteine Einfluss auf die Expression von DZIP1L haben. Hierzu wurden erneut HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transient transfiziert. Die Western Blot Analyse zeigt auch bei zusätzlicher Expression des membrangebundenen C-terminalen Teils von FC (mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴) eine Verminderung des Proteinlevels von DZIP1L. Bei gleichzeitiger Expression von SRC und mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ ist ein additiver Effekt in der Verminderung der DZIP1L Expression zu beobachten. Als Kontrolle diente erneut GFP, wobei keine Regulation der DZIP1L Expression sichtbar ist (Abb. 3C).



Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
DZIP1L [ng]	0	105	0	1	15	30	45	60	75	90	105

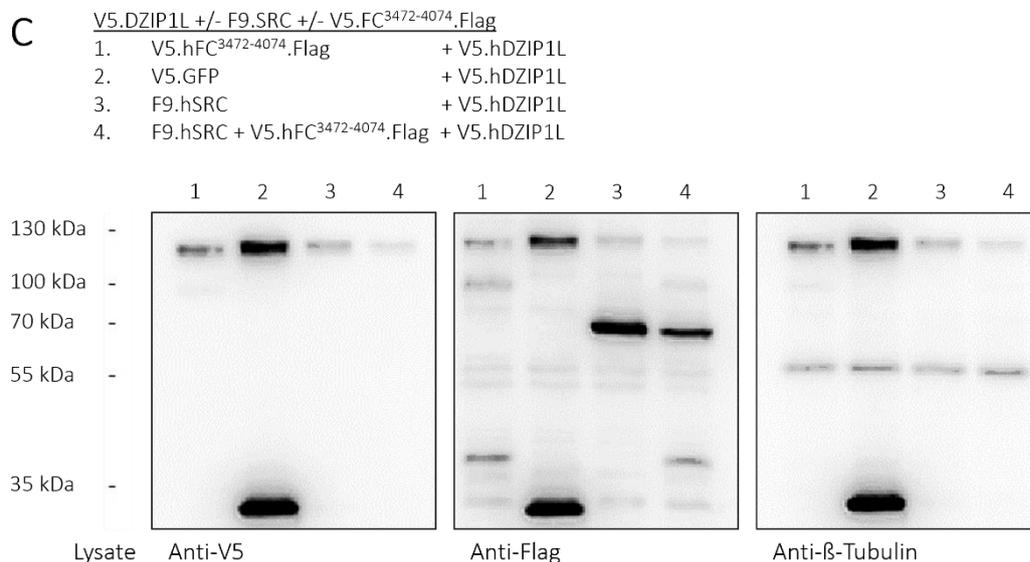


Abbildung 3 DZIP1L hat keinen Effekt im STAT3 Luciferase Assay. SRC Expression vermindert die DZIP1L Expression unabhängig von der Kinaseaktivität. SRC Expression oder mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ Expression vermindern die DZIP1L Expression- dabei zeigt sich ein additiver Effekt.

A. DZIP1L hat keinen Effekt im STAT3 Luciferase Assay. HEK293T-Zellen wurden mit F9.hSRC unter Verwendung eines Mastermixes gemeinsam mit V5.hDZIP1L in aufsteigender Konzentration (1-105 ng, siehe Tabelle) und mit dem STAT3 Reporterplasmid transient transfiziert. Der Luciferase Reporter Assay zeigt, dass die

SRC induzierte STAT3 Aktivierung durch V5.hDZIP1L unbeeinflusst bleibt. Die Western Blot Analyse bestätigt in der Anti-V5 Färbung der Lysate die Expression von V5.hDZIP1L in aufsteigender Konzentration. Trotz Transfektion von V5.hDZIP1L in Maximalkonzentration von 105 ng zeigt sich in Anwesenheit von F9.hSRC ein erniedrigtes Expressionslevel von V5.hDZIP1L (Spur 11) im Vergleich zu alleiniger Transfektion von V5.hDZIP1L in Maximalkonzentration von 105 ng (Spur 2) (n= 4).

B. SRC Expression vermindert die DZIP1L Expression unabhängig von der Kinaseaktivität. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L in Kombination mit F9.hSRC WT (Wildtyp) oder F9.hSRC^{K298M} (KD, kinase dead) ohne Kinasefunktion transfiziert. V5.GFP diente als Kontrolle. In der Western Blot Analyse zeigt die Anti-V5 Färbung der Lysate eine Verminderung der V5.hDZIP1L Expression in Anwesenheit von F9.hSRC WT oder F9.hSRC KD. Dieser Effekt ist unabhängig von der Kinaseaktivität von F9.hSRC. In der Anti-β-Tubulin Färbung sind gleichmäßige Proteinlevel erkennbar (n= 3).

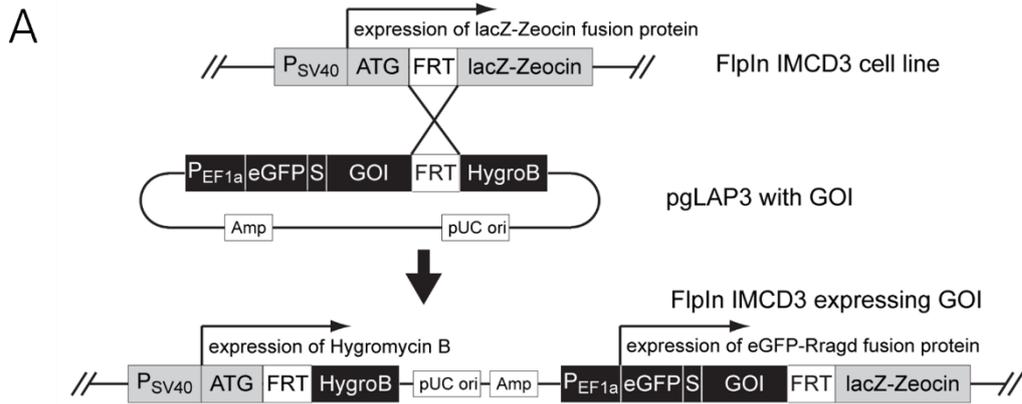
C. SRC Expression oder mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ Expression vermindern die DZIP1L Expression- dabei zeigt sich ein additiver Effekt. HEK293T-Zellen wurden mit V5.hDZIP1L in Kombination mit V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag oder F9.hSRC WT oder mit V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag und F9.hSRC WT transfiziert. V5.GFP diente als Kontrolle. In der Western Blot Analyse zeigt die Anti-V5 Färbung der Lysate eine Verminderung der Expression von V5.hDZIP1L in Anwesenheit von V5.hFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴.Flag (Spur 1) oder F9.hSRC WT (Spur 3). Bei gleichzeitiger Transfektion beider Plasmide mit V5.hDZIP1L ist eine maximale Verminderung der Expression von V5.hDZIP1L erkennbar (Spur 4). Die Anti-Flag Färbung der Lysate bestätigt die Expression der transfizierten Plasmide. In der Anti-β-Tubulin Färbung der Lysate sind gleichmäßige Proteinlevel sichtbar (n= 3).

4.3 Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD

4.3.1. Erstellung stabiler IMCD Flp-In Zelllinien mit Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP

Zur Untersuchung der Variante Serin 76 Leucin in RRAGD als Ursache der ADKH-RRAGD wurde *Rragd* zunächst durch etablierte Klonierungstechniken aus murinem neuronalem Gewebe kloniert. Durch gezielte Mutagenese wurde die Punktmutation Serin 75 Leucin als Äquivalent zur humanen Mutation Serin 76 Leucin⁹ eingefügt. Über die Integration in die entsprechenden Vektoren erfolgte die Generierung von drei Flp-In Sammelrohrephithelzelllinien mit jeweils GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP in stabiler Expression nach dem zuvor angeführten Verfahren (siehe 3.2.9.).

Zur Überprüfung der erfolgreichen Integration und stabilen Expression des zu untersuchenden Gens wurden Lysate ganzer Zellen der Zelllinien erstellt und in der Western Blot Analyse dargestellt. Die Anti-GFP Färbung der Lysate zeigt jeweils die Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP (Abb. 4).



- B** Flp-In Zelllinie
1. GFP.mRragd WT
 2. GFP.mRragd S75L
 3. GFP.GFP

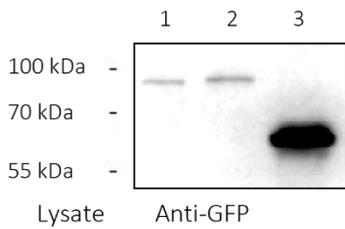


Abbildung 4 Erstellung von IMCD Flp-In Zelllinien mit GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP in stabiler Expression.

A. Schematische Darstellung der Generierung der Flp-In Zelllinien mit stabiler genomischer Integration von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP. Ein pgLap3/FRT beziehungsweise pgLap5/FRT Expressionsvektor, der GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP als gene of interest (GOI) enthielt, wurde mit Hilfe der Flp Rekombinase vermittelten DNA-Rekombination über die FRT-Stellen in das Genom der IMCD Flp-In Zelllinien integriert. Es entstand jeweils eine Flp-In-Zelllinie mit Hygromycinresistenz und stabiler Expression des zu untersuchenden Gens. Quelle: Schlingmann et al., 2021⁹. Mit freundlicher Genehmigung von JASN (Journal of the American Society of Nephrology).

B. Die IMCD Flp-In Zelllinien exprimieren GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP. Es wurden Lysate ganzer Zellen der drei IMCD Flp-In Zelllinien mit GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP in stabiler Expression angefertigt. In der Western Blot Analyse zeigt die Anti-GFP Färbung der Lysate die Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP auf Proteinebene.

Nach Bestätigung der Expression in der Western Blot Analyse wurden alle drei Zelllinien zur Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L auf Deckgläschen kultiviert. Das GFP Signal von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L und GFP.GFP wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops detektiert. Es ist eine hauptsächlich perinukleäre Lokalisation von GFP.mRragd WT mit Anreicherung in vesikulären Strukturen erkennbar. Bezüglich der Lokalisation zeigt sich ein ähnliches Muster für GFP.mRragd S75L. Hierbei wird eine Aussparung des Zellkerns deutlich. Dennoch ist insgesamt eine hohe

Übereinstimmung zwischen den beiden Zelllinien zu erkennen (Abb. 5). Die Zelllinie mit GFP.GFP in stabiler Expression diente als Kontrolle und bestätigte die Spezifität des GFP Signals von GFP.mRragd WT beziehungsweise GFP.mRragd S75L (hier nicht dargestellt).

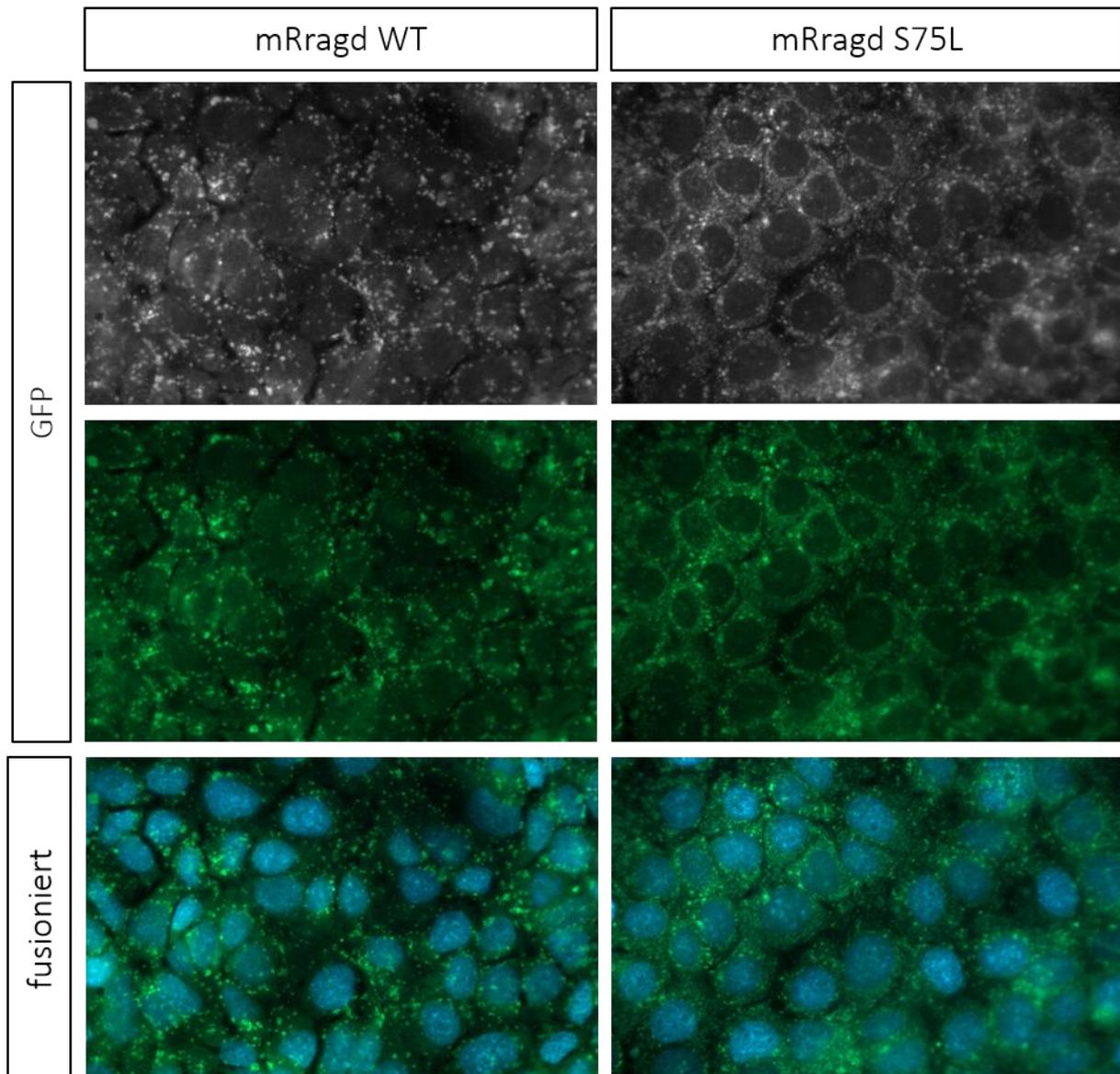


Abbildung 5 Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen GFP.mRragd WT oder GFP.mRragd S75L in stabiler Expression.

Die Zellen der IMCD Flp-In Zelllinien wurden auf Objektträgern in Prolong Diamond mit DAPI (blau) eingebettet. Das fluoreszierende GFP Signal (grün) zeigt eine hauptsächlich perinukleäre Lokalisation von GFP.mRragd WT mit Anreicherung in vesikulären Strukturen. Bei GFP.mRragd S75L ergibt sich bezüglich der Lokalisation ein ähnliches Muster. Hierbei ist eine Aussparung des Zellkerns erkennbar. Darstellung in 63-facher Vergrößerung.

4.3.2. Kolokalisation von mRragd WT und mRragd S75L mit mTor und phospho-mTor in IMCD Flp-In Zelllinien

Auf Grund der Beteiligung von RagD am mTor-Signalweg wurde die Lokalisation der exogen exprimierten Proteine der Zelllinien in Bezug zu Bestandteilen des mTor Komplexes untersucht. Hierzu wurden mTor sowie mTor in phosphorylierter Form (pmTor, phospho-mTor Ser2448) nach dem Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung über die entsprechenden Antikörper angefärbt. In den Anti-mTor Färbungen ist eine Kolokalisation von mTor und GFP.mRragd WT sowie GFP.mRragd S75L erkennbar. Die Anti-phospho-mTor Färbungen zeigen ebenfalls eine Kolokalisation von phospho-mTor und GFP.mRragd WT sowie GFP.mRragd S75L (Abb. 6). Zur Untersuchung des Einflusses der Aminosäureverfügbarkeit auf die Kolokalisationen wurden die Immunfluoreszenzfärbungen zusätzlich unter Verwendung von Zellen durchgeführt, welche für 24 Stunden in Nährmedium ohne Zugabe von fetalem Kälberserum (FBS) kultiviert wurden. Die Abwesenheit von FBS zeigte keinen Einfluss auf die Kolokalisation von mTor oder phospho-mTor und GFP.mRragd WT beziehungsweise GFP.mRragd S75L (hier nicht dargestellt).

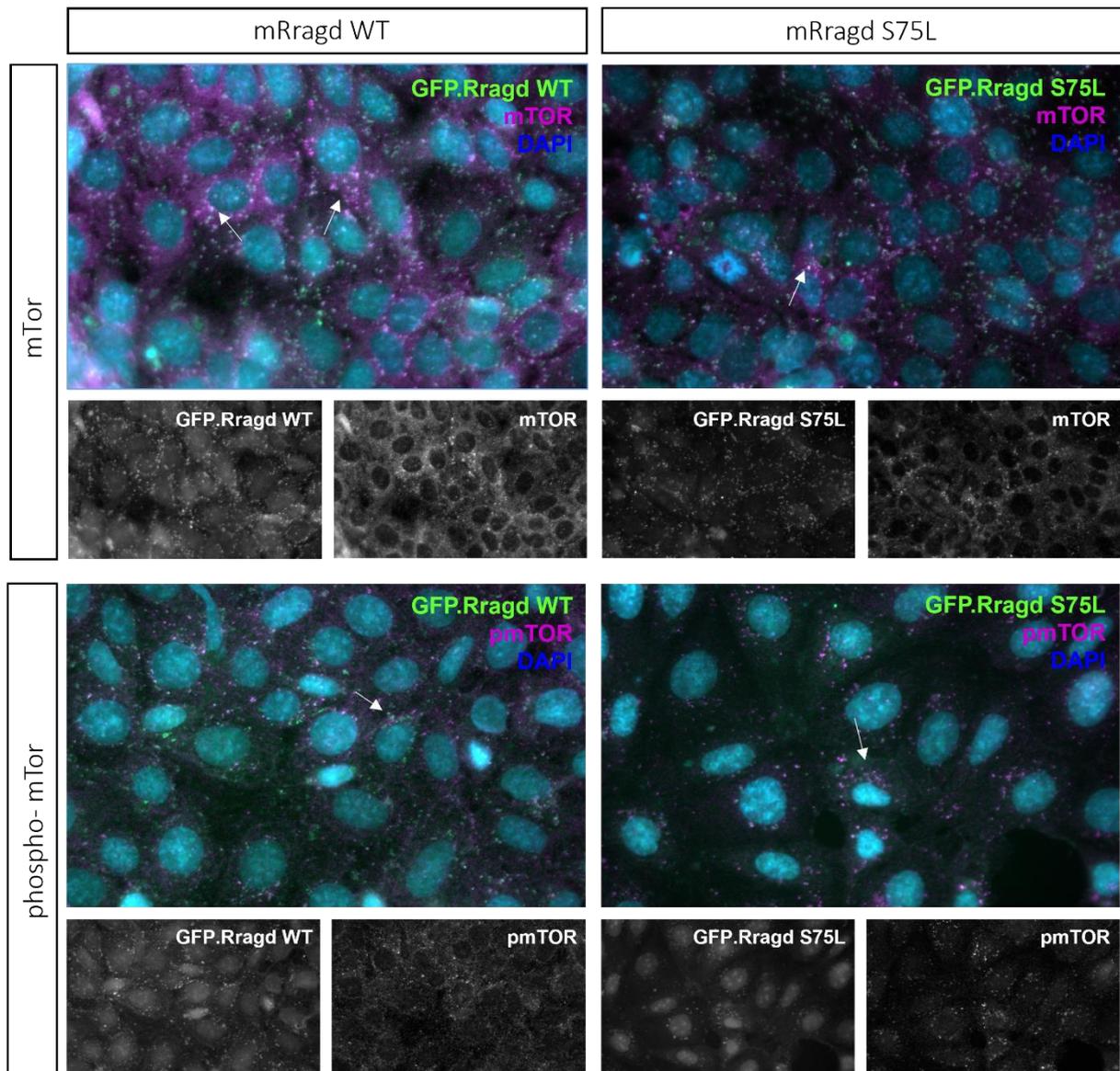


Abbildung 6 Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen eine Kolokalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L mit mTor und mTor in phosphorylierter Form.

Die Zellen der IMCD Flp-In Zelllinien wurden auf Objektträgern in Prolong Diamond mit DAPI (blau) eingebettet. Mtor und phospho-mTor (pmTor, phospho-mTor Ser2448) wurden nach dem Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung über entsprechende Antikörper angefärbt (magenta). Die Anti-mTor Färbung zeigt eine Kolokalisation von mTor und GFP.mRragd WT sowie GFP.mRragd S75L. Die Anti-phospho-mTor Färbung zeigt ebenfalls eine Kolokalisation von phospho-mTor und GFP.mRragd WT sowie GFP.mRragd S75L. Darstellung in 63-facher Vergrößerung.

4.3.3. mRragd S75L zeigt eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie Komponenten der V-ATPase und von Ragulator

Die Interaktomanalyse durch markierungsfreie quantitative Proteomik diente dem weiteren molekularen Verständnis der bei Varianten von *RRAGD* vermuteten aberranten mTorC1 Aktivierung. Diese gilt als grundlegender Pathomechanismus der ADKH-RRAGD⁹. GFP.GFP, GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L wurden nach dem in 3.2.5. beschriebenen Protokoll über einen Anti-GFP Antikörper und daran gebundene paramagnetische MicroBeads immunopräzipitiert. Die Proben der Zelllinie GFP.GFP dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die kopräzipitierten Proteine durch Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie in der Proteomics Facility des Kölner Exzellenzclusters CECAD identifiziert. Die hierarchische Clusterung der Proteinintensitäten aus dem Datensatz zeigt in sieben unabhängigen Experimenten eine für GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT signifikant erhöhte Anreicherung verschiedener Proteine, welche zum Teil Beteiligung am mTor-Signalweg aufweisen (Abb. 7).

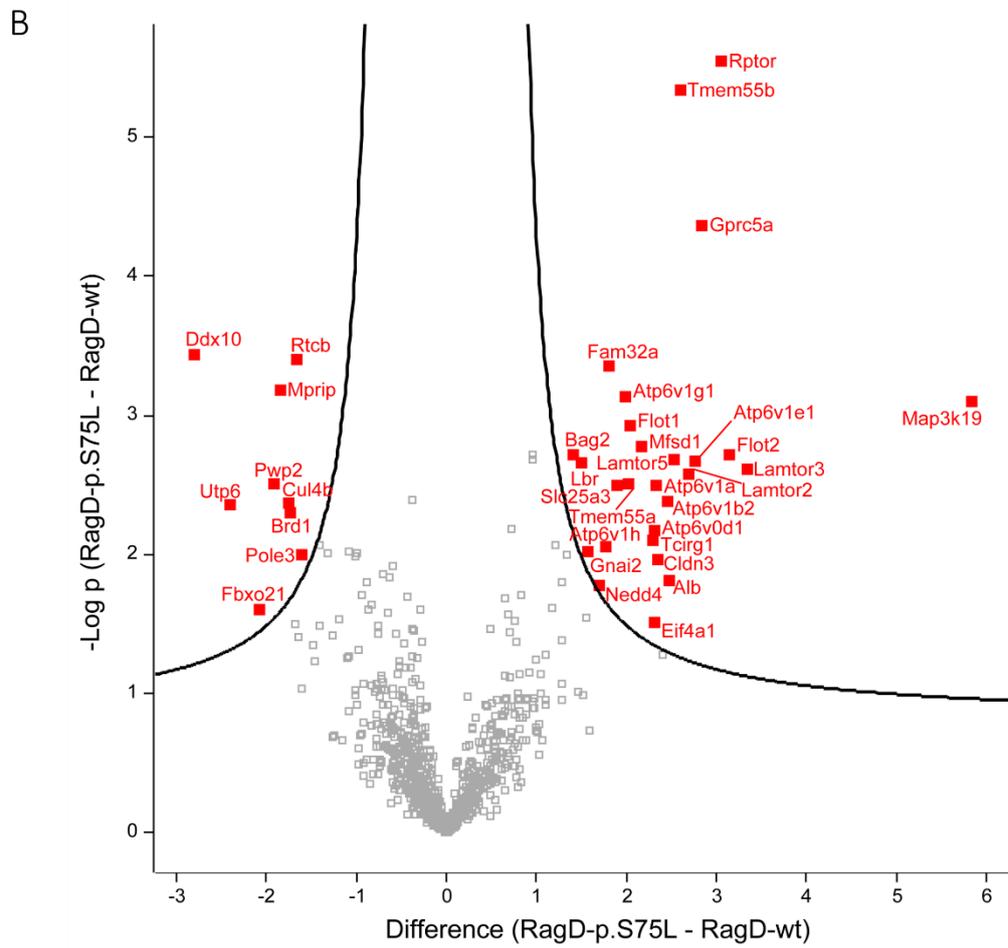
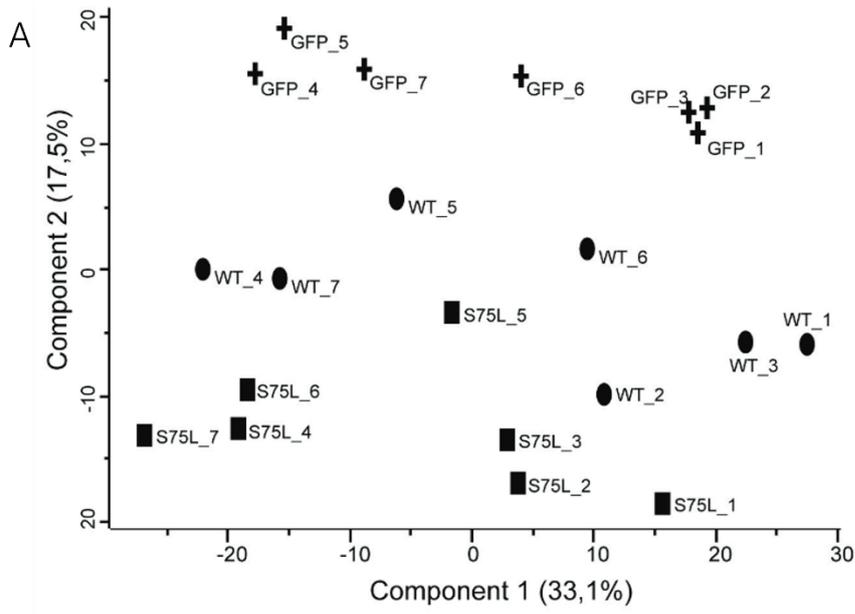
Die Hauptkomponentenanalyse stellt die Proben in den zwei relevantesten Variablen dar und dient als Qualitätskontrolle des Datensatzes. Bei Auftragung der Hauptkomponente 1 gegen die Hauptkomponente 2 lässt sich eine Gruppierung der Proben der Zelllinie GFP.GFP einerseits und Proben der Zelllinien GFP.mRragd S75L oder GFP.mRragd WT andererseits erkennen (Abb. 7A).

Der Volcano Plot vergleicht die Interaktome von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L. Dabei wird die Signifikanz (p-Wert) gegen die Differenz zwischen GFP.mRragd S75L und GFP.mRragd WT aufgetragen. Punkte jenseits der gebogenen Linie stellen Proteine mit einer signifikanten Anreicherung in GFP.mRragd S75L (rechts) oder GFP.mRragd WT (links) dar (Abb. 7B). Die Auswertung zeigt bei GFP.mRragd S75L eine im Vergleich zu GFP.mRragd WT signifikant erhöhte Anreicherung verschiedener Untereinheiten der V_1 Domäne der V-ATPase. Darin enthalten sind Atp6v1e1 und Atp6v1a, welche an der katalytischen Funktion beteiligt sind¹⁰³ sowie Atp6v1b2 als Isoform der Untereinheit B^{104 105}. Des Weiteren finden sich mit Atp6v0d1 eine Untereinheit des integralen Membrankomplexes V_0 ^{104 106} und mit Tcirg1 eine essenzielle Komponente der V-ATPase^{107 108}. Neben den zuvor beschriebenen Komponenten der V-ATPase zeigt GFP.mRragd S75L eine signifikant erhöhte Anreicherung von Lamtor 2, Lamtor 3 und Lamtor 5 als Teile des Ragulator Komplexes. Zudem ist eine Anreicherung des Gerüstproteins regulatory-associated protein of mTor (Raptor), welches mTorC1 zugerechnet wird, zu finden (Abb. 7C).

Ausgewählte Proteine mit signifikant erhöhter Anreicherung bei GFP.mRragd S75L lassen sich mit Hilfe der Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins (STRING) Analyse

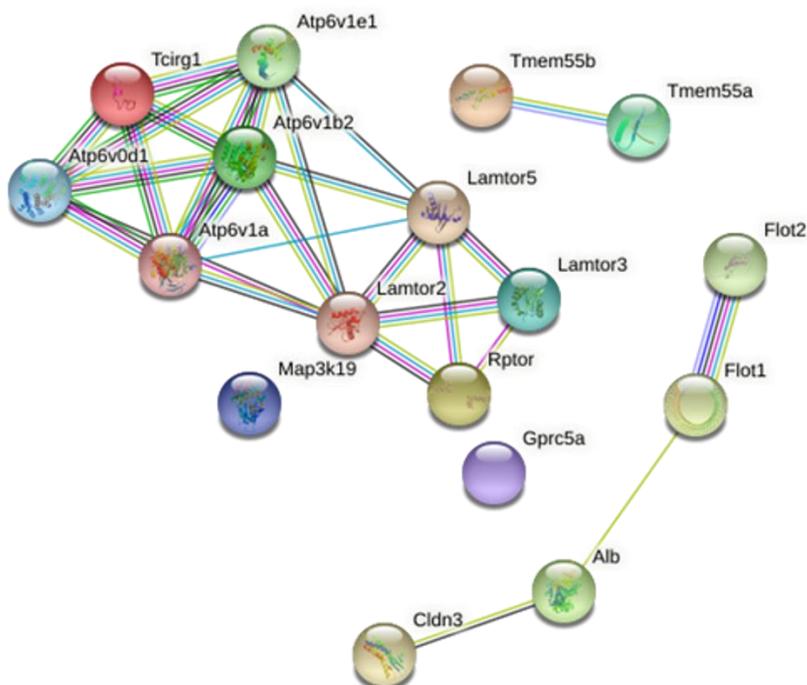
darstellen (Abb. 7D). STRING bietet als bioinformatische Datenbank Hinweise auf bekannte, vermutete und mögliche Interaktionen, welche in Form der Verbindungslinien visualisiert werden, und ermöglicht somit Rückschlüsse auf potenziell funktionelle Zusammenhänge zwischen den in Proben der Zelllinie GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT signifikant vermehrt kopräzipitierten Proteinen^{88,87}. Die Veranschaulichung legt ein mögliches funktionelles Zusammenspiel nahe.

Hinweise auf funktionelle Eigenschaften der bei Immunopräzipitation von GFP.mRragd S75L signifikant vermehrt angereicherten Proteine bietet die Gene Ontology (GO) Datenbank, welche die drei Bereiche zelluläre Komponente, biologischer Prozess und molekulare Funktion einbezieht. Die biologische Datenbank erlaubt unter Nutzung entsprechender Algorithmen eine Interpretation im funktionellen Kontext^{109,110,111}. Die hier zusätzlich verwendete Analyse mittels Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Datenbank ermöglicht Rückschlüsse auf Beteiligung an bestimmten biologischen Prozessen¹¹²⁻¹¹⁴. Sie ergibt unter anderem eine signifikant erhöhte Anreicherung von Proteinen des mTor-Signalwegs im Datensatz von GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT (Abb. 7E).



Protein	Gen	Unterschied
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 19	Map3k19	5.8385
Ragulator complex protein LAMTOR3	Lamtor3	3.3500
Flotillin-2	Flot2	3.1498
Regulatory-associated protein of mTOR	Rptor	3.0583
Retinoic acid-induced protein 3	Gprc5a	2.8338
V-type proton ATPase subunit E 1	Atp6v1e1	2.7697
Ragulator complex protein LAMTOR2	Lamtor2	2.6929
Type 1 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase	Tmem55b	2.5940
Ragulator complex protein LAMTOR5	Lamtor5	2.5223
Serum albumin	Alb	2.4787
V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	Atp6v1b2	2.4520
Claudin-3	Cldn3	2.3405
V-type proton ATPase catalytic subunit A	Atp6v1a	2.3375
V-type proton ATPase subunit d 1	Atp6v0d1	2.3149
Eukaryotic initiation factor 4A-I;Eukaryotic initiation factor 4A-II;Eukaryotic initiation factor 4A-II, N-terminally processed	Eif4a1;Eif4a2	2.3109
V-type proton ATPase subunit a	Tcirg1	2.3028
Major facilitator superfamily domain-containing protein 1	Mfsd1	2.1601
Flotillin-1	Flot1	2.0361
Type 2 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 4-phosphatase	Tmem55a	2.0265
V-type proton ATPase subunit G 1	Atp6v1g1	1.9777

D



E

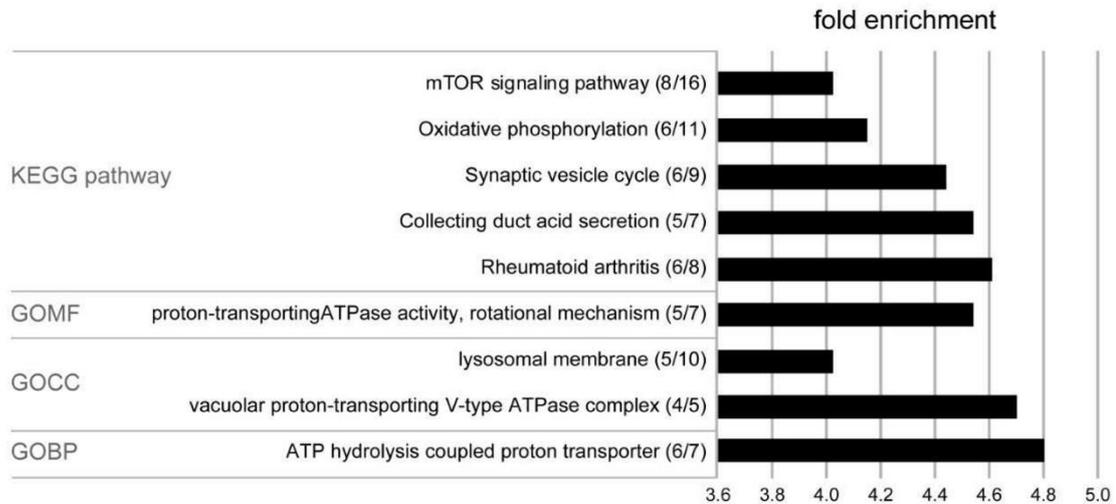


Abbildung 7 Die Proben der Zelllinie GFP.mRragd S75L zeigen eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie Komponenten des V-ATPase und des Regulator Komplexes.

A. Die Hauptkomponentenanalyse zeigt eine Gruppierung der Proben der Zelllinien. Bei Auftragung der Hauptkomponente 1 auf der x-Achse gegen die Hauptkomponente 2 auf der y-Achse wird eine Gruppierung der Proben der Zelllinie GFP.GFP einerseits und Proben der Zelllinien GFP.mRragd S75L oder GFP.mRragd WT andererseits sichtbar (n= 7).

B. Vulcano Plot des Interaktoms der Zelllinie GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT. GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L und GFP.GFP wurden über einen Anti-GFP Antikörper und daran bindende MicroBeads immunopräzipitiert. Es folgte eine Analyse mittels markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (label-free quantitative Proteomics). Der Vulcano Plot zeigt die Unterschiede zwischen GFP.mRragd S75L und GFP.mRragd WT. In der Darstellung wurde die Stärke der Differenz (Fold Change, log₂ Skala) auf der x-Achse gegen die Signifikanz der Unterschiede in der Proteinanreicherung in Form des p-Werts (-log₁₀ Skala) auf der y-Achse aufgetragen. Die Punkte oberhalb der kurvigen Linien repräsentieren Proteine mit signifikant veränderter Anreicherung (false discovery rate (FDR)= 0,1, s₀= 0,5) in den Proben der Zelllinie GFP.mRragd S75L (rechts) im Vergleich zu Proben der Zelllinie GFP.mRragd WT (links) (n=7).

C. Tabellarische Auflistung der Proteine mit signifikant erhöhter Anreicherung in GFP.mRragd S75L. Die Spalte „Unterschied“ gibt die Stärke der Differenz (Fold Change, log₂ Skala) an.

D. Grafische Darstellung ausgewählter Komponenten mit signifikant erhöhter Anreicherung in Proben der Zelllinie GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT. Mittels STRING Analyse sind ausgewählte Proteine abgebildet, welche eine signifikant erhöhte Anreicherung im Ko-Präzipitat von GFP.mRragd S75L zeigen. Die farblichen Verbindungen geben Hinweise auf bekannte Interaktionen (hellblau= from curated database, pink= experimentally determined), vorhergesagte Interaktionen (grün= gene neighborhood, rot= gene fusions, blau= gene co-occurrence) und weitere mögliche Interaktionen, beruhend auf Proteinhomologie (flieder), Koexpression (schwarz) und Daten aus Textquellen (text mining, gelb) ^{88 87}.

E. Visualisierung der Zuordnung signifikant angereicherter Proteine im Ko-Präzipitat von GFP.mRragd S75L zu GO-Begriffen und KEGG-Signalwegen. KEGG= Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, GOMF= GO molecular function, GOCC= GO cellular component, GOBP= GO biological process ¹⁰⁹⁻¹¹¹. In Klammern ist an erster Stelle die Anzahl der im Ko-Präzipitat von GFP.mRragd S75L angereicherten Proteine angegeben, die mit einem oder mehreren Pfaden im KEGG-Signalweg verknüpft wurden (analog für GOMF, GOCC, GOBP), während an zweiter Stelle die Gesamtzahl der aus dem jeweiligen Signalweg identifizierten Proteine erscheint.

5. Diskussion

Die klinische Manifestation der heterogenen Gruppe genetisch bedingter Nierenerkrankungen ist variabel¹⁴. Kongenitale Anomalien der Nieren und der Harnwege, das steroidresistente nephrotische Syndrom, die chronische Glomerulonephritis, darunter Lupus-Nephritis und Alport Syndrom, und renale zystische Ziliopathien zählen zu den häufigsten Ursachen einer chronischen Nierenerkrankung mit Manifestation vor dem 25. Lebensjahr^{115 116}. Bei diesen Erkrankungsgruppen lässt sich in circa 20% der Fälle eine monogenetische Ursache nachweisen¹¹⁵. Im Erwachsenenalter sind 10% bis 15% der Fälle von Nierenersatztherapie durch genetische Nierenerkrankungen bedingt¹¹⁷. Die Erforschung molekularer Pathomechanismen genetischer Nierenerkrankungen bietet großes Potential für die Entwicklung zielgerichteter Therapien mit Ansatz an spezifischen zellulären Signalwegen.

5.1 Die Rolle von FC bei der Pathogenese der ARPKD

In Vorarbeiten unseres Labors wurde der STAT3-Signalweg in Zusammenhang mit der Pathogenese der ARPKD gebracht⁸. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des SRC-STAT3-Signalwegs für die Pathogenese der ARPKD auf verschiedene Weisen unterstrichen. Zum einen wurde die Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992 durch SRC nachgewiesen. Des Weiteren konnte mit DZIP1L ein weiteres ARPKD Protein mit diesem Signalweg in Verbindung gebracht werden. Varianten in *DZIP1L* wurden bei einzelnen Patienten mit einem ARPKD-Phänotyp nachgewiesen⁵. In dieser Arbeit wurden die Kopräzipitation von SRC und STAT3 mit DZIP1L sowie regulatorische Effekte von SRC und mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ auf die Expression von DZIP1L gezeigt.

5.1.1. SRC und FC stehen über die Phosphorylierung an Tyrosin 3992 in direkter Interaktion

Bei Betrachtung der Proteinstruktur des zytoplasmatischen Teils von FC (FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴) wurden die Tyrosine 3992 und 4009 als mögliches Ziel einer Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase SRC identifiziert. Durch gezielte Mutagenese wurden die Tyrosine von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ im Rahmen einer Punktmutation unabhängig voneinander jeweils durch Phenylalanin ersetzt und es entstanden die beiden Einzelmutanten FC^{3882-4074.Y3992F} und FC^{3882-4074.Y4009F} sowie die Doppelmutante FC^{3882-4074.Y3992,4009F}. In der Western Blot Analyse wurde über die Anti-pY99-Färbung das Tyrosin 3992 von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ als Phosphorylierungsstelle durch SRC identifiziert (Abb. 1A). Bei Mutation des Tyrosins 3992 von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ bleibt die Fähigkeit von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ zur Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung erhalten (Abb. 1B). Für die Hemmung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung durch Koexpression von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ scheint sie demnach nicht essenziell zu sein. Auch die in Vorarbeiten nachgewiesene Kopräzipitation von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ mit SRC blieb nach Mutation des Tyrosins 3992 von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ erhalten⁸. Für

zukünftige Versuche ist die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung von Tyrosin 3992 interessant.

Zur Untersuchung des Effekts der Mutation des Tyrosins 3992 von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ im Luciferase Assay wurde mit FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ eine FC Trunkation verwendet, welche neben dem zytoplasmatischen Teil das transmembranäre Segment sowie einen Teil der extrazellulären Domäne enthält, um posttranslationale Modifikation zu ermöglichen^{8 39 118}. FC unterliegt einem komplexen proteolytischen Prozess, welcher auf Grund der Ähnlichkeit zur posttranslationalen Modifikation des Transmembranrezeptors Notch als „Notch-like processing“ bezeichnet wird¹¹⁸. Der evolutionär konservierte Notch-Signalweg dient interzellulärer Kommunikation und ist von besonderer Bedeutung für Organentwicklung und Zelldifferenzierung. Mit Notch1, Notch2, Notch3 und Notch4 liegen bei Säugetieren vier Paraloge des Notch Proteins vor^{119 120}.

Analog zu Notch führt die posttranslationale Prozessierung von FC zur Entstehung mehrerer Proteinfragmente mit unterschiedlichen Funktionen. Kaimori et al. zeigten, dass bei FC durch Proteolyse (cleavage) eine große extrazelluläre Domäne sowie ein C-terminaler Teil entstehen, die über Disulfidbrücken verbunden sind und am primären Zilium lokalisieren. Durch eine Protease der Metalloprotease Familie wird die extrazelluläre Domäne als Fragment abgespalten. Es folgt ein weiterer cleavage Schritt, welcher zur Freisetzung eines intrazellulären C-terminalen Fragments von FC führt¹¹⁸. Für dieses wurde eine Translokation zum Zellkern nachgewiesen^{118 39}. Kaimori et al. interpretieren FC als ziliäres Protein, das durch Freisetzung der extrazellulären Domäne sowie nukleäre Translokation des C-Terminus als bidirektionales Signalmolekül des Ziliums fungiert¹¹⁸. Die engen Parallelen zur Prozessierung von Notch bieten eine interessante Grundlage zur Interpretation der hier gezeigten Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Y3992 durch SRC. Im Folgenden werden fünf potenzielle Bedeutungen diskutiert.

1. Cleavage/ Freisetzung

Hiesberger et al. zeigten eine durch Proteinkinase C und intrazelluläre Calciumlevel bestehende Regulation des proteolytischen Prozesses, welcher in der Freisetzung des zytoplasmatischen C-Terminus von FC resultiert³⁹. Es ergibt sich die Hypothese, dass die Tyrosinphosphorylierung von cFC möglicherweise den cleavage Prozess lokal beeinflusst oder die Intramembranproteolyse mit nachfolgender Abspaltung ermöglicht. Zur Erfassung der cleavage Produkte etablierten Hiesberger et al. zusätzlich zur Western Blot Analyse einen Luciferase Assay, bei dem cleavage von cFC mit der Aktivität des Luciferase Reportergens korreliert³⁹. Analog dazu könnte unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten

Varianten von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ der Einfluss der Tyrosinphosphorylierung auf den cleavage Prozess untersucht werden.

2. Nukleäre Translokation

Die nukleäre Translokation des C-terminalen Teils von FC nach Proteolyse stellt nicht nur eine Parallele zu Notch dar. Auch andere Proteine wie PC1 unterliegen einer vergleichbaren Prozessierung³⁹. Hiesberger et al. identifizierten eine nukleäre Lokalisationssequenz im N-terminalen Teil des C-Terminus von FC. Das als Phosphorylierungsstelle identifizierte Tyrosin 3992 befindet sich nach dem Schema von Hiesberger et al. im zentralen Teil des C-terminalen Fragments³⁹. Dennoch wäre es möglich, dass die Phosphorylierung indirekt Einfluss auf die intrazelluläre Translokation des C-Terminus nimmt. An dieser Stelle ist die limitierte sequenzielle Übereinstimmung des humanen mit dem murinen C-Terminus zu beachten, welche möglicherweise die intrazelluläre Lokalisation beeinflusst³¹.

In humanen sowie in murinen Zellen könnte durch Überexpression von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ sowie der Varianten der funktionelle Einfluss der Mutation des Tyrosins 3992 auf die Lokalisation von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ und von Fragmenten untersucht werden. Hierzu könnte der zytoplasmatische Teil von FC über eine Epitop-Markierung oder direkt mittels entsprechender Antikörper in der Immunfluoreszenzfärbung dargestellt werden. Die Western Blot Analyse könnte über den Nachweis des C-Terminus von FC in der nukleären Fraktion ebenfalls Aufschluss über mutationsbedingte intrazelluläre Lokalisationsänderungen geben.

3. Transkriptionelle Aktivität

Der zytoplasmatische C-Terminus von Notch beeinflusst nach Translokation zum Zellkern die Transkription verschiedener Gene¹²¹. Interessanterweise konnten La Foya et al. eine Regulation dieser transkriptionellen Aktivität durch die Phosphorylierung spezifischer Tyrosine der intrazellulären Domäne von Notch1 durch Src nachweisen. Erhöhte Aktivität der Src Protein Tyrosinkinase Familie hemmt die transkriptionelle Aktivität des C-Terminus von Notch1¹²². Eine Unterbindung der Phosphorylierung durch Mutation der Tyrosine erhöht diese dagegen¹²². Dieser regulatorische Mechanismus in Form der Tyrosinphosphorylierung durch Src lässt sich möglicherweise auf cFC übertragen.

Die transkriptionelle Aktivität könnte anhand der Auswertung bekannter „Transkriptionsziele“ von cFC unter Verwendung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Varianten von cFC gezeigt werden. Hierbei ließe sich abgesehen von dem in dieser Arbeit untersuchten Transkriptionsfaktor STAT3 beispielsweise an MYC als Indikator der transkriptionellen Aktivität von cFC denken. Der Transkriptionsfaktor MYC unterliegt einem „feed forward“ Regulationsmechanismus durch Notch, worüber Notch das Zellwachstum kontrolliert¹²³. Interessanterweise wiesen Harafuji et al. kürzlich für den C-terminalen Teil von FC nach

nukleärer Translokation eine Bindung an den *MYC/ Myc* P1 Promoter sowie die Aktivierung der Expression von *MYC/ Myc* nach ³¹. Die zunächst widersprüchlich erscheinende Überexpression von *MYC* in Gewebeproben von ARPKD Patienten mit loss of function Mutation innerhalb des C-Terminus von FC reflektiert möglicherweise Unterschiede zwischen kontextabhängigen Regulationsmechanismen *in vivo* im Vergleich zu isolierten *in vitro* Assays bei Überexpression ³¹. Es wäre interessant zu erforschen, ob die Phosphorylierung von cFC durch SRC an Y3992 die cFC induzierte *MYC* Expression reguliert. Unter Verwendung der cFC Varianten könnte der Einfluss der Phosphorylierung von Y3392 durch SRC beispielsweise in Form eines Luciferase Assays untersucht werden.

4. Degradierung von cFC

Es fällt auf, dass sowohl für *MYC* als auch für den mTor-Signalweg eine Überaktivierung durch Überexpression von cFC beschrieben ist, welche eine Inhibition des Signalwegs durch full length FC antagonisiert ^{31 124}. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine quantitative Regulierung von cFC von besonderer Bedeutung ist. Die Phosphorylierung des intrazellulären Fragments von Notch1 durch verschiedene Kinasen induziert Ubiquitin abhängige Degradierung ¹²¹. Zudem gibt es Hinweise auf eine Regulation der Halbwertszeit des C-terminalen Teils von Notch1 durch Src Phosphorylierung ¹²². Kaimori et al. und Hiesberger et al. zeigten kurze Halbwertszeiten der intrazellulären cleavage Produkte von FC, was als Parallele zu Notch interpretiert wird ^{118 39}. Auch das C-terminale Fragment von PC1 (PC1-p30) unterliegt einer schnellen ubiquitinvermittelten proteasomalen Degradierung ¹²⁵.

In dieser Arbeit waren bei Überexpression in HEK293T-Zellen keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proteinleveln der Varianten von cFC erkennbar (Abb. 1). Dieser Befund schließt jedoch nicht aus, dass der Phosphorylierung von Y3992 eine Rolle bei der Kontrolle des Abbaus von cFC zukommt. Über Western Blot Analysen könnte unter Verwendung der erstellten FC Varianten eine mögliche Ubiquitinierung von cFC sowie der Einfluss von Proteasomeninhibitoren, SRC Inhibitoren und der Mutation von Y3392 auf die Halbwertszeit von cFC untersucht werden.

5. Interaktion

Des Weiteren ist es interessant, die Phosphorylierung des Tyrosins 3992 von cFC durch SRC im Kontext weiterer Proteininteraktionen zu betrachten.

Kaimori et al. zeigten, dass analog zu Notch das juxtamembranäre cleavage von FC, welches in Freisetzung der extrazellulären Domäne resultiert, durch ein Protein der ADAM Desintegrin und Metalloproteinase Familie erfolgt ¹¹⁸. Die anschließende Proteolyse zur Freisetzung des intrazellulären C-terminalen Fragments von FC scheint, ebenfalls analog zu Notch, von Gamma-Sekretase abhängig zu sein ¹¹⁸. In einer Dissertationsschrift konnte eine Interaktion

des C-Terminus von FC mit dem Gerüstprotein Receptor for activated C Kinase 1 (RACK1) und der Metalloprotease ADAM metallopeptidase domain 12 (ADAM12) nachgewiesen werden¹²⁶. Auch zwischen RACK1 und ADAM12 ist eine Interaktion bekannt¹²⁷, sodass eine stabilisierende Funktion von RACK1 für einen Komplex aus RACK1, ADAM12 und FC postuliert wird, welcher möglicherweise die Proteolyse von FC ermöglicht¹²⁶. Es wäre interessant, ob die Phosphorylierung von Y3992 von cFC für diese Interaktion von Bedeutung ist oder möglicherweise durch diese Interaktion moduliert wird, da ADAM12 als Regulator von Src identifiziert wurde^{128 129} und auch RACK1 und Src wechselseitige regulatorische Effekte zeigen^{130 131 132}.

Das ADPKD Protein Polyzystin 2 (PC2) wird als weiterer Interaktionspartner von FC diskutiert, wobei diesbezüglich widersprüchliche Ergebnisse vorliegen^{30 133 38}. Wu et al. konnten FC, PC2 und KIF3B, eine Motor Untereinheit von Kinesin-2, in einem Proteinkomplex nachweisen¹³⁴. Des Weiteren wurde eine funktionelle Modulation der Kanalaktivität von PC2 durch den C-Terminus von FC in Anwesenheit von KIF3B demonstriert¹³⁴. Eine Folgearbeit wies in Koimmunoprecipitationsversuchen eine Interaktion des C-Terminus von FC mit dem N-Terminus von PC2 nach¹³⁵. Vorherige Inkubation der Zelllysate mit einem Antikörper gegen den Abschnitt der Aminosäuren 3872-4074 des C-terminalen Teils von FC unterdrückte die Koimmunoprecipitation^{135 35}. Eine Relevanz der Phosphorylierung des in diesem Abschnitt enthaltenen Tyrosins 3992 von cFC für die Interaktion wäre denkbar, wenn auch im Verlauf der Abschnitt 3903-3964 als minimales Konstrukt der PC2-Bindungsdomäne innerhalb des C-Terminus von FC identifiziert wurde¹³⁶. Zusätzlich zur Identifikation der PC2-Bindungsdomäne zeigten Kim et al., dass die Interaktion von cFC und PC2 einer durch Verlust von FC bedingten Herunterregulation der PC2 Expression entgegenwirkt¹³⁶, wofür die Phosphorylierung von cFC ebenfalls relevant sein könnte.

Die Phosphorylierung von Y3992 von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ durch SRC könnte zudem für andere Signalwege, abgesehen von dem hier untersuchten STAT3-Signalweg, eine Rolle spielen. Israeli et al. brachten bei ARPKD auftretende erhöhte SRC Aktivierung in Zusammenhang mit Veränderungen des fokalen Adhäsionskomplexes¹³⁷. ARPKD Epithelzellen zeigten deutliche Veränderungen der Proteinlevel verschiedener Adhäsionsproteine, darunter β 1-Integrin, SRC und Paxillin. In Sammelrohrzellen konnte FC im Immunoprecipitat des Adhäsionsproteins Paxillin nachgewiesen werden¹³⁷. Auch Paxillin unterliegt, neben weiteren Adhäsionsproteinen, der Phosphorylierung durch SRC, welche eine entscheidende Rolle für die Regulierung des Adhäsionskomplexes spielt¹³⁷. Es ist denkbar, dass die Phosphorylierung von cFC an Y3992 in diesem Zusammenhang von Bedeutung ist. Fokale Adhäsionskomplexe regulieren Zellausbreitung, Migration und Adhäsion. Daneben können sie über die

Transmission von Scherkräften vom Aktinzytoskelett an Integrin Rezeptoren Mechanotransduktion vermitteln ¹³⁷. La Foya et al. beschreiben für Notch einen regulatorischen Mechanismus, bei dem die Phosphorylierung von Notch durch Src an spezifischen Tyrosinresten durch Integrin aktiviert wird und schließlich zu einer Hemmung der transkriptionellen Aktivität der intrazellulären Domäne von Notch führt ¹²². Es wäre interessant zu erforschen, ob die Phosphorylierung der intrazellulären Domäne von FC durch SRC einer vergleichbaren Modulation durch Adhäsionsproteine wie Integrin unterliegt. Auch der oben genannte Interaktionspartner von cFC RACK1 ¹²⁶ scheint über seine Interaktion mit Src regulatorische Effekte auf Proteine des Adhäsionskomplexes zu haben ¹³², während für ADAM12 eine Erhöhung der Src Aktivität in Reaktion auf durch Integrin vermittelte externe Signale nachgewiesen wurde ¹²⁸. Als Interaktionspartner von cFC ¹²⁶ könnten RACK1 und ADAM12 regulatorische Effekte auf die Phosphorylierung von FC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ durch SRC haben.

Zusammenfassend bietet die Identifizierung des Tyrosins 3992 von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ als Ziel der Phosphorylierung durch SRC einen detaillierten Einblick in die Interaktion von FC und SRC. In zukünftigen Versuchen bleibt die funktionelle Bedeutung der Phosphorylierung zu erforschen.

5.2 Die Rolle von DZIP1L bei der Pathogenese der ARPKD

Lange Zeit galt die ARPKD als monogenetische Erkrankung, bedingt durch Varianten in *PKHD1*. Im Jahr 2017 publizierten Lu et al. *DZIP1L* als zweites für die ARPKD ursächliches Gen, welches das aus 767 Aminosäuren bestehende Protein DAZ-interacting protein 1-like (DZIP1L) kodiert ⁵. In Vorarbeiten unseres Labors wurde der STAT3-Signalweg als Komponente der Pathogenese der ARPKD identifiziert ⁸. Es folgte die Untersuchung von DZIP1L in Zusammenhang mit dem SRC-STAT3-Signalweg.

5.2.1. DZIP1L interagiert mit Komponenten des STAT3-Signalwegs

Die Western Blot Analyse zeigt eine Koimmunopräzipitation von STAT3 und SRC mit DZIP1L (Abb. 2). Diese Ergebnisse weisen auf eine mögliche Interaktion von DZIP1L mit Komponenten des SRC-STAT3-Signalwegs hin.

Der Transkriptionsfaktor STAT3 beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation zellulärer Prozesse wie Zellwachstum und Apoptose in Reaktion auf zelluläre Stimuli ¹³⁸. Wie in der Einleitung dargestellt ergaben sich aus näherer Untersuchung des SRC-STAT3-Signalwegs relevante Erkenntnisse zur Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen (siehe 2.1.3.) ^{58 139}. Der hier erbrachte Nachweis der Phosphorylierung des Tyrosins 3992 des zytoplasmatischen Teils von FC durch SRC deutet in Verbindung mit den Vorergebnissen unseres Labors auf eine mit der ADPKD gemeinsame

Beteiligung des STAT3-Signalwegs an der Pathogenese der ARPKD hin. Eine Interaktion von DZIP1L mit Komponenten des STAT3-Signalwegs könnte auf eine Rolle dieser Signalkaskade für die Pathogenese der durch Varianten in *DZIP1L* bedingten ARPKD hinweisen und wäre kohärent mit bisherigen Kenntnissen zur Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen. Mögliche Parallelen zwischen FC und DZIP1L in Bezug auf ihre Beteiligung am SRC-STAT3-Signalweg sind von besonderem Interesse. Zur funktionellen Untersuchung der Koimmunopräzipitation von STAT3 und SRC mit DZIP1L wurde die Auswirkung von DZIP1L Überexpression im STAT3 Luciferase Assay untersucht. Hierzu wurden HEK293T-Zellen mit DZIP1L in aufsteigender Konzentration und SRC transfiziert. Die Überexpression von DZIP1L zeigt weder Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität von STAT3 noch auf die SRC induzierte STAT3 Aktivierung (Abb. 3A). Daraus ergibt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung der Interaktion von DZIP1L mit den Komponenten des STAT3-Signalwegs.

Die Interaktion von DZIP1L mit SRC könnte dazu dienen, die Wechselwirkung von SRC mit anderen Proteinen zu stabilisieren und darüber weitere Signalwege zu modulieren. Ein besonders interessanter Aspekt ist hierbei die Lokalisation von DZIP1L in der ziliären Transitionszone⁵. DZIP1L könnte SRC zur Phosphorylierung von Transitionszonenproteinen wie NPHP1 rekrutieren, welches an den zytoplasmatischen Teil von PC1 bindet und durch SRC phosphoryliert wird^{52 140}. Die Phosphorylierung von FC³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Y3992 durch SRC (Abb. 1) wäre eine weitere Interaktion, die möglicherweise unter dem Einfluss von DZIP1L stehen könnte. Lu et al. erarbeiteten eine Interaktion von DZIP1L mit der Zytoskelett GTPase SEPT2, welche Teil der periziliären Diffusionsbarriere ist^{5 141 142}. Interessanterweise gibt es Hinweise auf eine Lokalisationsänderung von SEPT2 durch SRC Aktivierung¹⁴³. Da viele Substrate von SRC auch als Regulator des Aktinzytoskeletts wirken¹⁴⁴, welches eine entscheidende Rolle für Ziliogenese und intrazellulären Proteintransport spielt, könnte die Interaktion von DZIP1L mit SRC, möglicherweise über SEPT2, Einfluss auf die ziliäre Translokation von Proteinen haben.

Bei Varianten in *DZIP1L* ist eine Reduktion der ADPKD Proteine PC1 und PC2 entlang der ziliären Membran erkennbar, während ihre Lokalisation an der ziliären Basis nicht beeinträchtigt ist⁵. Dieser Barriere defekt der ziliären Transitionszone scheint nicht generalisiert zu sein, da der Hedgehog-Korezeptor smoothed (Smo) regulär entlang des Axonems lokalisiert⁵. Der selektiv betroffene Transport von PC1 und PC2 zur ziliären Membran kommt als möglicher grundlegender Pathomechanismus der durch Varianten in *DZIP1L* bedingten ARPKD in Frage.

Biallelische Mutationen von *PKD1* führen zu early-onset ADPKD und rekapitulieren damit einen ARPKD Phänotyp^{145 146 147 148}. Walker et al. wiesen in einem ADPKD Mausmodell nach, dass die ziliäre Misslokalisierung von PC2 auch in Anwesenheit eines ansonsten funktionsfähigen PC2 Proteins ausreichend für die Entstehung eines zystischen Phänotyps ist¹⁴⁹. Bemerkenswert ist die kaum ausgeprägte hepatische Manifestation im *Dzip1*/Mausmodell⁵, welche im Gegensatz zu klassischen *Pkhd1* Mausmodellen steht¹⁵⁰. Ma et al. postulieren das Modell der „cilia dependent cyst activation“ (CDCA), welches ein bislang undefiniertes, von primären Zilien ausgehendes Signal beschreibt, das bei Varianten in *PKD1* oder *PKD2* Zystenbildung induziert^{151 145}. Die Überlegungen basieren auf der Erkenntnis, dass der Verlust von Zilien im ADPKD Mausmodell bei Mutation von *Pkd1* oder *Pkd2* zu einer Milderung des zystischen Phänotyps führt¹⁵¹. Es wäre interessant zu untersuchen, ob genetisch induzierte Unterbindung der Zilienbildung auch im *Dzip1*/Mausmodell zu einer Milderung des zystischen Phänotyps führt. Ein weiterer Ansatz, eine mögliche zentrale Bedeutung der Misslokalisierung von PC1 und PC2 entlang der ziliären Membran nachzuweisen, wäre der Versuch, den zystischen Phänotyp bei Varianten in *Dzip1* durch Erhöhung der Anreicherung von PC1 und PC2 an der ziliären Membran abzumildern¹⁴⁵.

Bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Interaktion von DZIP1L mit SRC und STAT3 fällt auf, dass SRC Expression die Expression von DZIP1L unabhängig von der Kinaseaktivität vermindert (Abb. 3B). Zusätzlich zeigt die Western Blot Analyse, dass auch die Expression von mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ zu einer Verminderung der DZIP1L Expression führt (Abb. 3C). Bei gleichzeitiger Expression von SRC und mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ in Kombination mit DZIP1L ist ein additiver Effekt zu beobachten (Abb. 3C). Diese Ergebnisse legen eine genetische Interaktion von *DZIP1L* mit anderen für die Pathogenese der ARPKD relevanten Genloci nahe. Lu et al. vermuteten bereits eine Modifikation des zystischen Phänotyps bei Varianten in *DZIP1L* durch eine solche Interaktion mit anderen Genloci, welche mit polyzystischen Nierenerkrankungen oder Ziliopathien assoziiert sind⁵.

Zahlreiche Proteine der ziliären Transitionszone wurden als Ursache von Ziliopathien mit renaler Beteiligung identifiziert, darunter Komponenten des NPHP Proteinkomplexes und des MKS Komplexes als pathogenetische Grundlage der Nephronophthise (NPHP) beziehungsweise des Meckel Syndroms (MKS)¹⁵². Sowohl ein Defekt des multimerischen MKS Proteinkomplexes der ziliären Transitionszone als auch ein knockout des ziliären Transportgens *tubby family protein 3 (Tulp3)* führten zu einer Reduktion von ziliär lokalisiertem PC2 Protein^{152 153 154 155}. Zusätzlich war eine Reduktion weiterer ziliärer Membranproteine wie der GTPase Arl13b zu finden^{152 153 155}. Auch wenn Koimmunopräzipitationsexperimente keine direkte Interaktion von DZIP1L mit MKS1 oder NPHP1 zeigten⁵, wäre es interessant zu

untersuchen, ob Varianten in *DZIP1L* zu Veränderungen der Lokalisation oder Expressionslevel weiterer ziliärer (Membran-)proteine führen. Zudem könnte umgekehrt untersucht werden, ob Expression der ADPKD Proteine PC1 und PC2 analog zu SRC und mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ die Expression von *DZIP1L* beeinflussen. Die Effekte der Verminderung der *DZIP1L* Expression bei Koexpression von SRC und/ oder mFC³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ könnten darauf hinweisen, dass ein definiertes quantitatives Gleichgewicht der beteiligten Proteine von Bedeutung ist.

Ergänzend ist anzumerken, dass die aufgeführten Ergebnisse im Rahmen von Koimmunopräzipitationsexperimenten auf Grundlage transienter Überexpression in HEK293T-Zellen erhoben wurden. Dieses Modell ist im Hinblick auf die Untersuchung potenzieller Signalwege kritisch zu betrachten, da die Proteine häufig in unphysiologisch hohen Konzentrationen vorliegen. Somit besteht Gefahr, artifizielle Interaktionen auf Grund einer Veränderung der intrazellulären Signalgebung zu beobachten. Für die Validität des Modells sprechen die Versuche mit Kontrollproteinen, die negative Ergebnisse zeigen. Alternativ könnten genetisch modifizierte Zellen mit stabiler Expression von bei Patienten nachgewiesenen Varianten von *DZIP1L* oder eine Zelllinie mit einem knockout von *DZIP1L* weiteren Forschungsvorhaben dienen.

Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass *DZIP1L* in komplexen molekularen Netzwerken innerhalb der ziliären Transitionszone agiert. Es bleibt zu klären, ob der SRC-STAT3-Signalweg, möglicherweise als nachgeschaltetes Ziel, hierbei eine entscheidende Rolle spielt. Zukünftige Untersuchungen könnten sich auf die Interaktionen zwischen *DZIP1L*, dem STAT3-Signalweg und anderen Proteinen als Teile ziliärer Signalkaskaden konzentrieren.

5.3 Untersuchung der Variante RRAGD Ser76Leu als Ursache der ADKH-RRAGD

5.3.1. Die IMCD Flp-In Zelllinien exprimieren GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP

Auf molekularer Ebene stellen die Interaktion der Rag GTPasen mit mTorC1 und die daraus resultierende Regulation des Komplexes einen spannenden Zusammenhang dar. In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der durch *RRAGD* kodierten GTPase RagD (RRAGD). Die Variante RagD Serin 76 Leucin (RRAGD S76L) wurde als häufigste Ursache der ADKH-RRAGD identifiziert ⁹.

Zur Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Variante RRAGD S76L wurden IMCD Flp-In Zelllinien mit stabiler Expression von Rragd WT sowie der murinen Variante Rragd S75L, äquivalent zur humanen Variante RRAGD S76L ⁹, generiert. Diese wurden sowohl für Immunfluoreszenzfärbungen als auch für ein massenspektrometrisches Verfahren verwendet. Die Western Blot Analyse zeigt die stabile Expression von GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP auf Proteinebene (Abb. 4). In der Immunfluoreszenzfärbung ist eine hauptsächlich perinukleäre Lokalisation mit Anreicherung in vesikulären Strukturen von GFP.mRragd WT erkennbar. Für GFP.mRragd S75L zeigt sich ein ähnliches Verteilungsmuster. Dabei wird eine Aussparung des Zellkerns deutlich (Abb. 5).

Unter physiologischen Umständen liegen die Rag GTPasen gebunden an die lysosomale Membran vor ¹⁵⁶. Der pentamerische Komplex Ragulator dient dabei als elementare Anlagerungsstelle ^{157 156}. Bestehend aus fünf Proteinen vermittelt er die membranäre Verankerung der GTPasen, sodass mTorC1 zum Lysosom rekrutiert werden kann. Bei Ausfall von Ragulator verliert sich der Kontakt zur lysosomalen Oberfläche ¹⁵⁷. Die Stärke der Interaktion zwischen den endogenen Rag Proteinen und Ragulator erwies sich als durch die Verfügbarkeit von Aminosäuren steuerbar. Diese wird über den Nukleotidbindungsstatus der Rag GTPasen vermittelt ¹⁵⁷. Bei Stimulation durch Aminosäuren erfolgt eine Abschwächung der Interaktion, welche die Rekrutierung von mTorC1 zur lysosomalen Membran und somit seine Aktivierung ermöglicht ^{65 157}. Hierbei ist zu beachten, dass diese abgeschwächte Bindung zwischen Ragulator und den Rag Proteinen für eine signifikante Interaktion weiterhin ausreicht, sodass Ragulator während der Rekrutierung von mTorC1 stets als Konstrukt zur Verankerung der GTPasen in der lysosomalen Membran fungiert ¹⁵⁷. Somit hat die Verfügbarkeit von Aminosäuren keinen Einfluss auf die generelle Lokalisation der Rag GTPasen ^{156 157 65}.

Die hier dargestellte überwiegend perinukleäre Lokalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L (Abb. 5) zeigt Übereinstimmung mit fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von GFP.RRAGD in der Arbeit von Sancak et al.¹⁵⁶. Zusätzlich zeigen die Autoren eine Kolo­kalisierung mit dem lysosomalen Membranprotein Lamp1, welche unabhängig von der Verfügbarkeit von Aminosäuren ist. Bei Stimulation mit Aminosäuren wird eine Translokation von mTorC1 in Lamp positive Kompartimente sichtbar¹⁵⁶. Auch bei der hier dargestellten Lokalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L (Abb. 5) wäre eine Kolo­kalisierung mit lysosomalen Strukturen anhand des morphologischen Eindrucks plausibel. Diese ließe sich durch Verwendung eines Anti-Lamp1 Antikörpers bestätigen.

Bei der Lokalisation von GFP.mRragd S75L lässt sich eine deutlichere Aussparung des Zellkerns im Vergleich zu GFP.mRragd WT vermuten. Dieses Erscheinungsbild wäre mit einer zytoplasmatischen Lokalisation von GFP.mRragd S75L im Gegensatz zu einer überwiegend vesikulären Lokalisation der wildtypischen Form vereinbar. Bezüglich der subzellulären Lokalisation von Rragd/ RRAGD liegen verschiedene Daten vor. In murinem Gewebe wird eine zytoplasmatische Lokalisation beschrieben¹⁵⁸, während für humanes Gewebe sowohl eine zytoplasmatische¹⁵⁹ als auch eine nukleäre Lokalisation zu finden sind¹⁵⁸. Als mögliche Erklärung wird eine Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation vom metabolischen Status des untersuchten Gewebes angeführt¹⁵⁹.

Wu et al. zeigten, dass RRAGC im Zellkern durch die Aktivität des GTPase aktivierenden Proteins Folliculin (FLCN) in eine aktive GDP-gebundene Form übergeht, was nach seinem Austritt aus dem Kern als Heterodimer mit RRAGA die Aktivierung von mTORC1 ermöglicht. Aktivierende Mutationen in RRAGC könnten den Bedarf an nukleärer Passage vor mTorC1 Aktivierung umgehen¹⁶⁰. Dieser Mechanismus ist möglicherweise auf GFP.mRragd S75L übertragbar und könnte ebenfalls ein Grund für eine geringere nukleäre Lokalisation im Vergleich zu GFP.mRragd WT sein. Experimentell könnten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen lebender Zellen und Immunopräzipitationsexperimente nach Zellfraktionierung angewandt werden, um eine nukleäre Translokation und mögliche mutationsbedingte Unterschiede bei GFP.mRragd S75L zu untersuchen.

5.3.2. Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen eine Kolo­kalisierung von mRragd WT und mRragd S75L mit mTor und phospho-mTor

Sancak et al. beschreiben die Aminosäure induzierte Translokation von mTorC1 durch die Rag GTPasen⁷⁷. Nach Stimulation mit Aminosäuren zeigt sich eine Ansammlung von mTorC1 in der perinukleären Region oder in größeren vesikulären Strukturen. Zum Teil sind beide Formationen gleichzeitig vorzufinden. Für diese Translokation sind sowohl die Rag Proteine als auch der Mediator Raptor notwendig⁷⁷. Dabei wird den Rag GTPasen die Regulation der Translokation von mTorC1 zum gleichen Zellkompartiment, in dem sich auch der Aktivator

Rheb befindet, zugeschrieben. Das GTP bindende Protein Rheb aktiviert die Proteinkinaseaktivität von mTorC1. Über die Relokalisation innerhalb des endomembranären Systems zu perinukleär gelegenen vesikulären Strukturen kann demzufolge die Aminosäure-Signalgebung an den Komplex vermittelt werden ⁷⁷.

Somit war es auch im Rahmen dieser Arbeit interessant, bei Betrachtung der Lokalisation von mTor bei GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT den Entzug von Aminosäuren einzubeziehen. Dieser sollte durch Herstellung des Nährmediums für die Zellen ohne Zugabe von fetalem bovinem Serum (FBS) imitiert werden. Die Immunfluoreszenzfärbung über den Anti-mTor Antikörper bestätigt die Lokalisation von mTor in vesikulären Strukturen um den Zellkern herum. Es ist eine Kolokalisation von mRragd WT und mRragd S75L sowohl mit mTor als auch mit phospho-mTor (Serin 2448) sichtbar (Abb. 6). In beiden Fällen war keine Veränderung durch den Entzug von FBS zu erkennen (nicht dargestellt).

Die Kolokalisation ist gut mit der bekannten Interaktion von Rragd mit mTorC1 vereinbar. Es ist zu beachten, dass dem Nährmedium zwar kein FBS hinzugefügt wurde, dieses aber dennoch eine gewisse Menge an Aminosäuren enthält. Es ist möglich, dass Lokalisationsänderungen von mTorC1 erst durch den vollständigen Entzug von Aminosäuren oder Entzug über einen anderen Zeitraum sichtbar wären. Genauso ist denkbar, dass durch aktives Hinzufügen von Aminosäuren Lokalisationsunterschiede bei mTor Aktivierung erkennbar werden. Hier ließe sich erneut eine Anfärbung von mTor in phosphorylierter Form anwenden. Zudem könnte eine erhöhte Kolokalisation von mTor mit dem lysosomalen Marker Lamp1 auf eine erhöhte mTor Aktivierung bei GFP.mRragd S75L hinweisen. Die Translokation von mTorC1 zur lysosomalen Membran wird durch die Bindung der Rag GTPasen an Raptor vermittelt ⁷⁷. Besonders auf Grund der erhöhten Kopräzipitation von Raptor mit GFP.mRragd S75L (in 5.3.3. diskutiert) wäre ein Vergleich der Kolokalisation von mTor mit Lamp1 zwischen den Zelllinien interessant.

5.3.3. MRragd S75L zeigt eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie von Komponenten der V-ATPase und von Ragulator

Zur funktionellen Untersuchung der Variante Rragd S75L wurde das im Folgenden diskutierte massenspektrometrische Verfahren angewandt. Die Flüssigkeitschromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie zielt auf die Identifikation von Unterschieden zwischen potenziellen Interaktionspartnern von GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT ab.

Bei der Immunopräzipitation über einen Anti-GFP Antikörper zeigt die statistische Auswertung eine mit GFP.mRragd S75L gegenüber GFP.mRragd WT signifikant gesteigerte Kopräzipitation verschiedener Proteine (Abb. 7). Die Zuordnung zu Signalwegen der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Datenbank gibt auf Grundlage experimentellen

Wissens Hinweise auf zelluläre und für den Organismus bedeutsame Funktionen ^{112 113 114} der im Präzipitat von GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT angereicherten Proteine. Die Analyse ergibt eine signifikant erhöhte Menge an Proteinen des mTor-Signalwegs. Zudem ist eine Anreicherung von Proteinen der biologischen Prozesse oxidative Phosphorylierung, Bildung synaptischer Vesikel und Säuresekretion im Sammelrohr zu finden (Abb. 7E). Die Auswertung mit Hilfe der Gene Ontology (GO) Datenbank ermöglicht eine funktionelle Einordnung ^{109 110 111} der angereicherten Proteine. Sie zeigt im Bereich der molekularen Funktionen eine signifikant erhöhte Anreicherung von Proteinen mit Beteiligung an der ATPase Aktivität (protonentransportierend, Rotationsmechanismus). Zudem sind als biologischer Prozess eine Anreicherung des ATP-Hydrolyse gekoppelten Protonentransporters sowie als zelluläre Komponente eine Anreicherung von Teilen des V-ATPase Komplexes zu finden. Als weitere zelluläre Komponente zeigen sich Bestandteile der lysosomalen Membran (Abb. 7E).

Besonders interessant und daher hier diskutiert sind Hinweise auf eine signifikant erhöhte Interaktion von GFP.mRragd S75L mit Raptor und mit Komponenten des V-ATPase sowie des Ragulator Komplexes (Abb. 7). Die Verfügbarkeit von Aminosäuren im lysosomalen Lumen moduliert die Interaktion der V-ATPase mit dem Rag-Ragulator Komplex ⁶⁵.

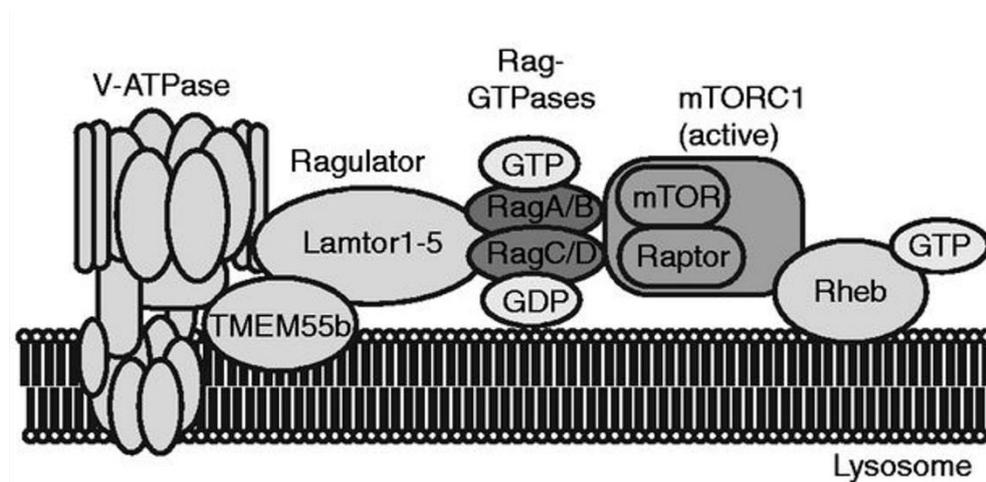


Abbildung 8 Schematische Darstellung des V-ATPase-Ragulator-Rag-GTPase-mTORC1 Komplexes.

Quelle: Schlingmann et al., 2021 ⁹. Mit freundlicher Genehmigung von JASN (Journal of the American Society of Nephrology).

V-ATPase

Bei der vacuolar H⁺-Adenosintriphosphatase (V-ATPase) handelt es sich um eine durch ATP-Hydrolyse getriebene Protonenpumpe. Sie ist funktionell an verschiedenen Prozessen wie Proteindegradation, Membrantransport, Knochenresorption und Tumormetastasierung beteiligt. Über Protonentransport entlang der Plasmamembran sowie intrazellulärer

Membranen erzeugt die V-ATPase die Azidifizierung intrazellulärer Kompartimente. Ihre Aktivität wird unter anderem durch reversible Dissoziation ihrer Untereinheiten gesteuert ¹⁰⁸. Die V-ATPase bildet in Form einer lysosomenassoziierten Maschinerie zur Erfassung lysosomaler Aminosäuren einen wichtigen Aktivator des mTor-Signalwegs ¹⁶¹. Auf ATP-Hydrolyse in der Domäne V₁ folgt ein Rotationsmechanismus, welcher die Protonentranslokation durch die integrale V₀ Domäne ermöglicht ^{161 108}. Aus diesem Transfer resultiert die Azidifizierung des lysosomalen Lumens. Die ATP-Hydrolyse sowie die damit assoziierte Rotation der V-ATPase erwiesen sich als essenziell für die Vermittlung des Aminosäure induzierten Signals an die Rag GTPasen ¹⁶¹ und somit als Voraussetzung der anschließenden mTorC1 Aktivierung.

Die Expression der V-ATPase unterliegt einer komplexen, zum Teil wechselseitigen, Regulation, unter anderem durch mTorC1 sowie den Transkriptionsfaktor EB (TFEB) ¹⁶². Erhöhte Expressionslevel könnten auf eine Aktivierung des mTor-Signalwegs hinweisen ¹⁶². Weitere Mechanismen, die der hier gezeigten Anreicherung von Komponenten der V-ATPase zu Grunde liegen könnten, wären eine verstärkte Bindung von GFP.mRragd S75L an Komponenten des mTor-Signalwegs sowie eine erhöhte Akkumulation der V-ATPase an der lysosomalen Membran bei GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT, wobei diese nicht den unmittelbaren Rückschluss auf eine Aktivierung des mTor-Signalwegs erlauben würden ^{163 157}. Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen über gegen die V-ATPase gerichtete Antikörper könnten auf mutationsbedingte Unterschiede des Expressionslevels beziehungsweise der intrazellulären Lokalisation hinweisen.

Ragulator

Der Beitrag der V-ATPase zur Aminosäure induzierten mTor Aktivierung wird funktionell zwischen der Akkumulation von Aminosäuren und dem Nukleotidladungsstatus der Rag GTPasen eingeordnet. Genauer bestehen umfangreiche Aminosäure sensitive Interaktionen der V-ATPase mit dem Rag-Ragulator Komplex ¹⁶¹. Bei Ragulator handelt es sich um einen pentamerischen Komplex bestehend aus den Untereinheiten Lysosomal Adaptor and Mitogen-activated protein kinase and mTor activator/ regulator (Lamtor) 1, Lamtor 2, Lamtor 3, Lamtor 4 und Lamtor 5. Dabei dient Lamtor 1 der Verankerung des Ragulator Komplexes in der lysosomalen Membran, während Lamtor 2/ 3 und Lamtor 4/5 jeweils als Heterodimer vorliegen ^{157 156 164}. Funktionell interagiert Ragulator mit den Rag GTPasen und rekrutiert sie über Bildung des Rag-Ragulator Komplexes zur lysosomalen Membran. Dies stellt einen essenziellen Schritt der Aminosäure induzierten Aktivierung von mTorC1 dar ^{156 165}. GFP.mRragd S75L zeigt in der Massenspektrometrie eine signifikant erhöhte Anreicherung von Lamtor 2, Lamtor 3 und Lamtor 5 als Teile des Ragulator Komplexes (Abb. 7). Dieses Ergebnis wäre über die Bildung des Rag-Ragulator Komplexes als Voraussetzung zur mTorC1

Aktivierung mit der Hypothese einer mutationsbedingten Überaktivierung des mTor-Signalwegs⁹ vereinbar. Diese Vermutung unterstützend zeigt sich eine Anreicherung von Regulator associated Protein of mTor (Raptor) als Teil von mTorC1 (Abb. 7).

Raptor

Innerhalb von mTorC1 spielt Raptor durch die Beteiligung an essenziellen Vorgängen wie der Zusammensetzung und Stabilisierung des Komplexes sowie der Substraterkennung eine entscheidende Rolle¹⁶⁶. Die Bindung der Rag GTPasen an Raptor bewirkt die Translokation von mTorC1 an die lysosomale Membran, um dort die aktivierende Interaktion von mTorC1 mit Rheb zu ermöglichen⁷⁷. Passend zu der erhöhten Kopräzipitation von Raptor mit GFP.mRragd S75L war in Vorarbeiten eine erhöhte Kopräzipitation von Raptor mit RRAGD S76L in HEK293T-Zellen erkennbar⁹. Unter Verwendung der hier erstellten Zelllinien könnte ein analoges Koimmunopräzipitationsexperiment unter Einbezug von Aminosäureverfügbarkeit weiteren Aufschluss über eine verstärkte Bindung von GFP.mRragd S75L an Raptor bieten.

Der Nukleotidstatus der Rag GTPasen ist von hoher Bedeutung

Interaktionen der Rag GTPasen mit ihren Effektoren wie Raptor unterliegen einem modulatorischen Effekt dynamischer Rearrangements der N-terminalen GTPase Domäne (G-Domäne)¹⁶⁵. Rotationen der G-Domäne scheinen eine Bindungsstelle für mTorC1 am Rag Heterodimer freizulegen^{165 167}. Sie werden als direkte Folge der GTP-Hydrolyse interpretiert, was einer nukleotidabhängigen Konformationsänderung der Rag Proteine entspricht¹⁶⁵. Diese Änderungen sind Voraussetzung für die Bindung der Rag GTPasen an mTorC1⁸⁰.

Innerhalb der Zelle agieren die Rag GTPasen in Form von Heterodimeren bestehend aus Rag A oder B in Kombination mit Rag C oder D¹⁶⁸. Strukturelle Daten wiesen darauf hin, dass nur RagA^{GTP}/ RagC^{GDP} an mTorC1 binden kann¹⁶⁹. Aktuellere Arbeiten legen allerdings nahe, dass dem Nukleotidbindungsstatus von RagA und RagB bei der Rekrutierung von mTorC1 zur lysosomalen Membran eine höhere Bedeutung als dem Nukleotidbindungsstatus von RagC und RagD zukommt^{170 77}. Dieser spielt dagegen eine entscheidende Rolle für die Rekrutierung von mTorC1 Substraten im Rahmen des „non-canonical“ mTor-Signalwegs (im Verlauf diskutiert)^{170 171}. Der Regulation des Nukleotidbindungsstatus dienen GTPase aktivierende Proteine (GAPs) wie Folliculin (FLCN)^{172 173 174} sowie guanine nucleotide exchange factors (GEFs) wie Ragulator^{157 175}. Es wird vermutet, dass eine konformationelle Änderung zwischen der V-ATPase und Ragulator die Aktivität von Ragulator als GEF moduliert^{176 161 157}. Somit haben die V-ATPase und Ragulator regulatorischen Einfluss auf den Nukleotidbindungsstatus der GTPasen.

Einfluss der Variante RRAGD S76L auf die Nukleotidbindungsstelle

Alle als für die ADKH-RRAGD ursächlich identifizierten Varianten betreffen evolutionär unveränderte Aminosäurereste in Guanyl-Nukleotid Bindungsstellen, die in den kleinen GTPasen hoch konserviert sind⁹. Somit beeinflussen sie die G-Domäne, deren grundlegende Bedeutung für den Nukleotidstatus oben beschrieben wird. Die Mutationen finden sich unter anderem in den Aminosäuren Serin 76, Threonin 97 und Prolin 119 von RRAGD. Diese sind alle in Motiven lokalisiert, die Interaktionen mit der Phosphateinheit der Nukleotide vermitteln⁹.

RRAGC Ser75Tyr konnte als neu entdeckte de novo missense Mutation als Ursache einer idiopathischen DCM identifiziert werden¹⁷⁷. Die Variante bewirkt eine Störung der Ligandeninteraktion der G-Domäne. Es zeigt sich ein konformationeller Anstieg des GDP gebundenen Status¹⁷⁷. Dieser Zustand passt zu der auf zellulärer Ebene beobachteten partiellen Insensitivität der mTorC1 Aktivierung gegenüber Aminosäuredeprivation bei RRAGC Ser75Tyr¹⁷⁷.

Dieser Mechanismus lässt sich möglicherweise auf die funktionellen Auswirkungen von RRAGD S76L übertragen. In Anbetracht der hohen Übereinstimmung der Nukleotidsequenzen von RagC und RagD und des bei murinem Rragd S75L betroffenen korrespondierenden Aminosäurerests sowie des übereinstimmenden Phänotyps der DCM wäre es denkbar, dass auch bei der Variante Rragd S75L ein Anstieg des GDP gebundenen Zustands eine erhöhte Aktivität von mTorC1 bewirkt. Untermuert wird diese Hypothese durch die vielfach belegte Bedeutung des Nukleotidbindungsstatus der GTPasen für ihre Interaktion mit mTorC1.

Zu einem späteren Zeitpunkt konnten Sambri et al. in der Tat einen analogen Pathomechanismus für die ADKH-RRAGD erarbeiten¹⁷⁸. Für eine weitere neu identifizierte Variante von *RRAGD* als Ursache der ADKH-RRAGD und für die bekannten Varianten⁹ konnte anhand von in silico Daten die Unfähigkeit der RRAGD Varianten zur Bindung von GTP vorhergesagt werden¹⁷⁸. Damit befinden sich die RRAGD Varianten vorzugsweise in einem GDP gebundenen oder nukleotidfreien Zustand, welcher mit konstitutiver Aktivierung des Proteins einhergeht. Die hier gezeigte Anreicherung von Ragulator und Raptor im Ko-Präzipitat von GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT sind gut mit diesem Befund vereinbar, da Ragulator bevorzugt an nukleotidfreie Rag GTPasen bindet¹⁵⁷ und eine stärkere Interaktion von Raptor mit aktiven Formen der GTPasen als mit inaktiven Formen beschrieben wurde^{77 167 179 180}.

Sambri et al. belegen die Auto-Aktivierung der RRAGD Varianten, indem sie zeigen, dass diese unabhängig von der Aktivität des GTPase aktivierenden Proteins Folliculin (FLCN) mit

dem Transkriptionsfaktor EB (TFEB) interagieren ¹⁷⁸. Darüber bewirken sie eine konstitutive Phosphorylierung der Microphthalmia family Transkriptionsfaktoren (MiT-TFE) Transkriptionsfaktor EB (TFEB) und E3 (TFE3) durch mTorC1. Dies führt zu einer Inhibition der nukleären Lokalisation und Aktivität der MiT-TFE als „Master-Regulatoren“ lysosomaler Biogenese und Autophagie ¹⁷⁸. Hierbei handelt es sich um den „non-canonical“ mTor-Signalweg, welcher die selektive mTorC1 vermittelte Phosphorylierung und zytoplasmatische Retention der Transkriptionsfaktoren EB und E3 beschreibt ^{178 170}. Einvernehmlich damit zeigte die Expression der pathogenetischen RRAGD Varianten in der Arbeit von Sambri et al. keinen Effekt auf die Phosphorylierung der S6 Kinase (S6K) als Substrat des klassischen („canonical“) mTor-Signalwegs. Zudem zeigten Sambri et al. eine regelhafte Dissoziation von mTorC1 von Lysosomen nach Aminosäuredeprivation ¹⁷⁸. Auch im Rahmen dieser Arbeit waren weder unter regulären Bedingungen noch nach Entzug von FBS Lokalisationsunterschiede von mTor bei GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT erkennbar (vergleiche 5.3.2.). Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der zentralen Rolle des non-canonical mTor-Signalwegs für die Pathogenese der ADKH-RRAGD im Gegensatz zur initial vermuteten konstitutiven Überaktivierung des canonical mTor-Signalwegs ⁹.

Der genaue Pathomechanismus der durch RRAGD S76L bedingten Hypomagnesiämie ist bislang nicht vollständig verstanden. In Vorarbeiten konnte die Expression von *Rragd* im aufsteigenden Teil der Henle Schleife (TAL, thick ascending limb) sowie in der pars convoluta des distalen Tubulus (DCT, distal convoluted tubule) nachgewiesen werden ⁹. Im TAL werden 50% bis 70% des filtrierten Magnesiums über den Claudin 16/ Claudin 19 Komplex parazellulär rückresorbiert ^{9 181}.

Die Rolle des mTor-Signalwegs für die Tubulusphysiologie ist Gegenstand aktueller Forschung. Bisherige Arbeiten beschäftigen sich überwiegend mit Effekten einer Herunterregulation des mTor-Signalwegs auf das Tubulussystem ^{9 75 182}. Hier konnten die Beeinträchtigung tubulärer Transportprozesse sowie Veränderungen in der Expression des Magnesiumkanals TRPM6 im DCT bei mTor Inhibition gezeigt werden ^{9 183}. Auffällig ist, dass nicht mTor Aktivierung, sondern mTor Inhibition mit Hypomagnesiämie assoziiert war ^{184 185}.

Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Kopräzipitation von Claudin 3 mit GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT nachgewiesen (Abb. 7). Claudin 3 gilt als ein tight junction Protein, welches die Ionenpermeabilität der parazellulären Barriere in Epi- und Endothelien beeinflusst ¹⁸⁶. Claudin 3 wird eine Interaktion mit Claudin 16 und Claudin 19 zugeschrieben ¹⁸⁷. Der Claudin 3/ Claudin 16/ Claudin 19 Komplex gilt als Ort der Reabsorption divalenter Kationen wie Magnesium im TAL ^{188 187}.

Wie RagD den Elektrolyttransport im Tubulussystem reguliert und ob dabei eine durch mTorC1 vermittelte oder eine direkte Intervention an Claudin 3/ Claudin 16/ Claudin 19 tight junctions

eine Rolle spielt ⁷³, ist bislang unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Veränderungen der Expressionslevel oder Lokalisationsänderungen von Claudin 3 bei GFP.mRragd S75L könnten unter Verwendung der hier erstellten Zelllinien durch Western Blot Analysen oder Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend bieten die hier erhobenen Daten Einblick in die Auswirkungen der Variante Rragd S75L. Die mutationsbedingt veränderte Nukleotidbindungsstelle als zentrale Ursache einer Überaktivierung des non-canonical mTor-Signalwegs stellt eine mögliche Erklärung der vermehrten Anreicherung der Komponenten des mTor-Signalwegs bei GFP.mRragd S75L im Vergleich zu GFP.mRragd WT dar.

Die ADKH-RRAGD ist ein Beispiel für die weitreichenden Folgen genetisch bedingter Nierenerkrankungen. Die komplexe Pathogenese unterstreicht die präzise gesteuerten Mechanismen, die unter physiologischen Umständen zur Erhaltung der Homöostase des gesamten Organismus notwendig sind. Daraus ergibt sich eine Vielzahl neuer Forschungsfragen, die es in Zukunft zu adressieren gilt.

6. Literaturverzeichnis

1. Vaisitti T, Bracciamà V, Faini AC, et al. The role of genetic testing in the diagnostic workflow of pediatric patients with kidney diseases: the experience of a single institution. *Hum Genomics* 2023; **17**(1): 10.
2. Ingelfinger JR, Kalantar-Zadeh K, Schaefer F. World Kidney Day 2016: Averting the legacy of kidney disease-focus on childhood. *Pediatr Nephrol* 2016; **31**(3): 343-8.
3. Genetics in chronic kidney disease: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int* 2022; **101**(6): 1126-41.
4. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, et al. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nature Genetics* 2002; **30**(3): 259-69.
5. Lu H, Galeano MCR, Ott E, et al. Mutations in DZIP1L, which encodes a ciliary-transition-zone protein, cause autosomal recessive polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2017; **49**(7): 1025-34.
6. Liebau MC, Serra AL. Looking at the (w)hole: magnet resonance imaging in polycystic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2013; **28**(9): 1771-83.
7. Wang S, Luo Y, Wilson PD, Witman GB, Zhou J. The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *J Am Soc Nephrol* 2004; **15**(3): 592-602.
8. Dafinger C, Mandel AM, Braun A, et al. The carboxy-terminus of the human ARPKD protein fibrocystin can control STAT3 signalling by regulating SRC-activation. *J Cell Mol Med* 2020; **24**(24): 14633-8.
9. Schlingmann KP, Jouret F, Shen K, et al. mTOR-Activating Mutations in RRAGD Are Causative for Kidney Tubulopathy and Cardiomyopathy. *J Am Soc Nephrol* 2021; **32**(11): 2885-99.
10. Schumacher A, Rookmaaker MB, Joles JA, et al. Defining the variety of cell types in developing and adult human kidneys by single-cell RNA sequencing. *NPJ Regen Med* 2021; **6**(1): 45.
11. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, et al. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005; **67**(6): 2089-100.
12. Kovesdy CP. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl* (2011) 2022; **12**(1): 7-11.
13. Claus LR, Snoek R, Knoers N, van Eerde AM. Review of genetic testing in kidney disease patients: Diagnostic yield of single nucleotide variants and copy number variations evaluated across and within kidney phenotype groups. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2022; **190**(3): 358-76.
14. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med* 2019; **380**(2): 142-51.
15. Coresh J. Update on the Burden of CKD. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**(4): 1020-2.
16. Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* 2003; **111**(5 Pt 1): 1072-80.
17. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, et al. PKHD1, the polycystic kidney and hepatic disease 1 gene, encodes a novel large protein containing multiple immunoglobulin-like plexin-transcription-factor domains and parallel beta-helix 1 repeats. *Am J Hum Genet* 2002; **70**(5): 1305-17.
18. Reiter JF, Leroux MR. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; **18**(9): 533-47.
19. Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N. Ciliopathies. *N Engl J Med* 2011; **364**(16): 1533-43.
20. Burgmaier K, Kilian S, Bammens B, et al. Clinical courses and complications of young adults with Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease (ARPKD). *Sci Rep* 2019; **9**(1): 7919.

21. Bergmann C, Senderek J, Windelen E, et al. Clinical consequences of PKHD1 mutations in 164 patients with autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Kidney Int* 2005; **67**(3): 829-48.
22. Haumann S, Burgmaier K, Bergmann C, Müller RU, Liebau MC. Erbliche Zystennierenerkrankungen: Autosomal-dominante und autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD und ARPKD). *medizinische genetik* 2018; **30**(4): 422-8.
23. Gimpel C, Avni FE, Bergmann C, et al. Perinatal Diagnosis, Management, and Follow-up of Cystic Renal Diseases: A Clinical Practice Recommendation With Systematic Literature Reviews. *JAMA Pediatr* 2018; **172**(1): 74-86.
24. Guay-Woodford LM, Bissler JJ, Braun MC, et al. Consensus expert recommendations for the diagnosis and management of autosomal recessive polycystic kidney disease: report of an international conference. *J Pediatr* 2014; **165**(3): 611-7.
25. Fliegau M, Benzing T, Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(11): 880-93.
26. Nigg EA, Raff JW. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* 2009; **139**(4): 663-78.
27. Habbig S, Liebau MC. Ciliopathies - from rare inherited cystic kidney diseases to basic cellular function. *Mol Cell Pediatr* 2015; **2**(1): 8.
28. Reiter JF, Blacque OE, Leroux MR. The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep* 2012; **13**(7): 608-18.
29. Guay-Woodford LM. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the prototype of the hepato-renal fibrocystic diseases. *J Pediatr Genet* 2014; **3**(2): 89-101.
30. Bergmann C. Genetics of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease and Its Differential Diagnoses. *Front Pediatr* 2017; **5**: 221.
31. Harafuji N, Yang C, Wu M, et al. Differential regulation of MYC expression by PKHD1/Pkhd1 in human and mouse kidneys: phenotypic implications for recessive polycystic kidney disease. *Front Cell Dev Biol* 2023; **11**: 1270980.
32. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, et al. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 2003; **12**(20): 2703-10.
33. Menezes LF, Cai Y, Nagasawa Y, et al. Polyductin, the PKHD1 gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium, and cytoplasm. *Kidney Int* 2004; **66**(4): 1345-55.
34. Bergmann C, Guay-Woodford LM, Harris PC, Horie S, Peters DJM, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018; **4**(1): 50.
35. Zhang MZ, Mai W, Li C, et al. PKHD1 protein encoded by the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease associates with basal bodies and primary cilia in renal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**(8): 2311-6.
36. Follit JA, Li L, Vucica Y, Pazour GJ. The cytoplasmic tail of fibrocystin contains a ciliary targeting sequence. *J Cell Biol* 2010; **188**(1): 21-8.
37. Bergmann C. Early and Severe Polycystic Kidney Disease and Related Ciliopathies: An Emerging Field of Interest. *Nephron* 2019; **141**(1): 50-60.
38. Outeda P, Menezes L, Hartung EA, et al. A novel model of autosomal recessive polycystic kidney questions the role of the fibrocystin C-terminus in disease mechanism. *Kidney Int* 2017; **92**(5): 1130-44.
39. Hiesberger T, Gourley E, Erickson A, et al. Proteolytic cleavage and nuclear translocation of fibrocystin is regulated by intracellular Ca²⁺ and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 2006; **281**(45): 34357-64.
40. Stark GR, Darnell JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 2012; **36**(4): 503-14.
41. Stepkowski SM, Chen W, Ross JA, Nagy ZS, Kirken RA. STAT3: an important regulator of multiple cytokine functions. *Transplantation* 2008; **85**(10): 1372-7.
42. Avalle L, Pensa S, Regis G, Novelli F, Poli V. STAT1 and STAT3 in tumorigenesis: A matter of balance. *Jakstat* 2012; **1**(2): 65-72.
43. Weimbs T, Talbot JJ. STAT3 Signaling in Polycystic Kidney Disease. *Drug Discov Today Dis Mech* 2013; **10**(3-4): e113-e8.

44. Levy DE, Darnell JE, Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**(9): 651-62.
45. Parsons SJ, Parsons JT. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* 2004; **23**(48): 7906-9.
46. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; **13**: 513-609.
47. Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M. Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **291**(2): L129-41.
48. Haura EB. SRC and STAT pathways. *J Thorac Oncol* 2006; **1**(5): 403-5.
49. Bjorge JD, Jakymiw A, Fujita DJ. Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene* 2000; **19**(49): 5620-35.
50. Talbot JJ, Shillingford JM, Vasanth S, et al. Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **108**(19): 7985-90.
51. Weimbs T, Olsan EE, Talbot JJ. Regulation of STATs by polycystin-1 and their role in polycystic kidney disease. *Jakstat* 2013; **2**(2): e23650.
52. Talbot JJ, Song X, Wang X, et al. The cleaved cytoplasmic tail of polycystin-1 regulates Src-dependent STAT3 activation. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**(8): 1737-48.
53. Müller RU, Messchendorp AL, Birn H, et al. An update on the use of tolvaptan for autosomal dominant polycystic kidney disease: consensus statement on behalf of the ERA Working Group on Inherited Kidney Disorders, the European Rare Kidney Disease Reference Network and Polycystic Kidney Disease International. *Nephrol Dial Transplant* 2022; **37**(5): 825-39.
54. Torres VE, Harris PC. Strategies targeting cAMP signaling in the treatment of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2014; **25**(1): 18-32.
55. Torres VE, Wang X, Qian Q, Somlo S, Harris PC, Gattone VH, 2nd. Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Med* 2004; **10**(4): 363-4.
56. Wang X, Gattone V, 2nd, Harris PC, Torres VE. Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat. *J Am Soc Nephrol* 2005; **16**(4): 846-51.
57. Gattone VH, 2nd, Wang X, Harris PC, Torres VE. Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist. *Nat Med* 2003; **9**(10): 1323-6.
58. Takakura A, Nelson EA, Haque N, et al. Pyrimethamine inhibits adult polycystic kidney disease by modulating STAT signaling pathways. *Hum Mol Genet* 2011; **20**(21): 4143-54.
59. Sweeney WE, Jr., von Vigier RO, Frost P, Avner ED. Src inhibition ameliorates polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(7): 1331-41.
60. Sweeney WE, Frost P, Avner ED. Tesevatinib ameliorates progression of polycystic kidney disease in rodent models of autosomal recessive polycystic kidney disease. *World J Nephrol* 2017; **6**(4): 188-200.
61. Tesar V, Ciechanowski K, Pei Y, et al. Bosutinib versus Placebo for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**(11): 3404-13.
62. Downie ML, Lopez Garcia SC, Kleta R, Bockenhauer D. Inherited Tubulopathies of the Kidney: Insights from Genetics. *Clin J Am Soc Nephrol* 2021; **16**(4): 620-30.
63. Viering D, de Baaij JHF, Walsh SB, Kleta R, Bockenhauer D. Genetic causes of hypomagnesemia, a clinical overview. *Pediatr Nephrol* 2017; **32**(7): 1123-35.
64. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; **169**(2): 361-71.
65. Kim J, Kim E. Rag GTPase in amino acid signaling. *Amino Acids* 2016; **48**(4): 915-28.
66. Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002; **16**(12): 1472-87.
67. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002; **10**(3): 457-68.
68. Schmelzle T, Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 2000; **103**(2): 253-62.

69. Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Res* 2007; **17**(8): 666-81.
70. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012; **149**(2): 274-93.
71. Inoki K, Corradetti MN, Guan KL. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 2005; **37**(1): 19-24.
72. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**(23): 8204-9.
73. Adella A, de Baaij JHF. mTOR signaling in renal ion transport. *Acta Physiol (Oxf)* 2023; **238**(1): e13960.
74. Grahammer F, Ramakrishnan SK, Rinschen MM, et al. mTOR Regulates Endocytosis and Nutrient Transport in Proximal Tubular Cells. *J Am Soc Nephrol* 2017; **28**(1): 230-41.
75. Grahammer F, Haenisch N, Steinhardt F, et al. mTORC1 maintains renal tubular homeostasis and is essential in response to ischemic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(27): E2817-26.
76. Caragnano A, Aleksova A, Bulfoni M, et al. Autophagy and Inflammasome Activation in Dilated Cardiomyopathy. *J Clin Med* 2019; **8**(10).
77. Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 2008; **320**(5882): 1496-501.
78. Kim E, Goraksha-Hicks P, Li L, Neufeld TP, Guan KL. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol* 2008; **10**(8): 935-45.
79. Shen K, Choe A, Sabatini DM. Intersubunit Crosstalk in the Rag GTPase Heterodimer Enables mTORC1 to Respond Rapidly to Amino Acid Availability. *Mol Cell* 2017; **68**(4): 821.
80. Anandapadamanaban M, Masson GR, Perisic O, et al. Architecture of human Rag GTPase heterodimers and their complex with mTORC1. *Science* 2019; **366**(6462): 203-10.
81. Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 2021; **9**: e11165.
82. Graham FL, van der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973; **52**(2): 456-67.
83. Loyer A, Scangos G, Juricek D, Keene D, Ruddle FH. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp Cell Res* 1982; **139**(1): 223-34.
84. Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(21): 7413-7.
85. Cardarelli F, Digiacoimo L, Marchini C, et al. The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci Rep* 2016; **6**: 25879.
86. Lin JS, Lai EM. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2017; **1615**: 211-9.
87. Szklarczyk D, Gable AL, Nastou KC, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res* 2021; **49**(D1): D605-d12.
88. Snel B, Lehmann G, Bork P, Huynen MA. STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**(18): 3442-4.
89. Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV, Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 1967; **28**(5): 815-20.
90. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics* 2014; **6**(5): 1068-78.
91. Torres JZ, Miller JJ, Jackson PK. High-throughput generation of tagged stable cell lines for proteomic analysis. *Proteomics* 2009; **9**(10): 2888-91.
92. Broach JR, Guarascio VR, Jayaram M. Recombination within the yeast plasmid 2mu circle is site-specific. *Cell* 1982; **29**(1): 227-34.
93. Broach JR, Hicks JB. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 mu circle. *Cell* 1980; **21**(2): 501-8.

94. Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, Rossi F, Stewart AF. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 1996; **24**(21): 4256-62.
95. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51 Pt 1**: 263-73.
96. Kadowaki H, Kadowaki T, Wondisford FE, Taylor SI. Use of polymerase chain reaction catalyzed by Taq DNA polymerase for site-specific mutagenesis. *Gene* 1989; **76**(1): 161-6.
97. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science* 1974; **186**(4166): 790-7.
98. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, Helling RB. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973; **70**(11): 3240-4.
99. Arber W. Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl* 1978; **17**(2): 73-9.
100. Thorne HV. Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* 1966; **29**(2): 234-9.
101. Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 1972; **269**(2): 192-200.
102. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; **74**(12): 5463-7.
103. Van Damme T, Gardeitchik T, Mohamed M, et al. Mutations in ATP6V1E1 or ATP6V1A Cause Autosomal-Recessive Cutis Laxa. *Am J Hum Genet* 2017; **100**(2): 216-27.
104. Wang L, Wu D, Robinson CV, Wu H, Fu TM. Structures of a Complete Human V-ATPase Reveal Mechanisms of Its Assembly. *Mol Cell* 2020; **80**(3): 501-11.e3.
105. Zhao J, Benlekbir S, Rubinstein JL. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature* 2015; **521**(7551): 241-5.
106. Mazhab-Jafari MT, Rohou A, Schmidt C, et al. Atomic model for the membrane-embedded V(O) motor of a eukaryotic V-ATPase. *Nature* 2016; **539**(7627): 118-22.
107. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M. Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. *Trends Biochem Sci* 2015; **40**(10): 611-22.
108. Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**(11): 917-29.
109. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; **25**(1): 25-9.
110. Blake JA, Dolan M, Drabkin H, et al. Gene Ontology annotations and resources. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**(Database issue): D530-5.
111. The Gene Ontology: enhancements for 2011. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**(Database issue): D559-64.
112. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000; **28**(1): 27-30.
113. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res* 2023; **51**(D1): D587-d92.
114. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci* 2019; **28**(11): 1947-51.
115. Vivante A, Hildebrandt F. Exploring the genetic basis of early-onset chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2016; **12**(3): 133-46.
116. Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* 2012; **27**(3): 363-73.
117. Torra R, Furlano M, Ortiz A, Ars E. Genetic kidney diseases as an underrecognized cause of chronic kidney disease: the key role of international registry reports. *Clin Kidney J* 2021; **14**(8): 1879-85.
118. Kaimori JY, Nagasawa Y, Menezes LF, et al. Polyductin undergoes notch-like processing and regulated release from primary cilia. *Hum Mol Genet* 2007; **16**(8): 942-56.
119. Zhou B, Lin W, Long Y, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 2022; **7**(1): 95.

120. Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* 2009; **137**(2): 216-33.
121. Lee HJ, Kim MY, Park HS. Phosphorylation-dependent regulation of Notch1 signaling: the fulcrum of Notch1 signaling. *BMB Rep* 2015; **48**(8): 431-7.
122. LaFoya B, Munroe JA, Pu X, Albig AR. Src kinase phosphorylates Notch1 to inhibit MAML binding. *Sci Rep* 2018; **8**(1): 15515.
123. Palomero T, Lim WK, Odom DT, et al. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**(48): 18261-6.
124. Bannell TAK, Cockburn JJB. The molecular structure and function of fibrocystin, the key gene product implicated in autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD). *Ann Hum Genet* 2024; **88**(1): 58-75.
125. Pellegrini H, Sharpe EH, Liu G, et al. Cleavage fragments of the C-terminal tail of polycystin-1 are regulated by oxidative stress and induce mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 2023; **299**(9): 105158.
126. Venghaus A. Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von Fibrocystin, dem Protein der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) [Dissertation / PhD Thesis]. Aachen: RWTH Aachen University; 2013.
127. Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Th  ret N. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis. *J Biol Chem* 2008; **283**(38): 26000-9.
128. Stautz D, Sanjay A, Hansen MT, Albrechtsen R, Wewer UM, Kveiborg M. ADAM12 localizes with c-Src to actin-rich structures at the cell periphery and regulates Src kinase activity. *Exp Cell Res* 2010; **316**(1): 55-67.
129. Kang Q, Cao Y, Zolkiewska A. Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J* 2000; **352 Pt 3**(Pt 3): 883-92.
130. Chang BY, Chiang M, Cartwright CA. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J Biol Chem* 2001; **276**(23): 20346-56.
131. Chang BY, Harte RA, Cartwright CA. RACK1: a novel substrate for the Src protein-tyrosine kinase. *Oncogene* 2002; **21**(50): 7619-29.
132. Cox EA, Bennin D, Doan AT, O'Toole T, Huttenlocher A. RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* 2003; **14**(2): 658-69.
133. Olson RJ, Hopp K, Wells H, et al. Synergistic Genetic Interactions between Pkhd1 and Pkd1 Result in an ARPKD-Like Phenotype in Murine Models. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30**(11): 2113-27.
134. Wu Y, Dai XQ, Li Q, et al. Kinesin-2 mediates physical and functional interactions between polycystin-2 and fibrocystin. *Hum Mol Genet* 2006; **15**(22): 3280-92.
135. Kim I, Fu Y, Hui K, et al. Fibrocystin/polyductin modulates renal tubular formation by regulating polycystin-2 expression and function. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(3): 455-68.
136. Kim I, Li C, Liang D, et al. Polycystin-2 expression is regulated by a PC2-binding domain in the intracellular portion of fibrocystin. *J Biol Chem* 2008; **283**(46): 31559-66.
137. Israeli S, Amsler K, Zheleznova N, Wilson PD. Abnormalities in focal adhesion complex formation, regulation, and function in human autosomal recessive polycystic kidney disease epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; **298**(4): C831-46.
138. Yuan ZL, Guan YJ, Wang L, Wei W, Kane AB, Chin YE. Central role of the threonine residue within the p+1 loop of receptor tyrosine kinase in STAT3 constitutive phosphorylation in metastatic cancer cells. *Mol Cell Biol* 2004; **24**(21): 9390-400.
139. Strubl S, Torres JA, Spindt AK, Pellegrini H, Liebau MC, Weimbs T. STAT signaling in polycystic kidney disease. *Cell Signal* 2020; **72**: 109639.
140. Liebau MC, H  pker K, M  ller RU, et al. Nephrocystin-4 regulates Pyk2-induced tyrosine phosphorylation of nephrocystin-1 to control targeting to monocilia. *J Biol Chem* 2011; **286**(16): 14237-45.

141. Hu Q, Milenkovic L, Jin H, et al. A septin diffusion barrier at the base of the primary cilium maintains ciliary membrane protein distribution. *Science* 2010; **329**(5990): 436-9.
142. Chih B, Liu P, Chinn Y, et al. A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat Cell Biol* 2011; **14**(1): 61-72.
143. Collins KB, Kang H, Matsche J, et al. Septin2 mediates podosome maturation and endothelial cell invasion associated with angiogenesis. *J Cell Biol* 2020; **219**(2).
144. Reynolds AB, Kanner SB, Bouton AH, et al. SRChing for the substrates of Src. *Oncogene* 2014; **33**(37): 4537-47.
145. Ma M. Cilia and polycystic kidney disease. *Semin Cell Dev Biol* 2021; **110**: 139-48.
146. Al-Hamed MH, Alsafran N, Rice SJ, et al. Biallelic PKD1 mutations underlie early-onset autosomal dominant polycystic kidney disease in Saudi Arabian families. *Pediatr Nephrol* 2019; **34**(9): 1615-23.
147. Gilbert RD, Sukhtankar P, Lachlan K, Fowler DJ. Bilineal inheritance of PKD1 abnormalities mimicking autosomal recessive polycystic disease. *Pediatr Nephrol* 2013; **28**(11): 2217-20.
148. Vujic M, Heyer CM, Ars E, et al. Incompletely penetrant PKD1 alleles mimic the renal manifestations of ARPKD. *J Am Soc Nephrol* 2010; **21**(7): 1097-102.
149. Walker RV, Keynton JL, Grimes DT, et al. Ciliary exclusion of Polycystin-2 promotes kidney cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Nat Commun* 2019; **10**(1): 4072.
150. Gallagher AR, Esquivel EL, Briere TS, et al. Biliary and pancreatic dysgenesis in mice harboring a mutation in Pkhd1. *Am J Pathol* 2008; **172**(2): 417-29.
151. Ma M, Tian X, Igarashi P, Pazour GJ, Somlo S. Loss of cilia suppresses cyst growth in genetic models of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Nat Genet* 2013; **45**(9): 1004-12.
152. Hu J, Harris PC. Regulation of polycystin expression, maturation and trafficking. *Cell Signal* 2020; **72**: 109630.
153. Garcia-Gonzalo FR, Corbit KC, Sirerol-Piquer MS, et al. A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet* 2011; **43**(8): 776-84.
154. Roberson EC, Dowdle WE, Ozanturk A, et al. TMEM231, mutated in orofacioidigital and Meckel syndromes, organizes the ciliary transition zone. *J Cell Biol* 2015; **209**(1): 129-42.
155. Legué E, Liem KF, Jr. Tulp3 Is a Ciliary Trafficking Gene that Regulates Polycystic Kidney Disease. *Curr Biol* 2019; **29**(5): 803-12.e5.
156. Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 2010; **141**(2): 290-303.
157. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell* 2012; **150**(6): 1196-208.
158. Ma T, Zhang L, Chen L. The Subcellular Localization of RRAGD. *J Am Soc Nephrol* 2022; **33**(5): 1046-8.
159. Schlingmann KP, Jouret F, Knoers N, de Baaij JHF. Author's Reply: The Subcellular Localization of RRAGD. *J Am Soc Nephrol* 2022; **33**(5): 1048-9.
160. Wu L, Zhou B, Oshiro-Rapley N, et al. An Ancient, Unified Mechanism for Metformin Growth Inhibition in *C. elegans* and Cancer. *Cell* 2016; **167**(7): 1705-18.e13.
161. Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* 2011; **334**(6056): 678-83.
162. Peña-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Schwartz JC, et al. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *Embo j* 2011; **30**(16): 3242-58.
163. Collins MP, Forgac M. Regulation and function of V-ATPases in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020; **1862**(12): 183341.
164. Nada S, Hondo A, Kasai A, et al. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *Embo j* 2009; **28**(5): 477-89.

165. Powis K, De Virgilio C. Conserved regulators of Rag GTPases orchestrate amino acid-dependent TORC1 signaling. *Cell Discov* 2016; **2**: 15049.
166. Tatebe H, Shiozaki K. Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules* 2017; **7**(4).
167. Gong R, Li L, Liu Y, et al. Crystal structure of the Gtr1p-Gtr2p complex reveals new insights into the amino acid-induced TORC1 activation. *Genes Dev* 2011; **25**(16): 1668-73.
168. Sekiguchi T, Hirose E, Nakashima N, Ii M, Nishimoto T. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. *J Biol Chem* 2001; **276**(10): 7246-57.
169. Vetter IR, Wittinghofer A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 2001; **294**(5545): 1299-304.
170. Napolitano G, Di Malta C, Ballabio A. Non-canonical mTORC1 signaling at the lysosome. *Trends Cell Biol* 2022; **32**(11): 920-31.
171. Napolitano G, Di Malta C, Esposito A, et al. A substrate-specific mTORC1 pathway underlies Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Nature* 2020; **585**(7826): 597-602.
172. Bar-Peled L, Chantranupong L, Cherniack AD, et al. A Tumor suppressor complex with GAP activity for the Rag GTPases that signal amino acid sufficiency to mTORC1. *Science* 2013; **340**(6136): 1100-6.
173. Petit CS, Rocznik-Ferguson A, Ferguson SM. Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases. *J Cell Biol* 2013; **202**(7): 1107-22.
174. Tsun ZY, Bar-Peled L, Chantranupong L, et al. The folliculin tumor suppressor is a GAP for the RagC/D GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Mol Cell* 2013; **52**(4): 495-505.
175. Shen K, Sabatini DM. Ragulator and SLC38A9 activate the Rag GTPases through noncanonical GEF mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; **115**(38): 9545-50.
176. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol* 2014; **24**(7): 400-6.
177. Long PA, Zimmermann MT, Kim M, Evans JM, Xu X, Olson TM. De novo RRAGC mutation activates mTORC1 signaling in syndromic fetal dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 2016; **135**(8): 909-17.
178. Sambri I, Ferniani M, Campostrini G, et al. RagD auto-activating mutations impair MiT/TFE activity in kidney tubulopathy and cardiomyopathy syndrome. *Nat Commun* 2023; **14**(1): 2775.
179. Binda M, Péli-Gulli MP, Bonfils G, et al. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Mol Cell* 2009; **35**(5): 563-73.
180. Dubouloz F, Deloche O, Wanke V, Cameroni E, De Virgilio C. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell* 2005; **19**(1): 15-26.
181. Hou J, Renigunta A, Gomes AS, et al. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**(36): 15350-5.
182. Grahammer F, Wanner N, Huber TB. mTOR controls kidney epithelia in health and disease. *Nephrol Dial Transplant* 2014; **29 Suppl 1**: i9-i18.
183. Ikari A, Sanada A, Sawada H, Okude C, Toneyawa C, Sugatani J. Decrease in transient receptor potential melastatin 6 mRNA stability caused by rapamycin in renal tubular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2011; **1808**(6): 1502-8.
184. de Baaij JHF. Magnesium reabsorption in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2023; **324**(3): F227-f44.
185. da Silva CA, de Bragança AC, Shimizu MH, et al. Rosiglitazone prevents sirolimus-induced hypomagnesemia, hypokalemia, and downregulation of NKCC2 protein expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; **297**(4): F916-22.
186. Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, et al. Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1798**(11): 2048-57.

187. Milatz S, Himmerkus N, Wulfmeyer VC, et al. Mosaic expression of claudins in thick ascending limbs of Henle results in spatial separation of paracellular Na⁺ and Mg²⁺ transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**(2): E219-e27.
188. Plain A, Alexander RT. Claudins and nephrolithiasis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2018; **27**(4): 268-76.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 SRC phosphoryliert FC ³⁸⁸²⁻⁴⁰⁷⁴ an Tyrosin 3992. Die Mutationen der Tyrosine von FC haben keinen Einfluss auf die Abschwächung der SRC induzierten STAT3 Aktivierung durch FC ³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴	47
Abbildung 2 DZIP1L bildet Proteinkomplexe mit STAT3 und SRC.....	48
Abbildung 3 DZIP1L hat keinen Effekt im STAT3 Luciferase Assay. SRC Expression vermindert die DZIP1L Expression unabhängig von der Kinaseaktivität. SRC Expression oder mFC ³⁴⁷²⁻⁴⁰⁷⁴ Expression vermindern die DZIP1L Expression- dabei zeigt sich ein additiver Effekt.....	50
Abbildung 4 Erstellung von IMCD Flp-In Zelllinien mit GFP.mRragd WT, GFP.mRragd S75L oder GFP.GFP in stabiler Expression.....	52
Abbildung 5 Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen GFP.mRragd WT oder GFP.mRragd S75L in stabiler Expression.	53
Abbildung 6 Die IMCD Flp-In Zelllinien zeigen eine Kolokalisation von GFP.mRragd WT und GFP.mRragd S75L mit mTor und mTor in phosphorylierter Form.....	55
Abbildung 7 Die Proben der Zelllinie GFP.mRragd S75L zeigen eine signifikant erhöhte Anreicherung von Raptor sowie Komponenten des V-ATPase und des Ragulator Komplexes.	60
Abbildung 8 Schematische Darstellung des V-ATPase-Ragulator-Rag-GTPase-mTORC1 Komplexes.	73

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien, Reagenzien und Lösungen mit Artikelnummer und Hersteller.....	21
Tabelle 2 Puffer und Lösungen mit Zusammensetzung.....	24
Tabelle 3 Assays und Kits mit Artikelnummer und Hersteller.....	27
Tabelle 4 Verbrauchsmaterial mit Artikelnummer und Hersteller.	27
Tabelle 5 Geräte mit Modell und Hersteller.....	29
Tabelle 6 Primäntikörper mit Antigen, Typ, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.	31
Tabelle 7 Sekundäntikörper mit Antigen, Spezifität, Wirt, Verdünnung, Artikelnummer und Hersteller.....	31
Tabelle 8 Plasmide mit Vektor und Hersteller.....	32
Tabelle 9 Primer mit Anwendung, Hersteller und Sequenz.....	33
Tabelle 10 Software mit Angabe weiterer Informationen.....	34
Tabelle 11 Pipettierprotokoll PCR.....	41

Tabelle 12 Programm Thermocycler PCR	42
Tabelle 13 Pipettierprotokoll Ligation.....	42
Tabelle 14 Pipettierprotokoll Restriktionsverdau	44
Tabelle 15 Pipettierprotokoll Sequenzierung	44
Tabelle 16 Programm Thermocycler Sequenzierung	45

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Dafinger, C., Mandel, A. M., **Braun, A.**, Göbel, H., Burgmaier, K., Massella, L., Mastrangelo, A., Dötsch, J., Benzing, T., Weimbs, T., Schermer, B., & Liebau, M. C. (2020). The carboxy-terminus of the human ARPKD protein fibrocystin can control STAT3 signalling by regulating SRC-activation. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(24), 14633–14638. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16014>

Schlingmann, K. P., Jouret, F., Shen, K., Nigam, A., Arjona, F. J., Dafinger, C., Houillier, P., Jones, D. P., Kleinerüschkamp, F., Oh, J., Godefroid, N., Eltan, M., Güran, T., Burtey, S., Parotte, M. C., König, J., **Braun, A.**, Bos, C., Ibars Serra, M., Rehmann, H., ... de Baaij, J. H. F. (2021). mTOR-Activating Mutations in RRAGD Are Causative for Kidney Tubulopathy and Cardiomyopathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 32(11), 2885–2899. <https://doi.org/10.1681/ASN.2021030333>