LUÍS FERNANDO CARVALHO DE MENEZES

**Análise do padrão de expressão do produto de *PKHD1*, o gene
mutado na doença renal policística autossômica recessiva**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.**

Área de Concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Onuchic

São Paulo

2004

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Menezes, Luís Fernando Carvalho de

Análise do padrão de expressão do produto de *PKHD1*, o gene mutado na doença renal policística autossômica recessiva / Luís Fernando Carvalho de Menezes. -- São Paulo, 2004.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Luiz Fernando Onuchic.

Descritores: 1.RIM POLICÍSTICO AUTOSSÔMICO RECESSIVO/fisiopatologia 2.RIM POLICÍSTICO AUTOSSÔMICO RECESSIVO/etiologia 3.RIM POLICÍSTICO AUTOSSÔMICO RECESSIVO/genética 4.ISOFORMAS DE PROTEÍNAS/análise 5.PROTEÍNAS DE MEMBRANA/análise 6. TÚBULOS COLETORES RENAIIS/ fisiopatologia 7.TÚBULOS COLETORES RENAIIS/patologia 8.CÍLIOS/patologia 9.IMUNOHISTOQUÍMICA/métodos 10.WESTERN BLOTTING/métodos 11.MICROSCOPIA IMUNOELETRÔNICA/métodos 12.MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA/métodos

USP/FM/SBD-093/04

DEDICATÓRIA

A meus pais, minha irmã Ana Sílvia e meu sobrinho Lucas. Sem eles, pouco de tudo isto teria algum sentido.

AGRADECIMENTOS

A meu orientador, Prof. Luiz Fernando Onuchic, que, por sua integridade, competência e incansável capacidade de trabalho, fez com que a maior realização de meu Doutorado não fosse esta Tese, mas uma real formação científica e pessoal.

Ao Prof. Thales de Brito, pelas inúmeras discussões e sugestões que contribuíram substancialmente para a qualidade dos resultados de imunoistoquímica e microscopia imunoeletrônica.

À Profa. Aline Maria da Silva, por permitir que utilizássemos toda a estrutura de seu laboratório sempre que necessário, particularmente para a geração de proteínas de fusão.

Às Disciplinas de Urologia e de Transplante e Cirurgia do Fígado, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da USP, particularmente Prof. Antônio Marmo Lucon e Prof. Marcel C. C. Machado, pela ajuda essencial na obtenção de amostras adequadas dos tecidos humanos utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Roger Chammas por sua disponibilidade, apoio e amizade.

À Ana Maria Silva por sua amizade, dedicação e competência que permitiram o exaustivo ajuste de condições experimentais que levaram à qualidade das reações de imunoistoquímica e imunoeletrônica.

Às pós-graduandas Fabiana Maria de Almeida e Daniela Beton, que muito contribuíram nos experimentos que culminaram com a purificação de proteínas de fusão.

Ao Isac de Castro, cujos conhecimentos de informática se mostraram essenciais em diversos pontos deste trabalho.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, particularmente aos técnicos Cássia, Rose, Kelly, Celina, Lucília, Leandro, Célio, Robson, Sandra e Esmeralda.

À equipe de técnicos da Microscopia Eletrônica, particularmente Hélio, Cecília, Margarete, Marcelo, Miriam e Rosário.

Aos técnicos de câmara escura do Instituto de Radiologia da Faculdade de Medicina da USP.

Aos colegas e funcionários do LIM-12.

À FAPESP, bolsas 00/14187-5 e 03/04037-4, e auxílio à pesquisa 00/00280-3.

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	viii
<u>SUMMARY</u>	ix
<u>INTRODUÇÃO</u>	1
<u>Patogênese Geral e Manifestações Clínicas da Doença Renal Policística</u>	
<u>Autossômica Recessiva</u>	2
<u>Patogênese Molecular da Doença Renal Policística Autossômica Recessiva</u>	5
<u>OBJETIVOS</u>	10
<u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	11
<u>Geração de anticorpos específicos para a poliductina</u>	11
<u>Extração de proteína, imunoprecipitação e western blotting</u>	18
<u>Imunoistoquímica</u>	21
<u>Imunofluorescência em cultura de células IMCD</u>	23
<u>Microscopia imunoeletrônica</u>	24
<u>RESULTADOS</u>	26
<u>Geração e confirmação das proteínas de fusão</u>	26
<u>Análises por western blot</u>	28
<u>Análises por imunoistoquímica em tecidos humanos</u>	33
<u>Análises por imunoistoquímica em embriões de camundongo</u>	39
<u>Análise de co-localização subcelular por imunofluorescência</u>	43
<u>Análises por microscopia imunoeletrônica</u>	44
<u>DISCUSSÃO</u>	46
<u>CONCLUSÕES</u>	61
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	64

<u>ANEXO</u>	74
--------------------	----

<u>Polyductin, the <i>PKHD1</i> gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium and cytoplasm</u>	75
---	----

RESUMO

Análise do padrão de expressão do produto do gene *PKHD1*, o gene mutado na doença renal policística autossômica recessiva

A doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR) é uma forma hereditária e severa de doença renal policística que acomete rins e trato biliar. A doença se caracteriza por dilatação fusiforme de ductos coletores renais e disgenesia biliar. *PKHD1*, o gene mutado na DRPAR, se expressa em rim, fígado e pâncreas, apresentando seu nível mais elevado em rins fetal e adulto. O gene inclui um mínimo de 86 éxons que, associados num complexo padrão de *splicing*, originam múltiplos transcritos alternativos. O quadro de leitura aberta (QLA) mais longo codifica poliductina, uma proteína de 4.074 aminoácidos para a qual se prevê um único domínio transmembrânico (TM) e uma porção carboxi-terminal intracelular curta. Prevê-se que os transcritos de *PKHD1* codifiquem produtos com o domínio TM, provavelmente associados a membrana, e proteínas sem este domínio, possivelmente secretadas. Para caracterizar os produtos de *PKHD1* e seu padrão de expressão, geramos anticorpos policlonais contra diferentes porções da poliductina usando estratégias baseadas em proteína de fusão e peptídios sintéticos. Análises por western blot em tecidos adultos humanos normais demonstraram bandas específicas de >440 kDa em rim, fígado e pâncreas e ~230 kDa em rim e fígado, predominantemente em frações de membrana. A proteína de membrana putativa de >440 kDa foi imunoprecipitada a partir de amostras de tecido renal e detectada por western blot utilizando dois anti-soros distintos. As características bioquímicas do produto de maior peso molecular sugerem que esta seja a proteína codificada pelo QLA mais longo, enquanto a banda de menor peso molecular provavelmente representa uma isoforma alternativa associada à membrana. Um produto adicional específico de ~140 kDa foi detectado por anti-soros purificados, predominantemente em frações solúveis. Estudos por imunistoquímica em rim humano demonstraram marcação específica em ductos coletores corticais e medulares e em porção ascendente espessa da alça de Henle. Secções seriadas foram coradas com anticorpos contra aquaporina-2 e proteína de Tamm-Horsfall para confirmar a localização do sinal nos segmentos do néfron. Marcação positiva também foi detectada em epitélio ductal biliar e pancreático. Análises de tecidos de embriões de camundongo mostraram marcação específica em ramos do broto ureteral, ductos biliares intra e extra-hepáticos, ductos pancreáticos e glândulas salivares. Este padrão de expressão é consistente com as características histológicas da DRPAR. Estudos por imunofluorescência em células IMCD em cultura e microscopia imunoeletrônica de ductos coletores medulares sugerem que a proteína se localize no cílio apical primário. Estes resultados indicam que a poliductina faz parte do grupo de proteínas relacionadas a DRP que se expressam nessa organela, sugerindo um papel para o cílio na diferenciação e função epitelial. Sinal positivo também foi detectado em membrana apical e em citoplasma. Estes dados sugerem que, além de sua provável participação na função ciliar, a poliductina também desempenhe papéis funcionais em outros domínios subcelulares. A detecção de três produtos distintos utilizando apenas dois anti-soros, com evidência de localizações subcelulares distintas, sugere que *PKHD1* codifique isoformas de membrana e solúveis.

SUMMARY

Analysis of the expression pattern of the *PKHD1* gene product, mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease

Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) is an inherited and severe form of polycystic kidney disease that affects the kidneys and the biliary tract. The disease is characterized by fusiform dilatation of renal collecting ducts and biliary dysgenesis. *PKHD1*, the gene mutated in ARPKD, is expressed in kidney, liver and pancreas, presenting its highest level in fetal and adult kidneys. The gene includes a minimum of 86 exons, assembled into multiple alternatively spliced transcripts. The longest open reading frame (ORF) encodes polyductin, a 4,074-aminoacid protein predicted to have a single transmembrane (TM) domain and a short intracellular carboxyl terminus. The *PKHD1*-related transcripts are predicted to encode products with the TM domain, likely membrane bound, and proteins without this domain, probably secreted. To characterize the *PKHD1* products and their expression profile, we raised polyclonal antibodies against different portions of polyductin using fusion-protein and synthetic peptide-based strategies. Western blot analyses demonstrated specific bands of >440 kDa in human adult kidney, liver and pancreas, and ~230 kDa in kidney and liver, predominantly observed in membrane fractions. The >440-kDa putative membrane protein was immunoprecipitated from kidney and subsequently detected by western blotting using two distinct antisera. The biochemical features of the higher-molecular-weight product suggest it to be the protein encoded by longest ORF, while the shorter band likely represents an alternative membrane-bound isoform. An additional product of ~140 kDa was specifically detected by affinity-purified antisera, predominantly in soluble fractions. Immunohistochemistry studies revealed specific staining in renal cortical and medullary collecting ducts and thick ascending limbs of Henle. Serial sections were stained with antibodies against aquaporin-2 and Tamm-Horsfall protein to confirm the nephron segment localization. Positive staining was also detected in biliary and pancreatic duct epithelia. Analyses of mouse developing tissues showed specific staining in the ureteric bud branches, intra and extra-hepatic biliary ducts, pancreatic ducts and salivary glands. This tissue expression pattern is consistent with the histological features of ARPKD. Immunofluorescence studies in IMCD cultured cells and immunoelectron microscopy analysis of medullary collecting ducts suggest that the protein localizes to the primary apical cilium. These results indicate that polyductin is part of the group of PKD-related proteins expressed in this organelle, suggesting a role for cilium in ductal epithelia differentiation and function. Positive staining was also detected in the apical membrane and in cytoplasm. These data suggest that, in addition to its likely involvement in cilia function, polyductin probably serves functionally in other subcellular domains. The detection of three different products using only two antisera, with evidence for distinct subcellular localizations, strongly suggests that *PKHD1* encodes membrane-bound and soluble isoforms.

INTRODUÇÃO

As doenças renais policísticas (DRP) constituem um conjunto de enfermidades genéticas caracterizadas pela dilatação e/ou expansão de segmentos tubulares renais, traduzidas na formação progressiva de estruturas císticas. Os cistos renais são recobertos por uma monocamada de células epiteliais menos diferenciadas e que apresentam maior índice proliferativo. Alterações de matriz extracelular e de polaridade celular, secreção transepitelial de fluidos e apoptose consistem em outras anormalidades clássicas associadas a este grupo de doenças (Igarashi e Somlo, 2002). Mais recentemente, a identificação de diversos genes associados a DRP e a caracterização de seus produtos têm sugerido um papel preponderante do cílio apical primário na função do epitélio renal e que o comprometimento estrutural ou funcional desta organela participe da patogênese das DRPs (Watnick e Germino, 2003).

Patogênese Geral e Manifestações Clínicas da Doença Renal Policística

Autossômica Recessiva

A doença renal policística autossômica recessiva (DRPAR) é uma importante causa de DRP pediátrica, acometendo aproximadamente 1/20,000 nascidos vivos (Zerres e cols., 1998a) e caracteriza-se por dilatações de ductos coletores renais e disgenesia biliar associada a fibrose portal (Zerres e cols., 1998b). Embora a maior parte dos casos seja diagnosticada na infância, sua variabilidade fenotípica é grande, incluindo desde a forma peri-natal severa até apresentações clínicas mais tardias e mais brandas. O fenótipo fetal caracteriza-se por rins aumentados e hiperecogênicos e oligoidrâmnio decorrente de baixo débito urinário. Estes fetos desenvolvem o fenótipo de Potter, apresentando hipoplasia pulmonar, anomalias faciais e deformidades de coluna e membros. Ao nascimento, estes neonatos freqüentemente manifestam um grau crítico de hipoplasia pulmonar que é incompatível com a vida. Os pacientes que sobrevivem ao período perinatal, por sua vez, apresentam morbidade e mortalidade relacionadas principalmente a hipertensão arterial sistêmica severa, insuficiência renal progressiva e hipertensão portal secundária a fibrose do trato portal (Guay-Woodford e Desmond, 2003).

A hipertensão arterial surge nos primeiros meses de vida e chega a acometer entre 70 e 80% dos pacientes. A capacidade de diluir e concentrar urina está comprometida e freqüentemente se associa a hiponatremia, presumivelmente em decorrência do déficit de excreção de água livre. Durante os seis meses iniciais de vida, pode haver melhora da taxa de filtração glomerular, possivelmente associada à maturação renal. Posteriormente, no entanto, há um progressivo, porém variável, declínio na função renal. Com a evolução dos métodos de terapia para insuficiência

renal crônica terminal, alguns pacientes passaram a ter o quadro clínico dominado por manifestações hepáticas decorrentes da hipertensão portal, apresentando hepatoesplenomegalia e varizes de esôfago. A função hepática, entretanto, encontra-se classicamente preservada na DRPAR (Guay-Woodford e cols., 2000).

Anátomo-patologicamente, observa-se acometimento renal bilateral e simétrico. Em neonatos afetados, os rins podem ter até dez vezes seu tamanho original, mantendo sua forma e apresentando, à superfície, pequenos cistos de 1-2 mm (Osathanondh e Potter, 1964). Córtex e medula encontram-se tomados por túbulos císticos de distribuição radial, recobertos por uma camada uniforme de células cuboidais. Glomérulos e estruturas que se assemelham a túbulos contorcidos e alças de Henle normais se aglomeram entre as estruturas císticas. Embora em pacientes que sobrevivem ao período neonatal possa haver um componente fibrótico significativo, em neonatos a fibrose é mínima. Estudos de microdissecção mostram que as anormalidades estão fundamentalmente concentradas em ductos coletores que, no entanto, apresentam ramificação normal. Todas as porções císticas ou dilatadas se comunicam livremente com as regiões não císticas e terminam normalmente na pelve (Osathanondh e Potter, 1964).

As alterações hepáticas associadas a DRPAR são caracterizadas por malformações da placa ductal (Desmet, 1992). Durante a organogênese hepática, células precursoras hepáticas localizadas ao redor da veia porta formam um manguito, chamado placa ductal, que acompanha suas ramificações e a partir do qual, por um processo progressivo de remodelamento, são formados os ductos biliares. Na DRPAR, contudo, o remodelamento das placas ductais é incompleto, levando à formação de espaços portais alargados pela presença de tecido conectivo e

numerosos ductos biliares tortuosos e dilatados. Estes espaços portais não apresentam o ducto interlobular central. Quando lesões similares são encontradas em ductos biliares de maior calibre, este quadro é denominado doença de Caroli. Em alguns casos, as estruturas biliares imaturas são progressivamente destruídas por colangite, resultando no seu desaparecimento gradual e substituição por fibrose periportal, o que determina o surgimento de um quadro conhecido como fibrose hepática congênita. A associação de fibrose hepática congênita com doença de Caroli é chamada de síndrome de Caroli.

É interessante traçar um paralelo entre as lesões observadas em rim e fígado. O desenvolvimento do rim metanéfrico se inicia com o brotamento de uma estrutura tubular, chamada broto ureteral, a partir de um ducto epitelial, o ducto de Wolff (Pohl e cols., 2000). As células do broto ureteral, induzidas por células do mesênquima metanéfrico, dão origem a diversas ramificações, em um processo denominado morfogênese por ramificação. Interações moleculares complexas entre mesênquima e broto ureteral acabam levando o primeiro a diferenciar-se em glomérulo e túbulos renais (do proximal até o distal) e o segundo a formar o sistema coletor. A gênese adequada do sistema coletor requer uma série de brotamentos acompanhados de crescimento vetorial, em um mecanismo possivelmente regulado por gradientes de fatores de crescimento e interações com células estromais e matriz extracelular. Durante este processo, assim como na organogênese hepática, há extenso remodelamento, incluindo possivelmente apoptose seletiva de grupos celulares. Além disso, o fenótipo menos diferenciado de células epiteliais que compõe os cistos renais acompanha-se da expressão persistente de genes normalmente expressos apenas em fases iniciais do desenvolvimento renal. Em

conjunto, estas semelhanças levaram à proposta de que as alterações encontradas na DRPAR estariam relacionadas a anormalidades na maturação durante o processo de diferenciação túbulo-epitelial renal e hepático (Calvet, 1993; Desmet, 1992).

Patogênese Molecular da Doença Renal Policística Autossômica Recessiva

Mutações em um único locus, *PKHD1* (*Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1*), são responsáveis por todas as formas típicas da doença. Estudos anteriores mapearam *PKHD1* no cromossomo 6p21.1-p12 (Zerres e cols., 1994; Guay-Woodford e cols., 1995). Este intervalo foi progressivamente refinado a 1 cM através da construção de uma série de mapas físicos e genéticos (Lens e cols., 1997; Mucher e cols., 1998; Park e cols., 1999). Um mapa de transcrição do intervalo mínimo foi construído utilizando-se buscas em bancos de dados, *screening* de bibliotecas de cDNA, análises de seqüências genômicas por meio de programas de predição de estrutura gênica, amplificações por RT-PCR e estudos de northern blot (Onuchic e cols., 2002). Um total de 35 conjuntos de genes, clones de cDNA, ESTs e produtos de RT-PCR não sobrepostos foram mapeados à região crítica. Transcritos com expressão renal foram priorizados para análise mutacional. A identificação de variações genéticas apenas em amostras de pacientes, em duas unidades gênicas distantes entre si por centenas de kb, porém com a mesma orientação e expressas em rim, sugeriu que tais unidades pertencessem a um mesmo transcrito. Análises subsequentes confirmaram tratar-se do gene de interesse, culminando com a identificação e caracterização do gene *PKHD1* (Onuchic e cols., 2002). Simultaneamente, usando uma estratégia distinta, um outro grupo também identificou *PKHD1* (Ward e cols., 2002). A partir de um modelo recessivo de DRP, o

rato PCK (*Polycystic Kidney*), os investigadores caracterizaram o ortólogo de *PKHD1*, permitindo a identificação subsequente do gene humano.

Uma abordagem baseada em produtos de RT-PCR obtidos a partir de moldes de cDNA de rins, com *primers* estrategicamente localizados, estabeleceu a sequência do cDNA completo e o quadro de leitura aberta mais longa e permitiu, em conjunto com a sequência do intervalo genômico, a definição da estrutura deste gene. O gene *PKHD1* se estende por um segmento genômico de pelo menos 469 kb e apresenta um mínimo de 86 éxons que se associam em múltiplas variantes de *splicing*. Análises por northern blot mostraram um sinal difuso e espalhado, compatível com a existência de muitos transcritos distintos. O gene se expressa predominantemente em rins fetal e adulto, menos intensamente em pâncreas e, em ainda menor intensidade, em fígado. Os demais tecidos testados foram negativos (Onuchic e cols., 2002), porém a dispersão de sinal não nos permitiu excluir expressão nos demais órgãos analisados.

O cDNA associado ao quadro de leitura aberta (QLA) mais longo foi deduzido a partir de dois clones de cDNA sobrepostos (clones 2.1 e 4.1 de Onuchic e cols., 2002). Com aproximadamente 12.6 kb e incluindo 67 éxons, este cDNA codifica uma proteína putativa de 4074 aminoácidos (aa), com um único domínio transmembrânico (TM), denominada poliductina. Sua porção extracelular possui mais de 3800 aa e inclui uma série de domínios IPT (*Immunoglobulin-like-Plexin-Transcription factor*) na região aminoterminal e múltiplas repetições PbH1 (*Parallel beta-Helix 1*) entre o último IPT e o domínio TM. A curta porção carboxi-terminal intracelular inclui sítios putativos de fosforilação dependente de cAMP/cGMP, potencialmente importantes para sua função. Poliductina também apresenta diversos

sítios de N-glicosilação e um único domínio arginina-glicina-aspartato (RGD). Este domínio é presente em diversas proteínas, como fibronectina, onde desempenha papel na adesão celular. Em sua forma não glicosilada, o peso molecular previsto para poliductina é de ~447 kDa.

Os domínios IPT apresentam uma topologia semelhante à de imunoglobulinas e estão presentes em duas classes de proteínas: fatores de transcrição intracelulares (família Rel) ou receptores de superfície celular com único domínio TM, membros da superfamília Sema (por exemplo HGFR, Ron e plexinas). Enquanto os membros da família Rel têm apenas um domínio IPT, virtualmente todos os receptores Sema apresentam múltiplos domínios IPT, freqüentemente dispostos em sequência (Tamagnone e cols., 1999). Esta homologia sugere um papel de receptor para a poliductina. No entanto, há diferenças importantes entre a estrutura de poliductina e destes receptores. A molécula de poliductina não contém os domínios Sema e PSI (*plexin/semaphorin/integrin*), típicos dos receptores Sema, nem o domínio tirosina quinase, que está presente na cauda intracelular do HGFR (Onuchic e cols., 2002). Estas diferenças sugerem que os mecanismos de ação potenciais da poliductina sejam distintos dos descritos para estes receptores. As repetições PbH1, por sua vez, são freqüentemente associadas a polissacaridases, onde desempenham papel essencial para a formação de sítios catalíticos e para a ligação a ligantes. A presença destes domínios na poliductina sugere que possa ter propriedades catalíticas similares.

O estudo das diferentes variantes de *splicing* permite prever que, se traduzidos, os produtos gênicos comporiam dois grupos: um deles, contendo o domínio TM, incluiria as proteínas provavelmente associadas à membrana plasmática (poliductina-M, incluindo o produto codificado pelo QLA mais longo); o

outro incluiria as proteínas sem o domínio TM que, portanto, podem ser secretadas (poliductina-S). A recente identificação de *PKHDL1* (Hogan e cols., 2003), um gene humano homólogo a *PKHDL1*, sugere fortemente relevância biológica para os produtos secretados potenciais de *PKHDL1*. *PKHDL1* é o ortólogo humano do gene de camundongo que codifica D86, uma proteína secretada por linfócitos. D86 constitui-se na proteína que apresenta o nível mais alto de homologia à poliductina, em função de uma distribuição também seqüencial de domínios IPT. À semelhança de *PKHDL1*, *PKHDL1* é um gene grande, com pelo menos 78 éxons e, aparentemente, também se associa a múltiplas variantes de *splicing* e codifica produtos potenciais associados à membrana e secretados.

O gene ortólogo a *PKHDL1* em camundongo, *Pkhd1*, foi recentemente identificado e caracterizado (Nagasawa e cols., 2002). Estudos por northern blot realizados em múltiplos tecidos de camundongo com duas sondas distintas mostraram um padrão de sinal difuso e espalhado em rim, similar ao observado para *PKHDL1*. Além disso, análises por hibridização *in situ* em múltiplos tecidos de camundongo em desenvolvimento mostraram expressão renal em mesonéfron no 15º dia embrionário (E15), persistindo em estruturas tubulares e ductos coletores de embriões e camundongos adultos; também se observou expressão hepática em placa ductal, ductos biliares intra e extra-hepáticos de pequeno e grande calibre, e expressão em parede muscular de grandes vasos, testículo primitivo, gânglios simpáticos, pâncreas e traquéia. O uso de duas sondas derivadas de dois éxons distintos (5 e 41) mostrou que transcritos presentes em parede de vasos de grande calibre incluíam o éxon 41, mas não o 5. Este resultado é consistente com a

existência de transcritos com arranjos exônicos específicos em diferentes estruturas e tecidos.

Até o momento, cinco estudos mutacionais foram realizados, sugerindo as primeiras correlações entre genótipo e fenótipo (Onuchic e cols., 2002; Ward e cols., 2002; Bergmann e cols., 2003; Furu e cols., 2003; Rossetti e cols., 2003). Estes estudos demonstraram a existência de mutações potencialmente patogênicas em toda a extensão do gene. A observação mais expressiva até o momento, contudo, foi a constatação de fenótipo severo em todos os pacientes que apresentavam mutações associadas ao truncamento do produto codificado pelo QLA mais longo em ambos os alelos. Outra observação importante foi a detecção de mutações em *PKHD1* em vários pacientes com manifestações fundamentalmente hepáticas, incluindo cirrose hepática congênita ou doença de Caroli (Rossetti e cols., 2003). Mais recentemente, o primeiro estudo sobre o padrão de expressão da poliductina foi concluído, revelando sua localização em broto ureteral e ductos coletores renais humanos, bem como em cílio primário de células MDCK em cultura (Ward e cols., 2003).

Neste contexto, a compreensão dos papéis funcionais dos produtos potenciais de *PKHD1* e dos mecanismos envolvidos na patogênese de DRPAR requeriam a caracterização básica destes produtos, uma avaliação abrangente e sistemática do perfil de expressão tecidual, celular e subcelular da poliductina e a caracterização de seu padrão de expressão temporal.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a análise do padrão de expressão da poliductina em tecidos humanos adultos normais e em tecidos de camundongos em várias idades embrionárias, utilizando metodologias que permitissem uma caracterização ampla e integrada dos produtos potenciais de *PKHD1* e de suas possíveis implicações funcionais. Para que este objetivo fosse alcançado, estabelecemos os seguintes objetivos específicos:

1. Gerar anticorpos específicos contra poliductina.
2. Caracterizar e validar os anticorpos gerados.
3. Caracterizar as propriedades bioquímicas básicas dos produtos potenciais de *PKHD1*.
4. Caracterizar o perfil de expressão tecidual e celular da poliductina.
5. Caracterizar o perfil de expressão temporal da poliductina.
6. Caracterizar o perfil de expressão subcelular da poliductina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Geração de anticorpos específicos para a poliductina

A identificação de regiões da molécula de poliductina com alto potencial de antigenicidade foi realizada utilizando-se o programa MacVector (Accelrys, Pharmacia Inc., Princeton, NJ, EUA). Foram selecionadas seis seqüências curtas: aa 1063-1082 (P1), aa 4050-4074 (P2), aa 426-440 (P3), aa 564-579 (P4), aa 3252-3266 (P5) e aa 3774-3785 (P6) para síntese de oligopeptídios, e duas seqüências longas, aa 265-443 (proteína de fusão 1, PF1) e a porção carboxi-terminal intracelular, aa 3884-4074 (proteína de fusão 2, PF2) para a geração de proteínas de fusão recombinantes. A posição destas seqüências na representação espacial da molécula de poliductina é mostrada na Figura 1, enquanto sua posição na respectiva seqüência peptídica encontra-se na Figura 2.

Figura 1 - Estrutura da molécula de poliductina codificada pelo quadro de leitura aberta mais longo do gene *PKHD1*. A posição das proteínas de fusão e dos peptídeos sintéticos usados na geração dos anti-soros policlonais é indicada.

Figura 2 – Sequência peptídica da molécula de poliductina codificada pelo quadro de leitura aberta mais longo de *PKHDI*. As seqüências dos peptídios sintéticos estão sublinhadas e as das proteínas de fusão em negrito. Vermelho: P3 e P4; verde: P1; azul: P5 e P6; laranja: P2; seqüência inicial em negrito: PF1; seqüência carboxi-terminal em negrito: PF2.

Os fragmentos de cDNA correspondentes às seqüências das proteínas de fusão foram amplificados por PCR a partir dos clones 2.1 e 4.1 (Onuchic e cols., 2002) utilizando *primers* contendo sítios de restrição para BamH1 ou EcoR1: PF1-forward 5'-GCGCGGATCCT- TTCCAGAAACTGGGAGCCT-3', PF1-reverse 5'-GCGCGAATTCTTACTTGGGA-GTCTTCTGCTGC-3'; PF2-forward 5'-GCGCGGATCCAGAAGCAAAAGCA-GAAAAAC-3', e PF2-reverse 5'-GCGCGAATTCTCACAGTTGCTCCTCAATAG-3'. O *primer* reverso correspondente a PF1 foi desenhado de forma a conter um códon de terminação TAA após a seqüência do inserto. O *primer* reverso correspondente ao produto 2, por sua vez, incluiu o códon de terminação próprio do gene. Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se os kits Microcon e Micropure Enzyme Remover (Millipore, Bedford, Mass., EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A quantificação aproximada da concentração de DNA foi feita por comparação de intensidade das bandas em gel de agarose 1%, visualizado por coloração com brometo de etídio (1µg/ml).

Os produtos selecionados foram clonados usando o vetor pAE (gentilmente cedido por Paulo Lee Ho, Instituto Butantan), gerado a partir dos vetores pRSET e pET 3-His, e a cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli*. O sistema pET utiliza plasmídios com os genes clonados sob controle de um sinal de transcrição do bacteriófago T7; a expressão é induzida quando a célula hospedeira produz a RNA polimerase T7. As vantagens deste sistema são a grande atividade da polimerase, uma vez que células induzidas concentram sua atividade metabólica na produção da proteína desejada, e a possibilidade de manter os genes silenciosos, bastando não induzir a célula. O pRSET é um plasmídio derivado do vetor pUC e apresenta um maior número de

cópias na célula hospedeira. Além do sítio para clonagem do inserto de DNA, que também está sob controle de um promotor T7, estes vetores possuem um “rótulo” com 6 histidinas. Esta sequência funciona como um domínio de ligação a metal, permitindo a purificação da proteína por cromatografia em coluna de níquel. Em adição, pRSET possui uma sequência para estabilização do transcrito e um sítio para clivagem por enteroquinase. O vetor pAE, portanto, apresenta as vantagens de pRSET, como maior número de cópias por célula e rótulo de histidina, associadas porém a um menor tamanho, a parte do sítio de clonagem do pET e a ausência da sequência de estabilização e do sítio de enteroquinase. Estas modificações reduzem o tamanho da proteína sintetizada sem afetar o desempenho do vetor. Neste caso, a seleção de bactérias contendo pAE é determinada pela adição de carbenicilina ao meio de cultura.

A célula hospedeira escolhida para transfecção dos plasmídios com inserto, BL21(DE3)pLysS, é uma cepa de *E. coli* que se caracteriza por apresentar resistência a cloranfenicol, por sintetizar T7 RNA polimerase quando induzida e por não conter as proteases lon e ompT, potencialmente capazes de degradar proteínas durante a purificação. Estas células procariotas produzem ainda lisozima T7, uma proteína bifuncional que cliva uma ligação específica na parede celular da bactéria e se liga à T7 RNA polimerase, inibindo a transcrição. A expressão desta lisozima em pequena quantidade, entretanto, não a torna capaz de inibir a função da T7 RNA polimerase induzida, não reduzindo a eficiência do sistema (Studier e cols., 1990). Em função destas particularidades, BL21(DE3)pLysS se associa a maior estabilidade da proteína e a regulação mais estrita de sua expressão. Esta cepa é portadora do lisógeno DE3 de bacteriófago lambda, o qual contém o gene *lacI*, o gene da T7 RNA polimerase

sob controle do promotor lacUV5 e uma pequena porção do gene lacZ. O repressor lac reprime a expressão da polimerase. Quando há adição de IPTG, a polimerase é expressa.

Com o propósito de prepará-los para a reação de ligação, os amplicons purificados e o vetor pAE foram submetidos a digestão com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI (NewEngland BioLabs, Beverly, Mass., EUA) por duas horas, a 55 °C. Os produtos das reações de digestão foram purificados utilizando os kits Microcon e Micropure Enzyme Remover, permitindo a remoção das extremidades produzidas pela digestão e das enzimas de restrição. Alíquotas corridas em gel de agarose permitiram comprovar a digestão e calcular as concentrações de DNA das amostras.

Procedemos à reação de ligação utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen Life Technologies, San Diego, Califórnia, EUA). As reações foram feitas em um volume de 10 µl, incluindo 50 ng do vetor, utilizando as proporções vetor:clone de 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5, a 14 °C por 16 h. A eletroporação foi realizada com 1 µl de pAE com inserto em 50 µl de células BL21(DE3)pLysS, com pulsos de 5-6 ms, 2.45 kV e resistência de 1290. As células foram suspensas imediatamente após em 1 ml de meio 2xTYCC (triptona 1,6%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5%, cloranfenicol 34 µg/ml, carbenicilina 100 µg/ml, pH7,4) e mantidas a 37 °C e 225 rpm por 60 min. A seguir foram plaqueadas em ágar 2xTYCC e incubadas a 37 °C por 16 h. O DNA plasmidial de algumas destas colônias foi então extraído e digerido com EcoRI e BamHI para verificação da presença de inserto. As seqüências dos insertos, por fim, foram confirmadas por seqüenciamento, utilizando *primers* flanqueadores contidos no vetor.

Colônias de bactérias transformadas com plasmídio de sequência confirmada foram plaqueadas em ágar 2xTYCC para obtenção de colônias isoladas. O crescimento destas colônias foi conduzido em suspensão de 2ml de meio 2xTYCC, a 37 °C por 16 h. A suspensão de bactérias assim obtida foi diluída em 50 ml de 2xTYCC e mantida a 37 °C e 225 rpm, até atingir uma densidade óptica de ~0,4, quando foi induzida com IPTG 1mM por 3h, a 37 °C e 225 rpm. Após este período, a suspensão foi centrifugada a 4.000 g por 20 min, a 4 °C. O pellet formado foi suspenso em tampão de uréia (uréia 8M, NaH₂PO₄ 100 mM, TrisHCl 10 mM, pH 8,0) e homogeneizado. O lisado assim obtido foi centrifugado a 10.000 g por 20 min. Este sobrenadante, contendo as proteínas de fusão, foi incubado com resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Alemanha) na proporção 4:1 e incubado por 60 min a 4 °C. A suspensão lisado-resina foi passada em coluna Poly-Prep (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), seguindo-se a eluição das proteínas recombinantes com tampão de uréia em pHs decrescentes (6,3; 5,9; 4,5). A quantificação das proteínas de fusão recombinantes foi feita através de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) associado a *Coomassie blue*, comparando-se a intensidade da banda de interesse com bandas correspondentes a diluições seriadas de quantidades conhecidas de albumina bovina.

Aproximadamente 2 mg de cada proteína de fusão foram enviados à Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, Texas, EUA) para imunização de coelhos e geração de anticorpos policlonais específicos. O protocolo utilizado pela companhia incluiu a imunização de dois animais por proteína recombinante e um período de doze semanas entre a imunização inicial e o sangramento de produção e purificação por afinidade. Os peptídios referidos foram sintetizados e utilizados para imunização em

coelhos seguindo o protocolo básico mencionado para as proteínas de fusão. Foram imunizados dois coelhos com P1 e P2, dois com P3 e P4 e dois com P5 e P6. A purificação por afinidade dos anticorpos correspondentes a P1 e P2 foi realizada em duas colunas distintas contendo P1 ou P2, enquanto os outros anti-soros foram purificados em colunas conjuntas P3+P4 e P5+P6.

Os controles negativos para as reações com estes anti-soros (AS) e anticorpos purificados (AS pAc) foram os soros pré-ímunes (PI) dos animais correspondentes, anti-soro imunodepletados nas colunas correspondentes (resinas fornecidas pela empresa Bethyl) e anticorpos purificados pré-competidos com as respectivas proteínas de fusão (incubação por 16 h a 4 °C, na proporção de 1:5).

Extração de proteína, imunoprecipitação e western blotting

Amostras de rim, fígado e pâncreas humanos adultos normais foram obtidas em centro cirúrgico a partir de tecidos ressecados por neoplasia pelas equipes cirúrgicas das Disciplinas de Urologia e de Transplante e Cirurgia do Fígado, do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da USP. O uso de tecidos humanos neste projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (protocolo de pesquisa 129/00). A análise histológica das margens dos tecidos coletados garantiu a ausência de comprometimento neoplásico nos fragmentos selecionados. O material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C.

A extração de proteína seguiu o protocolo previamente descrito, com pequenas modificações (Devuyst e cols., 1996). As amostras de tecido foram maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com um aparelho Potter em

tampão de homogeneização a 4 °C (sacarose 255 mM, HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 e coquetel de inibidores de protease (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA)) e centrifugados a 1.000 g por 20 min a 4 °C para remover núcleos e debris celulares. Para se obter as frações de membrana e solúvel, o extrato total, representado pelo sobrenadante inicial, foi centrifugado a 100.000 g por 30 min a 4 °C. O pellet, suspenso em tampão de homogeneização a 4 °C, constituiu a fração de membrana, enquanto o sobrenadante correspondente formou a fração solúvel. As proteínas presentes nos vários extratos foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Kit), comparando as medidas obtidas para as amostras à curva padrão de albumina bovina lida a 595 nm.

Os experimentos de imunoprecipitação foram realizados utilizando uma relação anticorpo purificado (α -PF2 pAc)/extrato total de rim de 20 μ g:1,5 mg. O extrato total foi incubado com α -PF2 pAc em tampão de imunoprecipitação (fosfato de sódio 20 mM, cloreto de sódio 150 mM, glicerol 10%, TritonX100 1%, pH 7.2 e coquetel de inibidores de protease) em agitação leve por 2 h a 4 °C. Seguiu-se uma segunda incubação de 2 h a 4 °C com a adição de 60 μ l de proteína A (*protein A sepharose 4 Fast Flow*, Amersham Biosciences, Sweden). Esta suspensão foi centrifugada a 400 g por 1 min e o pellet lavado por 3 vezes, ressuspenso em tampão de amostra (SDS 1.5%, TrisHCl 10 mM pH 6.8, DTT 0.6%, glicerol 6%) e desnaturado por 3 min a 97 °C.

Análises por western blot foram realizadas utilizando ~50 μ g de proteína desnaturada em tampão de amostra por poço. As amostras foram separadas em mini-géis SDS-PAGE 5% ou 7%, de 0,75mm de espessura, em tampão Laemmli (Tris 25mM, glicina 192 mM, SDS 3,4 mM, pH 8,3), utilizando-se 140 V e um tempo de

corrida que variou de 90 a 180 min de acordo com a natureza do experimento. A transferência para membranas PVDF (*Polyvinylidene fluoride*, Hybond-P, Amersham Biosciences, Sweden) foi feita em tampão de transferência a 4 °C (Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3), com amperagem fixa em 225 mA e por 120 min. A incubação primária foi feita com anti-soros não purificados e purificados, soros pré-imunes, soros imunodepletados e anticorpos purificados pré-competidos com proteína de fusão, dependendo da natureza do experimento. Foram testadas diluições que variaram de 1:250 até 1:5000. Os anti-soros α -PF2 e α -P5P6 mostraram-se os mais específicos, tendo sido selecionados para todas as análises apresentadas neste trabalho. A incubação secundária foi realizada com IgG α -IgG de coelho conjugada a peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), na diluição 1:2500. O procedimento de detecção empregado, por sua vez, foi o sistema baseado em quimioluminescência ECL (Amersham Biosciences, Sweden). Experimentos com o uso isolado do anticorpo secundário em diferentes concentrações garantiram que os resultados obtidos não se relacionaram a sinais inespecíficos associados a este reagente. Para a determinação do peso molecular da banda mais alta foram utilizados marcadores de alto peso molecular e separação em gel de acrilamida 3,5% (NaH₂PO₄ 28 mM, Na₂HPO₄ 72 mM, SDS 1%, acrilamida 3,5%), seguindo as especificações do fabricante (*Phosphorylase-b, cross-linked SDS molecular weight marker*, SIGMA, Saint Louis, Missouri).

Imunoistoquímica

Amostras de rins, fígados, pâncreas, glândulas mamárias, cólon e pulmões adultos humanos normais foram obtidas a partir de biópsias ou cirurgias realizadas por indicações médicas não relacionadas a este trabalho.

A obtenção de embriões de camundongos Swiss com idade bem definida foi possível controlando-se o período de exposição de fêmeas a machos e verificando-se a ocorrência ou não da cópula. Este procedimento é facilitado nestes animais, pois a ejaculação se acompanha de secreção de grande quantidade de muco, o que forma um tampão facilmente identificado na vagina. As fêmeas inseminadas foram separadas e sacrificadas para que se realizasse a cesárea nos dias desejados. Desta forma, obtivemos embriões de 8 a 19 dias embrionários (E8 a E19). Também foram sacrificados fetos de 1 a 10 dias (F1 a F10) e animais adultos de 3 meses.

Todos os tecidos utilizados para reações de imunoistoquímica foram fixados em formalina 10% e emblocados em parafina. Secções de 4 µm de tecido humano e 3 µm de tecido de camundongo foram montadas em lâminas com silane. As lâminas usadas nas reações de imunoistoquímica foram desparafinizadas em xilol e os fragmentos hidratados em baterias de etanol (absoluto, 95%, 80% e 50%). A exposição antigênica foi obtida por tratamento por 20 min em panela a vapor com TRS (Target Retrieval System, DAKO, Carpinteria, CA). O bloqueio de peroxidase endógena, por seu turno, foi realizado utilizando incubação em metanol 50%/H₂O₂ 3%. O tratamento que resultou em maior redução de sinais inespecíficos na reação foi a incubação em leite em pó desnatado 6% em PBS (*phosphate-buffered saline*, pH 7.4) por 30 min. A incubação com anticorpo primário foi realizada a 4 °C por 18 h, em secções seriadas de tecido.

De acordo com a natureza do experimento, foram utilizados os anti-soros α -PF2 ou α -P5P6, os soros pré-ímmes correspondentes, o anti-soro α -PF2 imundepletado (α -PF2/dep), anticorpo purificado α -PF2 pAc e anticorpo purificado α -PF2 pAc pré-competido (α -PF2 pAc/comp). Foram testadas várias diluições dos anticorpos primários, variando de 1:100 a 1:5000. Nos tecidos com sinais específicos, consideramos ideal a maior diluição que permitisse identificação específica das estruturas. Os experimentos controle também incluíram análises sem o uso de anticorpo primário. Amostras de rim humano também foram incubadas com anticorpos α -aquaporina-2 gerado em cabra (DAKO, Carpenteria, CA) e α -proteína de Tamm-Horsfall gerado em coelho (gentilmente cedido por Carlos Bacchi, UNESP, Brazil) para a confirmação de marcação em segmentos específicos do néfron. A incubação com anticorpo secundário foi feita seguindo as especificações do fabricante, utilizando EnVision+-Alkaline phosphatase e/ou LSAB (DAKO, Carpenteria, CA) em tecidos humanos e EnVison+-HRP (DAKO, Carpenteria, CA) em tecidos de camundongo. As análises imunoistoquímicas foram feitas utilizando-se técnicas baseadas em fosfatase alcalina e peroxidase. Nos estudos com α -aquaporina-2, no entanto, utilizamos apenas o sistema LSAB pelo fato do anticorpo primário ter sido gerado em cabra. Os experimentos em tecidos de camundongo, por sua vez, foram realizados usando o sistema EnVision+-HRP, dado que o anticorpo secundário adequado disponível era conjugado a peroxidase. A revelação com substrato cromogênico foi feita utilizando DAB (diaminobenzidina 0,6% em PBS com H₂O₂ 1%, filtrado) para anticorpos conjugados a peroxidase e Fast Red (DAKO, Carpenteria, CA) ou BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate/nitro blue tetrazoliumchloride*, DAKO, Carpenteria, CA), para anticorpos conjugados a

fosfatase alcalina, controlando-se o tempo de exposição de acordo com o anticorpo utilizado. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Carazzi para anticorpos com peroxidase e eosina para anticorpos com fosfatase alcalina. Após as reações, as lâminas foram lavadas, desidratadas em bateria de etanol (50%, 80%, 95% e absoluto) e montadas com Entellan (EMS, Hatfield, PA, EUA). A exposição ao cromógeno foi monitorada em todos os experimentos, sendo interrompida simultaneamente no fragmento incubado com o anticorpo específico e em seu respectivo controle. O tempo de exposição variou entre diferentes cromógenos, diluições e amostras.

Imunofluorescência em cultura de células IMCD

Os estudos de imunofluorescência foram realizados em células IMCD (*inner medullary collecting duct*), uma linhagem de células de ducto coletor (CDC) de medula renal interna de camundongo (Kizer e cols., 1995). O crescimento celular foi conduzido em meio DMEM/F12 (BioWhittaker/Fisher cat# 12-719Q) suplementado com soro fetal bovino 10% (BioWhittaker/Fisher Cat# 14-901E), penicilina 100 U/ml e streptomicina 100 mg/ml, em CO₂ 5%/ar 95% a 37 °C. Linhagens estáveis foram selecionadas com G418 400 µg/ml (BioWhittaker/FisherBP-673-5). As células foram plaqueadas a confluência em lamínulas de vidro (Fisher 12-545-82 12CIR-1D). Estudos por imunofluorescência foram realizados 3-4 dias após as células terem atingido a confluência, de forma a otimizar a polarização celular e a formação de cílio. As células foram lavadas em PBS, fixadas em paraformaldeído 1%, permeabilizadas com TritonX-100 0,2%, bloqueadas em soro fetal bovino 1% em PBS, incubadas por 60 min com α - α tubulina acetilada (diluída 1:200), α -FP2 pAc

(diluído 1:100) ou α -PF2/PI (diluído 1:500), lavadas com PBS e incubadas por 60 min com anticorpos secundários conjugados a fluoróforo (Molecular Probes). Controles com anticorpo secundário foram realizados para garantir que os resultados não se devessem a reações cruzadas inespecíficas. Núcleos foram corados com Hoescht 33528 (Sigma). As análises por microscopia de imunofluorescência foram realizadas com um microscópio invertido Nikon TE200. As imagens foram capturadas com câmera digital Roper Scientific Coolsnap FX-HQ e o programa MetaMorph (5.0).

Microscopia imunoeletrônica

Fragmentos de rins humanos adultos normais obtidos de nefrectomias foram fixados em paraformaldeído 4%, transferidos para glutaraldeído 0,2% e paraformaldeído 4% por 2 h. Foram então pós-fixados em paraformaldeído 8% e sacarose 2% em TBS 0,2 M (*Tris-buffered saline*, pH 7.4), desidratados em séries graduais de etanol e emblocados em resina L. R. White (London Resin Company, Ltd, Berkshire, England). Cortes finos foram montados em telas de níquel e processados para imunomarcção usando a técnica da proteína A-ouro (Timms, 1986), de acordo com o protocolo descrito previamente (Sandoval M.P. e cols., 1996). As telas foram lavadas em TBS, incubadas com ovalbumina 1% (fração V, sem globulinas) em TBS-Tween 20 0,05% por 30 min, incubadas a 4 °C por 16 h com anticorpo primário e tratadas com proteína A-ouro (*Protein-A colloidal gold particles of 10 nm*, Amersham Biosciences, Sweden) por 60 min à temperatura ambiente. Todos os passos foram seguidos por lavagens em TBS. Os complexos antígeno-anticorpo foram estabilizados com glutaraldeído aquoso 2%, corados com

tetróxido de ósmio aquoso 2% e contra-corado com acetado de uranila aquoso 4% e citrato de chumbo de Reynolds. O material foi analisado em um microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1010.

RESULTADOS

Geração e confirmação das proteínas de fusão

A amplificação dos produtos de PCR correspondentes às seqüências das proteínas de fusão 1 e 2, a clonagem no vetor pAE e transformação de células BL21pLys foram realizadas com sucesso. Os resultados correspondentes às várias etapas experimentais relativas à geração de PF2 são mostrados na Figura 3 (A e B). Várias preparações plasmídicas extraídas de clones de bactérias transformadas com sucesso foram seqüenciadas em ambas as direções, de forma a permitir a seleção de clones com seqüência e quadro de leitura corretos. Dois destes clones, um para cada proteína de fusão, foram submetidos a indução. Extratos de bactérias induzidas e não induzidas são mostrados na Figura 3C, observando-se a intensificação de uma banda de peso molecular de aproximadamente 29 kDa, tamanho compatível com a PF2. A purificação apropriada deste polipeptídeo é apresentada na Figura 3D. Aproximadamente 2 mg de cada proteína purificada foram utilizados na imunização de coelhos para geração de anticorpos policlonais. A sobreposição de seqüências entre P2 e PF2 e P3 e PF1 permitiu que, através de análises por western blot, confirmássemos a geração adequada de PF2 e PF1 e a especificidade de α -PF2, α -PF1, α -P2 e α -P3P4. Os resultados correspondentes a PF2 e α -PF2 são mostrados na Figura 4.

Figura 3 – Clonagem, síntese e purificação de PF2. A) Gel de agarose 1% mostrando o produto amplificado utilizado para clonagem, associado a PF2. B) Gel de agarose 1% de DNA plasmidial com inserto extraído de células eletroporadas. A coluna da esquerda mostra o plasmídio não digerido, enquanto a da direita mostra o plasmídio digerido com EcoRI e BamHI. (←→): DNA plasmidial. (←→): inserto de cDNA. C) Separação em SDS-PAGE 10% e detecção por Coomassie Blue de extratos protéicos de células não induzidas (coluna da esquerda) e induzidas (coluna da direita), correspondentes à PF2. (←→): PF2. D) Separação em SDS-PAGE 10% e detecção por Coomassie Blue para amostra de PF2 eluída com tampão de uréia em diferentes condições de pH. 1: *flow-through*; 2: pH 6,3; 3: pH 5,9; 4: pH 4,5. (←→): PF2 purificada.

Figura 4 – Verificação de PF2 e da especificidade de α -PF2. A) Western blot em SDS-PAGE 14%. Coluna da esquerda: *loading* de PF2; direita: *loading* de PF1. Detecção realizada com α -P2. B) Western blot em SDS-PAGE 10%. Coluna da esquerda: *loading* de PF2; direita: *loading* de PF1. Detecção realizada com α -PF2. O reconhecimento de PF2 por α -P2 e α -PF2 confirmam a sequência de PF2 e a especificidade dos anti-soros associados.

Análises por western blot

Os anti-soros contra a porção carboxi-terminal da poliductina (α -PF2) e contra dois peptídeos internos (α -P5P6) mostraram-se os mais específicos, tendo sido usados em todos os grupos experimentais apresentados nesta tese. Os demais anti-soros não identificaram bandas convincentemente específicas em extratos de tecidos humanos quando comparados a seus respectivos soros pré-ímmes.

Extratos totais, frações de membrana e frações solúveis de rim, fígado e pâncreas adultos normais foram analisados por western blot. Tais análises demonstraram bandas específicas de peso molecular >440 kDa em rim, fígado e pâncreas e de ~ 230 kDa em rim e fígado (Figuras 5 e 6). Estas bandas foram detectadas em extrato total e fração de membrana, com sinal mais fraco presente

também na fração solúvel de rim e fígado. O sinal obtido com o anti-soro α -PF2 para a banda de >440 kDa foi fraco, mas verificou-se um enriquecimento intenso e específico após sua purificação por afinidade. Uma banda específica adicional de ~ 140 kDa também foi detectada em extratos totais de rim, fígado e pâncreas, com sinal intenso em fração solúvel e bem mais fraco em fração de membrana (Figura 6). A intensidade relativa entre o sinal obtido para estas bandas em diferentes amostras variou significativamente. Uma outra banda de ~ 380 kDa foi detectada em rim por α -PF2, porém nossos estudos não permitiram concluir que fosse específica.

Além do reconhecimento já demonstrado por dois anti-soros distintos, utilizamos a estratégia de imunoprecipitação para demonstrar de forma definitiva que o produto maior tratava-se de um produto do gene *PKHD1*. Neste caso, a imunoprecipitação foi realizada com α -PF2 pAc a partir de extrato total de rim, enquanto a detecção por western blot foi feita com α -P5P6. A confirmação por imunoprecipitação da especificidade do produto >440 kDa é mostrada na Figura 7. Embora em menor intensidade, nossos dados também sugerem imunoprecipitação positiva da banda de ~ 230 kDa (Figura 7). Com a finalidade de determinar com maior precisão o peso molecular do produto maior, conduzimos experimentos adicionais de imunoprecipitação a partir de amostras de rim humano, desta vez seguidos de PAGE 3,5% e análise por western blot, utilizando marcadores de alto peso molecular. Estes estudos revelaram que a banda específica alta localiza-se entre os marcadores de 389,6 e 487,0 kDa, em posição mais próxima ao último marcador (Figura 8).

Figura 5 - Análise por western blot do perfil de expressão de poliductina em rim humano. A) Extrato total em SDS-PAGE 5%; detecção com α -PF2 pAc, α -PF2 pAc/comp, α -PF2 e α -PF2/dep. α -PF2 detecta a banda >440 kDa fracamente, enquanto o sinal é enriquecido após purificação por afinidade. B) Extrato total em SDS-PAGE 5%; detecção com α -PF2 pAc, α -P5P6 e soro pré-imune correspondente a α -P5P6, mostrando que anti-soros contra diferentes porções de poliductina detectam as bandas de >440 kDa e ~230 kDa. C) Extrato total em SDS-PAGE 7%; detecção com α -PF2 pAc mostrando o produto adicional de ~140-kDa. D) Frações de membrana (FM) e solúvel (FS) em SDS-PAGE 5%; detecção com α -PF2 pAc, mostrando enriquecimento da banda >440-kDa em FM. (→): bandas específicas >440 kDa e de ~230 kDa. (—●—): banda de ~380 kDa de natureza desconhecida. (—◆—): Banda inespecífica, detectada por soros pré-imune e imunodepletado.

Figura 6 – Análise por western blot do perfil de expressão de poliductina em fígado e pâncreas humanos. A) Extrato total (ET) de fígado em SDS-PAGE 7%; detecção com α -PF2 pAc e soro pré-imune (PI) correspondente a α -PF2. Bandas de >440 kDa, ~230 kDa e ~140 kDa foram detectadas de forma específica. B) Extrato total de pâncreas (ET), fração de membrana (FM) e solúvel (FS) em SDS-PAGE 7%; detecção com α -P5P6 e soro pré-imune (PI) correspondente a α -P5P6. As bandas de >440-kDa e ~140-kDa foram detectadas de forma específica em FM e FS, respectivamente. (→): Bandas específicas. (—◆): Banda inespecífica, detectada pelo soro pré-imune correspondente a a-PF2.

Figura 7 – As isoformas de >440 kDa e ~230 kDa da poliductina, imunoprecipitadas de extrato total de rim. Extrato total de rim (ET) e ET imunoprecipitado por α -PF2 pAc (IP) em SDS-PAGE 7%; detecção com α -P5P6 e soro pré-imune (PI) correspondente a α -P5P6. (→): Produtos imunoprecipitados de >440 kDa e ~230 kDa.

Figura 8 – Caracterização do peso molecular do maior produto identificado de *PKHD1*. Extrato total de rim imunoprecipitado por α -PF2 pAc (IP) comparado a marcadores de alto peso molecular em gel de poliácridamida 3,5%; detecção com α -P5P6 e soro pré-imune (PI) correspondente a α -P5P6. (→): Banda correspondente à maior isoforma de poliductina identificada.

Análises por imunoistoquímica em tecidos humanos

Nossos estudos de imunoistoquímica em rins adultos humanos normais foram realizados com a-PF2 e a-P5P6, revelando marcação de membrana e citoplasmática em células de ductos coletores e da porção ascendente espessa da alça de Henle (PAEAH) em córtex e medula (Figuras 9 e 10). Os sinais obtidos com ambos os anti-soros foram similares, enquanto os controles com os respectivos soros pré-ímmes, anti-soro a-PF2/dep e a-PF2 pAc/comp foram negativos.

Para confirmação das estruturas coradas pelos anticorpos a-poliductina, foram realizadas reações de imunoistoquímica em cortes seriados com a-aquaporina 2, marcador para ductos coletores, e a-proteína de Tamm-Horsfall, marcador para PAEAH. Estes resultados são apresentados na Figura 11.

Marcação específica também foi observada em epitélios de ductos biliares e pancreáticos de tecidos adultos humanos normais (Figuras 12 e 13). Também foram detectados sinais positivos em hepatócitos e ilhotas pancreáticas, porém os mesmos foram considerados inespecíficos por estarem presentes também nas reações com soros pré-ímmes e imunodepletados.

Outros tecidos analisados incluíram pulmão, glândulas parótidas, glândulas mamárias, cérebro, cólon e coração, não tendo sido observados sinais específicos em nenhum deles.

Figura 9 – Análise imunoistoquímica do perfil de expressão de poliductina em rim humano adulto normal, realizada com α -PF2. A) Análise com α -PF2 (a), mostrando marcação específica em ductos coletores e PAEAH em córtex; controle com soro pré-imune correspondente a α -PF2 (b), mostrando secções seriadas com ausência de sinal. Aumento original: x200. B) Análise com α -PF2 (a), mostrando marcação específica em ductos coletores e PAEAH em medula; controle com α -PF2 depletado (b), mostrando secções seriadas com ausência de sinal. Aumento original: x200. C) Análise com α -PF2 pAc (a), mostrando marcação específica em ductos coletores e PAEAH em medula; controle com α -PF2 pAc/comp (b), mostrando secções seriadas com ausência de sinal. Aumento original: x400.

Figura 10 – Análise imunoistoquímica do perfil de expressão de poliductina em rim humano adulto normal, realizada com α -P5P6. Análise com α -P5P6 (a, c, e) e com o respectivo soro pré-imune (b, d, f), mostrando marcação específica em córtex (a, c) e medula (e), e ausência de marcação em secções seriadas (b, d, f). Aumento original: a, b: x200; c, d, e, f: x400.

Figura 11 - Confirmação por anticorpos segmento-específicos da expressão de poliductina em ductos coletores e PAEAH em rim humano adulto normal. Estudos de co-localização em secções seriadas de córtex (A) e medula (B) renais. α -PF2 (a) marca ductos coletores (seta amarela) e PAEAH (seta preta); α -aquaporina 2 (b) marca ductos coletores (seta amarela); α -proteína de Tamm-Horsfall (c) marca PAEAH (seta preta). Aumento original: x200.

Figura 12 – A análise imunoistoquímica do perfil de expressão de poliductina em fígado humano adulto normal revelou marcação específica em ductos biliares intra e extra-hepáticos. Análises com α -PF2 (a, c) e controle com o respectivo soro pré-imune (b, d), mostrando marcação específica em ductos biliares. Aumento original: a, b: x200; c, d: x400.

Figura 13 – A análise imunoistoquímica do perfil de expressão de poliductina em pâncreas humano adulto normal demonstrou marcação específica em epitélio ductal. Análises com α -PF2 (a, c) e com o respectivo soro pré-imune (b, d); com α -P5P6 (e, g) e com o respectivo soro pré-imune (f, h), mostrando marcação específica em ductos pancreáticos. Aumento original: a, b e, f: x200; c, d, g, h: x400.

Análises por imunistoquímica em embriões de camundongo

O perfil de expressão da poliductina durante o desenvolvimento embrionário foi avaliado por imunistoquímica em camundongos. Embora os anticorpos tenham sido gerados contra porções da molécula humana, o nível de identidade entre *PKHDI* e seu homólogo em camundongo, particularmente das porções correspondentes aos epitopos usados na geração de P5 e P6, nos sugeriu a possibilidade de usar a-P5P6 e a-PF2 contra tecidos murinos.

Análises com ambos os anti-soros em tecidos de embriões de 15 a 19 dias (E15-E19) mostraram marcação específica em broto ureteral, mas não em mesênquima metanéfrico, corpos em S e glomérulos (Figura 14). Também foram observados sinais específicos em epitélio ductal biliar intra e extra-hepático e alguns hepatócitos a partir de E15, mas não no tecido hematopoiético embrionário circunjacente (Figura 15). Ductos pancreáticos também revelaram marcação específica (Figura 16A). Glândulas salivares identificadas em E19 também apresentaram sinal específico em epitélio ductal (Figura 16B). Enquanto ambos os anti-soros marcaram os epitélios ductais de pâncreas e glândula salivar especificamente, apenas a-PF2 pAc marcou os ácinos nesses tecidos.

Não houve diferença entre os sinais obtidos com anti-soros, soros pré-imunes, anti-soro imunodepletado e anticorpo purificado pré-competido em pulmão, coração, cérebro, intestino e gânglios simpáticos dorsais, sugerindo marcação inespecífica destas estruturas nas idades pesquisadas.

Figura 14 – Análise imunoistoquímica do padrão de expressão de poliductina em rim de embrião de camundongo. Observa-se marcação específica em broto ureteral e estruturas tubulares em E15 (a: detecção com α -PF2 pAc, b: detecção com α -P5P6), em E17 (c,d: detecção com α -PF2 pAc; e,f: detecção com α -P5P6) e em E18 (g,h: detecção com α -P5P6). Aumento original: a, b,c,e,g: x200; d, f,h: x400.

Figura 15 – Análise imunoistoquímica do padrão de expressão de poliductina em fígado de embrião de camundongo. Observa-se marcação específica em alguns hepatócitos peri-venulares em E15 (a: detecção com α -PF2 pAc); em E17, marcação específica de vias biliares intra e extra-hepáticas e em alguns hepatócitos formando grupos no parênquima ou peri-venulares (b,c: detecção com α -PF2; d: detecção com α -P5P6). Aumento original: a, b: x200; c, d: x400.

Figura 16 – Análise imunoistoquímica do padrão de expressão de poliductina em pâncreas e glândula salivar de embriões de camundongo. A) Marcação específica em ductos pancreáticos em E17 (a,b: detecção com α -PF2 pAc; c,d: detecção com α -P5P6). Ácinos foram marcados exclusivamente por α -PF2 pAc (a,b). Aumento original: a,c: x100; b,d: x200. B) Marcação específica em ductos salivares em E19 (a,b: detecção com α -PF2 pAc; c,d: detecção com α -P5P6). Ácinos foram marcados exclusivamente por α -PF2 pAc (a,b). Aumento original: a,c: x100; b,d: x200.

Análise de co-localização subcelular por imunofluorescência

Dadas as limitações das técnicas imunoistoquímicas para avaliações de localização subcelular, usamos análise de imunofluorescência para a caracterização da localização subcelular da poliductina. Tais experimentos foram realizados em células IMCD em cultura. Os experimentos com α -PF2 pAc demonstraram marcação em domínios apicais na superfície celular, numa distribuição de co-localização com α -tubulina, um constituinte do axonema ciliar (Figura 17). Os controles com soro pré-imune foram negativos nesta organela. Sinal citoplasmático foi observado com α -PF2 pAc. Embora os controles com soro pré-imune também fossem positivos em citoplasma, a intensidade do sinal era bastante inferior, sugerindo especificidade para o sinal observado. Os controles com anticorpos secundários foram negativos.

Figura 17 - Análise por imunofluorescência revela co-localização de poliductina e α -tubulina acetilada em cílio primário de células IMCD de camundongo em cultura.

A) Expressão ciliar e citoplasmática de poliductina (marcação com α -PF2 pAc). B) Expressão de α -tubulina acetilada, um marcador de cílio, em cílio primário. C) Imagem composta pela sobreposição de A e B, mostrando co-localização, em amarelo, de poliductina e α -tubulina em cílio.

Análises por microscopia imunoeletrônica

Análises por microscopia imunoeletrônica em tecido renal adulto humano normal e em rim de camundongo adulto foram realizadas utilizando α -PF2 e α -P5P6. Ambos os anti-soros apresentaram padrão similar de marcação, que incluiu sinal em células de ductos coletores. Em humanos, sinal de menor intensidade também foi detectado em células da porção ascendente espessa da alça de Henle. Sinal específico pôde ser detectado em cílio primário apical em CDCs humanas e de camundongo, enquanto partículas de ouro não foram identificadas nos controles negativos com anti-soro imunodepletado e com anticorpo pré-competido (Figura 18A). Os sinais ciliares foram observados na transição corpo basal-axonema e em axonema.

Marcação luminal específica também foi identificada em membrana citoplasmática de CDCs humanas e de camundongo (Figura 18B). Sinais citoplasmáticos também foram detectados, porém foram aparentemente inespecíficos, por terem sido observados também nos controles negativos com anti-soro imunodepletado e com anticorpo pré-competido. Análises de túbulos proximais também sugerem sinais inespecíficos, por apresentarem a mesma intensidade de marcação que os controles negativos.

Figura 18 - Análise por microscopia imunoelétrica revela sinal poliductina-específico em membrana apical e cílio primário de células de ducto coletor humano. A) Marcação poliductina-específica em cílio primário humano com α -FP2. A imagem sugere dois cortes através da estrutura ciliar, dando origem a duas porções distintas do mesmo cílio visualizadas nesta secção. O inserto com o esquema (parte superior) indica a provável orientação do cílio. O padrão de marcação observado na porção média do cílio não foi observado em nenhuma outra estrutura avaliada, sugerindo fortemente marcação ciliar e suportando a orientação proposta para a organela. Aumento original: x40000 (inserto inferior: x6000). B) Marcação poliductina-específica em membrana apical detectada com α -FP2 (a); imagem de controle negativo mostrando marcação ocasional e inespecífica com α -FP2/dep (b). Aumentos originais: a: x60000 (inserto: x6000); b: x60000 (inserto: x5000). Setas e colchetes: partículas de ouro.

DISCUSSÃO

O complexo padrão de *splicing* associado a *PKHD1* é uma de suas características mais marcantes (Onuchic e cols., 2002). A diversidade de transcritos demonstrada e a forte evidência de um grande número de variantes de *splicing* sugerem a possibilidade de que esta propriedade esteja intimamente relacionada a seus papéis funcionais. Embora esta multiplicidade considerável de transcritos alternativos seja uma característica incomum em genes de mamíferos, há outros exemplos de genes que seguem perfis complexos de *splicing* (Black, 2000; Tian e cols., 2001; Xie e McCobb, 1998). As neurexinas, por exemplo, apresentam estruturas potencialmente capazes de codificar de centenas a milhares de isoformas, num processo aparentemente relacionado a variabilidade e relevância biológica (Missler e Sudhof, 1998; Tabuchi e Sudhof, 2002). Por meio de *splicing* alternativo, os três genes desta família dão origem a produtos de sequência e tamanhos diferentes, classicamente expressos em neurônios e envolvidos no desenvolvimento celular neuronal. Analogamente ao que se supõe para a poliductina, algumas isoformas se localizam na membrana, onde funcionam como receptores, enquanto outras são secretadas. As características de *splicing* semelhantes entre os produtos de *PKHD1* e as neurexinas e sua similaridade estrutural geral sugerem fortemente

que o grande número potencial de poliductinas possa de fato ter importância funcional.

Outras observações dão sustentação a esta hipótese. A recente identificação e caracterização de *Pkhd1*, o gene ortólogo de camundongo, demonstrou que este complexo padrão de *splicing* é conservado nesta espécie (Nagasawa e cols., 2002). Além disso, análises de hibridização *in situ* revelaram um padrão não homogêneo de expressão de transcritos de *Pkhd1* em diferentes tecidos/estruturas de camundongo. A ainda mais recente identificação e caracterização de *PKHDL1*, um gene humano homólogo a *PKHDL1*, revelou que também este gene apresenta múltiplos transcritos que, se traduzidos, poderiam gerar proteínas ancoradas à membrana e secretadas, como a proteína D86 (Hogan e cols., 2003). Há indícios de que este gene seja expresso em linfócitos T ativados, podendo ter uma função específica na imunidade celular, onde a complexidade da integração entre estímulos e resposta biológica é bastante pronunciada. Estas observações sugerem que os múltiplos produtos de *PKHDL1* sejam essenciais na integração de estímulos e respostas envolvidos na organogênese, particularmente renal e biliar, e na diferenciação epitelial terminal.

Poliductina apresenta homologia significativa a receptores de membrana celular com um único domínio TM, tais como HGFR e as plexinas (Onuchic e cols., 2002; Ward e cols., 2002; Tamagnone e cols., 1999). Esta homologia, baseada na presença de múltiplos domínios IPT em sequência, sugere que as formas de poliductina ancoradas à membrana, incluindo o produto do QLA mais longo, possam funcionar com receptores de superfície celular. As repetições PbH1, por sua vez, dado seu papel potencial no reconhecimento e na modificação de carboidratos, poderiam conferir às isoformas de membrana atividade enzimática. Por fim, os

produtos sem o domínio TM poderiam ter como papel primário a função de ligantes. Em conjunto, estas análises sugerem que as poliductinas poderiam funcionar como receptores e/ou enzimas ancorados à membrana celular e/ou ligantes (Figura 19). Assim, o efeito final das diversas isoformas poderia ser determinado pela soma de suas ações, que poderiam variar em diferentes tecidos, situações funcionais e estágios de desenvolvimento de órgãos.

Figura 19 – Possíveis papéis funcionais para as poliductinas.

Frente a estas informações e análises, a confirmação da multiplicidade de isoformas e a caracterização do padrão bioquímico básico dos produtos mais expressos era essencial. Além disso, o padrão de expressão da poliductina em tecidos e a localização subcelular das isoformas potenciais poderia conduzir a informações fundamentais para a compreensão de seus papéis funcionais. A geração de anticorpos específicos, portanto, era fundamental para a realização de estudos que respondessem a estas questões. Neste trabalho, as proteínas PF1 e PF2, usadas na geração de

anticorpos policlonais, foram confirmadas pela detecção específica com anti-soros independentes contra epitopos presentes em sua sequência peptídica. Além disso, a análise do padrão de bandas obtido por western blot mostrou que as bandas reconhecidas de forma específica por α -PF2 também o foram por α -P5P6. Estes anti-soros constituíram-se, portanto, nos anti-soros fundamentais usados neste trabalho.

Nossos resultados iniciais de western blot, realizados em tecidos humanos, mostraram três produtos potencialmente relacionados a *PKHDI*. A banda de peso molecular >440 kDa, expressa em rim, fígado e pâncreas, foi detectada em extratos totais e frações de membrana correspondentes, com ausência (em pâncreas) ou intensa redução (em rim e fígado) de sinal em fração solúvel. Seu peso molecular consistente com o do produto glicosilado e sua expressão em fração de membrana sugerem fortemente que esta banda corresponda ao produto codificado pelo QLA mais longo. Outra banda, de ~ 230 kDa, foi detectada em rim e fígado. Embora bandas de mesmo peso molecular tenham sido detectadas por dois anti-soros contra porções distintas da poliductina, sugerindo que se tratassem do mesmo produto, a confirmação de sua especificidade foi obtida através de experimentos de imunoprecipitação. Nós procuramos estabelecer vários níveis de evidência para confirmar especificidade dos produtos detectados, de modo a minimizar as possibilidades de artefatos experimentais. A banda de >440 kDa e, em intensidade bastante reduzida, também a de ~ 230 kDa foram imunoprecipitadas com α -PF2 pAc a partir de extratos totais de rim humano e detectadas com α -P5P6. Este último produto representa possivelmente uma isoforma de menor peso molecular ancorada à membrana. A terceira banda específica, de ~ 140 kDa, apresentou expressão

predominante em fração solúvel de rim, fígado e pâncreas. No entanto, mesmo tendo sido detectada por ambos os anti-soros, não foi possível imunoprecipitá-la.

Embora as bandas de >440 kDa, ~230 kDa e ~140 kDa tenham sido detectadas sempre que pesquisadas nos órgãos em que se expressam, sua intensidade relativa diferiu intensamente entre amostras diferentes de um mesmo órgão. Especulamos que tal observação possa se dever a diferentes susceptibilidades à degradação ou a expressões diferenciais associadas a situações funcionais específicas.

As evidências experimentais suportam que as bandas de menor peso molecular devam representar produtos codificados por transcritos alternativos e não produtos de degradação da isoforma de >440 kDa. Primeiramente, a banda de ~230 kDa esteve sistematicamente ausente em pâncreas, tecido onde a banda de >440 kDa foi sempre nítida. Além disso, a banda de ~140 kDa, também detectada pelo anti-soro anti-extremidade carboxi, representa provavelmente um produto solúvel, contrastando com o padrão de expressão da banda >440 kDa. A dificuldade em se precipitar a banda de ~140 kDa e o fraco sinal obtido para a banda de ~230 kDa após precipitação com α -PF2 pAc poderiam, em tese, decorrer de propriedades específicas do anti-soro utilizado e/ou a graus distintos de desnaturação a que a amostra é submetida durante o procedimento de imunoprecipitação.

Uma quarta banda de ~380 kDa foi detectada em rim por α -PF2, seguindo-se de enriquecimento após purificação por afinidade (detecção com α -PF2 pAc). No entanto, esta banda apresentou grande variação de intensidade entre amostras diferentes de mesmos órgãos, estando por vezes ausente. Além disso, esta banda não foi detectada por α -P5P6. É improvável que esta banda represente um produto de

degradação, visto que nesse caso, dadas as posições dos epitopos geradores de α -PF2 e α -P5P6, a banda deveria ser detectada por ambos os anti-soros. É possível que esta banda corresponda a um outro produto alternativo de *PKHDI*, que contenha a porção carboxi-terminal, mas não as seqüências peptídicas correspondentes a P5 e P6. Sua ausência ocasional em amostras estudadas, contudo, torna esta hipótese questionável. A real natureza desta banda, portanto, permanece desconhecida.

As isoformas de >440, ~230 e ~140 kDa caracterizadas neste trabalho podem ser os mesmos produtos identificados recentemente por Ward e cols. Neste estudo, os autores utilizaram anticorpos monoclonais também contra a porção carboxi-terminal da poliductina (aa 3883-4074). Seus estudos de western blot em rins humanos demonstraram a presença uma banda forte de >450 kDa e, com menor intensidade, uma de ~220 kDa. O produto maior, e por vezes o menor, também foram detectados em rins de camundongos e ratos adultos. Análises por western blot em rins de pacientes com DRPAR, por sua vez, mostraram ausência de ambas as bandas, sugerindo especificidade para os produtos correspondentes. Estudos em fígado de camundongos demonstraram, por fim, detecção fraca do produto de >450 kDa, moderada do de ~220 kDa e a presença de um produto adicional de ~150 kDa.

Apesar da semelhança entre os pesos moleculares dos produtos que identificamos e dos produtos reportados por Ward e cols., há diferenças importantes entre os dois estudos. Nossos resultados identificam os dois produtos menores como isoformas expressas em níveis consideravelmente mais altos que no estudo desses investigadores. Além disso, sugerimos que os produtos identificados incluam proteínas solúveis e ancoradas à membrana, enquanto Ward e cols. consideram que, por serem reconhecidas por um anticorpo contra a porção carboxi-terminal, as três

proteínas devam ser associadas à membrana. Resultados prévios de nosso grupo, contudo, mostram que tal suposição não é verdadeira. Afinal, um dos transcritos de camundongo parcialmente caracterizados (produto 6,1 da Figura 1 de Nagasawa e cols., 2002) codifica uma proteína putativa com uma cauda carboxi-terminal mais curta e sem o domínio TM Além disso, Ward e cols. sugerem a possibilidade de que as bandas mais baixas representem produtos de degradação, uma explicação não suportada por nossos resultados. Deve-se mencionar, contudo, que Ward e cols. utilizaram, à exceção dos rins, apenas tecidos não humanos em seus estudos de expressão.

O reconhecimento de três produtos distintos usando apenas dois anti-soros indica que *PKHDI* codifica várias isoformas e sugere que uma geração mais abrangente de anticorpos deverá levar à identificação e caracterização de um número consideravelmente maior de produtos alternativos. Além disso, nosso estudo inicial de expressão em frações celulares suporta a existência de produtos ancorados à membrana e solúveis. Com base no padrão de expressão gênica previamente relatado (Onuchic e cols., 2002), no entanto, poderia se esperar um número significativamente maior de produtos traduzidos do que o encontrado, mesmo considerando-se o número limitado de domínios utilizados para geração de nossos anticorpos. Algumas possibilidades poderiam explicar esta observação: a) produtos traduzidos alternativos poderiam ser expressos durante períodos específicos e/ou tecidos/tipos celulares específicos; b) um número significativo de polipeptídios alternativos poderia ser gerado em pequenas quantidades, não detectáveis por western blot; c) um grande número de transcritos alternativos pode não ser traduzido; e d) parte do sinal arrastado observado nos experimentos de northern blot (Onuchic e cols., 2002)

poderia ser secundário a degradação de mRNA. Além disso, uma combinação dessas possibilidades poderia explicar os resultados observados.

A análise do perfil de expressão por imunistoquímica demonstrou marcação cortical e medular em ductos coletores renais, um padrão consistente com as características histológicas básicas observadas na DRPAR. A marcação em porção ascendente espessa de alça de Henle, por sua vez, não era esperada. No entanto, é importante notar que estudos cuidadosos de microdissecção em rins com DRPAR evidenciaram que o ângulo da alça de Henle é local de pequenos cistos em 30% dos néfrons (Osathanondh e Potter, 1964). Distúrbios potenciais na PAEAH, por sua vez, poderiam contribuir para a hiponatremia associada à DRPAR por comprometerem a capacidade de excreção de água livre. A confirmação de sinal nestes segmentos foi obtida por reações de imunistoquímica com os marcadores tubulares específicos α -aquaporina 2, para ductos coletores, e α -proteína de Tamm-Horsfall, para porção ascendente espessa da alça de Henle. Tais estudos, realizados em cortes seriados, revelaram que as marcações testes e controles se sobrepunham nestas estruturas. Também houve marcação em ductos biliares, achado consistente com a disgenesia biliar associada à DRPAR. A marcação obtida em dois órgãos normais já completamente diferenciados sugere papéis funcionais para a poliductina também em tecidos maduros. O sinal específico em ductos pancreáticos também pode ser compatível com um fenótipo pancreático, aparentemente raro, associado à DRPAR (Uhari e Herva, 1979). O envolvimento de epitélios ductais na DRPAR levou-nos a avaliar a expressão da poliductina em estruturas ductais de outros órgãos, como glândulas salivares e mamária. Tais estudos, no entanto, não revelaram marcação específica. Por fim, analisamos seu perfil de expressão em pulmão, dada a detecção

prévia de expressão gênica por northern blot, em cólon, dada sua semelhança funcional com os ductos coletores renais, e em cérebro. Sinais de intensidade semelhante, entretanto, foram detectados por anti-soros, soros pré-ímmunes, anti-soro imunodepletado e anticorpo purificado pré-compétido, sugerindo marcação inespecífica nestes tecidos. Também detectamos marcação inespecífica em hepatócitos e ilhotas pancreáticas. Estes resultados não permitem excluir, contudo, a possibilidade de expressão bastante reduzida de poliductina nesses tecidos/estruturas. Por outro lado, faz-se importante mencionar que nossos dados são consistentes com as análises prévias por northern e hibridização *in situ*.

O trabalho recente de Ward e cols. descreve padrões imunoistoquímicos semelhantes aos nossos. Em rins infantis normais, foi detectada marcação em ductos coletores e alças de Henle, enquanto em rins adultos os sinais foram encontrados principalmente em ductos coletores medulares. No momento não temos explicação para esta pequena discrepância com nossos resultados. Os autores também relatam marcação em ductos biliares e pancreáticos, testículo e glândula adrenal. Sinais mais fracos foram observados em hepatócitos e ilhotas pancreáticas.

O padrão de expressão da poliductina durante a organogênese foi estudado em camundongos para que os diferentes estágios de desenvolvimento pudessem ser caracterizados. A marcação em broto ureteral sugere que as alterações de ductos coletores observadas na DRPAR ocorram como consequência de um defeito primário neste segmento. A ausência de marcação específica no mesênquima metanéfrico, nos corpos em S (estruturas que darão origem aos glomérulos) e nos próprios glomérulos, por sua vez, está de acordo com o aparente envolvimento mínimo ou nulo de outras porções do néfron na patogênese da DRPAR. A marcação intensa e específica em

ductos biliares intra e extra-hepáticos também são consistentes com a hipótese de anormalidade da maturação biliar e renal no processo de diferenciação túbulo-epitelial, proposta para DRPAR. A presença de sinal positivo em ductos pancreáticos também suporta o conceito de que poliductina estaria envolvida no processo de diferenciação terminal de vários epitélios ductais. Além disso, o padrão de marcação em ácinos observado em pâncreas e glândula salivar é consistente com a existência de transcritos estrutura-específicos, relatada por Nagasawa e cols. (Nagasawa e cols., 2002).

A presença de sinal específico em alguns hepatócitos em fases tardias do desenvolvimento hepático no camundongo contrasta com a ausência de marcação específica em hepatócitos de fígado humano adulto. Estas observações levantam a possibilidade de que as células fetais marcadas estejam destinadas a se diferenciar em outras estruturas, contribuindo para a formação do trato biliar (Lemaigre, 2003). Embora o sinal negativo observado no componente ductal de alguns tecidos humanos como glândulas salivar e mamária sugiram que poliductina não seja expressa na totalidade dos epitélios tubulares adultos, a marcação específica observada em ductos de glândulas salivares de embriões de camundongos em E19 abre duas possibilidades: que a poliductina seja expressa amplamente em epitélios tubulares de tecidos em desenvolvimento; ou que os anti-soros utilizados neste estudo não foram capazes de detectar sinais positivos específicos em amostras de tecidos adultos humanos.

Com o intuito de avaliar o padrão de distribuição subcelular da poliductina, associamos estudos de microscopia imunoeletrônica em tecido renal medular humano e de camundongo a análises de co-localização por imunofluorescência em

células IMCD de camundongo em cultura. Estes procedimentos revelaram marcação em cílio primário, mostrando co-localização de poliductina com α -tubulina em axonema de células IMCD e depósitos de partículas de ouro na transição corpo basal-axonema e no axonema propriamente dito.

Os cílios primários, também denominados não-móveis, são compostos por um cilindro de membrana celular envolvendo os nove pares de microtúbulos, formando o axonema. Os microtúbulos se originam de um centríolo, o corpo basal. Nos cílios móveis, a estrutura é modificada pela presença de alguns componentes, entre os quais a dineína, proteína que participa da ligação entre pares de microtúbulos adjacentes, e um par central extra de microtúbulos, conectado aos demais por eixos radiais e nexina (Scholey, 2003). Com exceção das células intercalares dos ductos coletores renais, todas as demais células epiteliais renais apresentam um cílio primário que, acredita-se, possa funcionar como mecano-sensor de fluxo, aumentando o cálcio intracelular (Praetorius e Spring, 2001). Vários trabalhos sugerem que a formação e a manutenção do cílio dependem de um processo de transporte entre o corpo basal e a extremidade do cílio, denominado transporte intraflagelar (TIF) (Rosenbaum e cols., 1999). O material a ser transportado se acumula inicialmente no corpo basal, onde se associa a fibras que se estendem do corpo basal até a membrana. A seguir formam o complexo carga-motor de TIF, denominado quinesina II, que é transportado ao longo do axonema. Na extremidade do cílio, a carga se dissocia da quinesina que, por sua vez, se transforma em carga. A quinesina liga-se então à dineína, o motor de TIF que a transporta de volta ao corpo basal (Scholey, 2003).

A observação inicial de que a ausência do gene de *C. elegans osm-5*, homólogo a um gene associado a DRP em camundongo, acarretava defeitos na ciliogênese levou à hipótese de que anormalidades estruturais ou funcionais ciliares pudessem resultar em DRP (Qin e cols., 2001). Desde então, vários estudos têm provido informações que suportam esta tese, mostrando que diversas proteínas associadas às DRPs se expressam no cílio apical de células epiteliais renais. Policistinas 1 e 2, relacionadas à doença renal policística autossômica dominante (DRPAD), interagem no nível da membrana plasmática, formando um canal de cátion não seletivo permeável a cálcio (Hanaoka e cols., 2000). Estas proteínas foram detectadas em axonema, onde poderiam regular a fluxo intracelular de cálcio dependente da movimentação ciliar (Yoder e cols., 2002). A cistina, produto do gene *cpk*, mutado em um modelo murino de DRPAR, também foi detectada em axonema, onde poderia ter um papel na estabilização de microtúbulos (Hou e cols., 2002). A proteína polaris, por sua vez, constitui-se no produto do gene *Tg737*; seu alelo hipomórfico presente no camundongo *Tg737^{orpk}* está associado a um fenótipo que inclui cistos renais e alterações hepáticas, pancreáticas e esqueléticas. Esta proteína também foi encontrada em corpo basal e axonema ciliar, podendo funcionar como suporte para associação entre as proteínas responsáveis pelo TIF (Taulman e cols., 2001).

Mais recentemente, demonstrou-se que também a inversina, produto do gene *NPHP2*, localiza-se em corpo basal, e que a nefrocistina, produto do gene *NPHP1*, co-localiza-se com a β -tubulina, um componente do axonema (Otto e cols., 2003). A nefrocistina 3, produto do gene *NPHP3*, por sua vez, interage com a nefrocistina, tornando bastante provável que também se expresse no cílio (Olbrich e cols., 2003).

Disfunções nestas proteínas estão envolvidas na patogênese do complexo nefronoftise/doença medular cística. É importante mencionar que a inversina interage com Apc2, uma proteína pertencente ao complexo promotor de anáfase, regulador do ciclo celular (Morgan e cols., 2002). Esta associação poderia permitir que sinais gerados em cílio controlassem o crescimento de células epiteliais, determinando sua diferenciação terminal, um processo comprometido na DRPAD (Boletta e cols., 2000; Bhunia e cols., 2002). Outra evidência importante do envolvimento potencial do cílio em DRP vem do modelo murino de inativação condicional do gene *Kif3a*, que codifica uma das unidades de quinesina II, em células epiteliais renais (Lin e cols., 2003). Os camundongos *knock-out* não apresentam cílio e desenvolvem cistos.

A localização de poliductina em cílio primário foi mostrada em dois estudos recentes. No primeiro, Ward e cols. utilizaram células MDCK (*Mandin Darby Canine Kidney*), que formam longos cílios primários em cultura. Neste trabalho, os pesquisadores mostram co-localização de α -tubulina e poliductina, obtendo resultados equivalentes aos nossos. Posteriormente, Masyuk e cols. (Masyuk e cols., 2003), utilizando os anticorpos gerados por Ward e cols., estudaram a localização de poliductina em colangiócitos de fígados normais e de ratos PCK, animais portadores de mutações em seu ortólogo de *PKHD1* e dilatações no trato biliar. Estas análises demonstraram expressão de poliductina no cílio primário de colangiócitos normais. Ao contrário, colangiócitos de ratos PCK e colangiócitos normais após interferência com pequenos segmentos de RNA *anti-sense* para *Pkhd1* desenvolveram cílios pequenos, sem expressão de poliductina. Estes resultados sugerem fortemente que a poliductina exerça um papel importante na manutenção da estrutura ou da função de epitélios ductais de órgãos adultos. Nossos resultados, em conjunto com os de

Masyuk e cols. e de Ward e cols., comprovam a localização de poliductina em cílio primário, enfatizando o papel desta organela no desenvolvimento e na função dos epitélios ductais coletor e biliar, e suportando que anormalidades ciliares estruturais e/ou funcionais contribuam à patogênese das doenças renais císticas. É importante mencionar, contudo, que a maneira como as proteínas associadas a DRP interagem, os pontos em que suas vias convergem e as bases moleculares para a diversidade de fenótipos císticos são ainda essencialmente desconhecidos (Watnick e Germino, 2003).

A identificação de sinal positivo em membrana luminal e em citoplasma de células de ducto coletor sugerem que o papel funcional da poliductina provavelmente inclua outros efeitos além de sua participação na função ciliar e que a patogênese de DRPAR possa envolver alterações não restritas a esta organela. A expressão luminal de poliductina abre uma série de possibilidades para os papéis funcionais das isoformas ancoradas à membrana. Estas poderiam se comportar como receptores associados à membrana, uma localização menos freqüente porém bem documentada (Chen e cols., 2002; Sunitha e cols., 1999; Leipziger, 2003). A exclusão de alguns domínios em produtos potencialmente associados a membrana, determinada por *splicing* alternativo de *PKHD1*, poderia contribuir para a geração de receptores com afinidades e especificidades distintas, uma hipótese interessante para uma patologia associada a um distúrbio de desenvolvimento. Nesse caso, ligantes diferentes poderiam atuar em órgãos distintos e/ou em estágios diferentes de diferenciação/maturação. Além disso, a presença de um número alternativo de repetições PbH1 em diferentes produtos poderia permitir variabilidade no reconhecimento ou na ação sobre glicoproteínas, levando a interações específicas

com a matriz extracelular ou com células vizinhas. É interessante observar que a policistina 1, mutada na maior parte dos casos de DRPAD, forma um complexo contendo E-caderina e cateninas, estando aparentemente envolvida na interação célula-célula ou célula-matriz extracelular (Huan e van Adelsberg, 1999).

A constatação de marcação significativa em citoplasma e a verificação de que um dos produtos específicos identificados por western blot é provavelmente uma proteína solúvel suportam um papel de ligante para poliductina. As variações potenciais na geração de peptídios distintos através do processo de *splicing* poderia definir combinações complexas e sequenciais de efeitos para as diferentes isoformas solúveis da proteína. Assim como para as isoformas ancoradas à membrana, formas secretadas poderiam apresentar especificidades e afinidades distintas a receptores, permitindo uma ampla variação biológica.

Este mecanismo potencial complexo, associado ao achado de mutações *missense* em toda a extensão do gene, suporta a existência de um grande número de alelos hipomórficos e sugere que a combinação de mutações patogênicas possa ser determinante no estabelecimento dos diferentes fenótipos associados à DRPAR. Em tese, os efeitos das combinações de mutações poderiam variar entre tecidos diferentes. Acreditamos que a caracterização dos produtos de *PKHD1*, incluindo estratégias bioquímicas, de expressão e funcionais, será essencial na análise das questões levantadas nesta tese. Estes estudos provavelmente incluirão modelos de células eucariotas transfectadas e serão naturalmente integrados à análise de modelos murinos geneticamente manipulados. O desenrolar destes estudos deverá aumentar progressivamente a compreensão das funções da poliductina e das bases moleculares e funcionais da patogênese da DRPAR.

CONCLUSÕES

- O reconhecimento por western blot de três produtos específicos distintos, de >440 kDa, ~230 kDa e ~140 kDa, usando apenas dois anti-soros policlonais, indica que o gene *PKHD1* codifica diferentes isoformas. Estes dados confirmam a hipótese anterior de que múltiplos transcritos se traduziriam em diferentes isoformas.
- A análise de expressão básica em frações celulares distintas sugere fortemente a existência de produtos ancorados à membrana e solúveis, suportando nossa hipótese anterior de que os transcritos de *PKHD1* seriam capazes de codificar proteínas de membrana e solúveis.
- O perfil de expressão definido por imunoistoquímica em rim adulto humano normal demonstrou marcação cortical e medular em ductos coletores e na porção ascendente espessa da alça de Henle, um padrão consistente com as características histológicas básicas observadas na DRPAR.

- A presença de sinal em ductos biliares é consistente com a disgenesia biliar associada à DRPAR e sugere um papel funcional para *PKHDI* em fígado maduro.
- A expressão de poliductina em broto ureteral de camundongos sugere que as alterações encontradas em ductos coletores de pacientes com DRPAR devam ser consequência de um defeito primário nesta estrutura.
- A marcação específica de ductos biliares intra e extra-hepáticos em desenvolvimento, encontrada em camundongos, é consistente com a hipótese de anormalidades de maturação túbulo-epitelial renal e biliar proposta para a DRPAR.
- A identificação de sinal específico em ductos pancreáticos e em glândulas salivares também suporta o conceito de que poliductina esteja envolvida na diferenciação terminal de vários epitélios ductais.
- A marcação observada em ácinos pancreáticos e de glândulas salivares é consistente com a existência de produtos protéicos específicos em diferentes estruturas orgânicas.
- Nossos estudos de microscopia imunoeletrônica em ductos coletores e de co-localização por imunofluorescência em células IMCD em cultura demonstram que a poliductina constitui mais uma proteína associada a DRP que se expressa em cílio apical primário.

- A identificação de sinal em membrana apical e no citoplasma de células do ducto coletor renal sugere que os papéis funcionais da poliductina incluam outros efeitos além de sua participação na função ciliar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B, Pegiazoglou I, Puglia P, Eggermann T, Rudnik-Schoneborn S, Furu L, Onuchic LF, De Baca M, Germino GG, Guay-Woodford L, Somlo S, Moser M, Buttner R, Zerres K. Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 76-89.
2. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, Liu L, Qian F, Xu PN, Germino FJ, Germino GG. PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 2002; 109: 157-168.
3. Black DL. Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell* 2002; 103: 367-370.
4. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, Bhunia AK, Phakdeekitcharoen B, Hanaoka K, Guggino W, Monaco L, Germino GG. Polycystin-1, the gene product of PKD1,

induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 2000; 6: 1267-1273.

5. Calvet JP. Polycystic kidney disease: primary extracellular matrix abnormality or defective cellular differentiation? *Kidney Int* 1993; 43: 101-108.
6. Chen MC, Solomon TE, Kui R, Soll AH. Apical EGF receptors regulate epithelial barrier to gastric acid: endogenous TGF-alpha is an essential facilitator. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G1098-G1106.
7. Desmet VJ. Congenital diseases of intrahepatic bile ducts: variations on the theme "ductal plate malformation". *Hepatology* 1992; 16: 1069-1083.
8. Devuyst O, Burrow CR, Schwiebert EM, Guggino WB, Wilson PD. Developmental regulation of CFTR expression during human nephrogenesis. *Am J Physiol* 1996; 271: F723-F735.
9. Furu L, Onuchic LF, Gharavi A, Hou X, Esquivel EL, Nagasawa Y, Bergmann C, Senderek J, Avner E, Zerres K, Germino GG, Guay-Woodford LM, Somlo S. Milder presentation of recessive polycystic kidney disease requires presence of amino acid substitution mutations. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2004-2014.

10. Guay-Woodford L, Jafri ZH, Bernstein J. Other Cystic Kidney Diseases. In *Comprehensive Clinical Nephrology*, RJ Johnson e J Freehally, eds. Harcourt Publishers Limited), 2000; p. 50.1-50.12.
11. Guay-Woodford LM, Desmond RA. Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* 2003; 111: 1072-1080.
12. Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, Avner ED, Germino GG, Guillot AP, Herrin J, Holleman R, Irons DA, Primack W. The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 1995; 56: 1101-1107.
13. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Piontek K, Tsiokas L, Sukhatme VP, Guggino WB, Germino GG. Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 2000; 408: 990-994.
14. Hogan MC, Griffin MD, Rossetti S, Torres VE, Ward CJ, Harris PC. PKHD1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression. *Hum Mol Genet* 2003;12: 685-698.
15. Hou X, Mrug M, Yoder BK, Lefkowitz EJ, Kremmidiotis G, D'Eustachio P, Beier DR, Guay-Woodford LM. Cystin, a novel cilia-associated protein, is

- disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2002; 109: 533-540.
16. Huan Y, van Adelsberg J. Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins. *J Clin Invest* 1999; 104: 1459-1468.
 17. Igarashi P, Somlo S. Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2384-2398.
 18. Kizer NL, Lewis B, Stanton BA. Electrogenic sodium absorption and chloride secretion by an inner medullary collecting duct cell line (mIMCD-K2). *Am J Physiol* 1995; 268: F347-F355.
 19. Leipziger J. Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F419-F432.
 20. Lemaigre FP. Development of the biliary tract. *Mech Dev* 2003;120: 81-87.
 21. Lens XM, Onuchic LF, Wu G, Hayashi T, Daoust M, Mochizuki T, Santarina LB, Stockwin JM, Mucher G, Becker J, Sweeny WEJr, Avner ED, Guay-Woodford L, Zerres K, Somlo S, Germino GG. An integrated genetic and physical map of the autosomal recessive polycystic kidney disease region. *Genomics* 1997; 41, 463-466.

22. Lin F, Hiesberger T, Cordes K, Sinclair AM, Goldstein LS, Somlo S, Igarashi P. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 5286-5291.

23. Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, Masyuk AI, Yuan D, Splinter PL, Punyashthiti R, Ritman EL, Torres VE, Harris PC, LaRusso NF. Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 2003; 125: 1303-1310.

24. Missler M, Sudhof TC. Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 1998; 14: 20-26.

25. Morgan D, Eley L, Sayer J, Strachan T, Yates LM, Craighead AS, Goodship JA. Expression analyses and interaction with the anaphase promoting complex protein Apc2 suggest a role for inversin in primary cilia and involvement in the cell cycle. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3345-3350.

26. Mucher G, Becker J, Knapp M, Buttner R, Moser M, Rudnik-Schoneborn S, Somlo S, Germino G, Onuchic L, Avner E, Guay-Woodford L, Zerres K. Fine mapping of the autosomal recessive polycystic kidney disease locus (PKHD1) and the genes MUT, RDS, CSNK2 beta, and GSTA1 at 6p21.1-p12. *Genomics* 1998; 48: 40-45.

27. Nagasawa Y, Matthiesen S, Onuchic LF, Hou X, Bergmann C, Esquivel E, Senderek J, Ren Z, Zeltner R, Furu L, Avner E, Moser M, Somlo S, Guay-Woodford L, Buttner R, Zerres K, Germino GG. Identification and characterization of Pkhd1, the mouse orthologue of the human ARPKD gene. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2246-2258.

28. Olbrich H, Fliegauf M, Hoefele J, Kispert A, Otto E, Volz A, Wolf MT, Sasmaz G, Trauer U, Reinhardt R, Sudbrak R, Antignac C, Gretz N, Walz G, Schermer B, Benzing T, Hildebrandt F, Omran H. Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* 2003; 34: 455-459.

29. Onuchic LF, Furu L, Nagasawa Y, Hou X, Eggermann T, Ren Z, Bergmann C, Senderek J, Esquivel E, Zeltner R, Rudnik-Schoneborn S, Mrug M, Sweeney W, Avner ED, Zerres K, Guay-Woodford LM, Somlo S, Germino GG. 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: 1305-1317.

30. Osathanondh V, Potter EL. Pathogenesis of polycystic kidneys. Type 1 due to hyperplasia of interstitial portions of collecting tubules. *Arch Pathol* 1964; 77: 466-473.

31. Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F. Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 2003; 34: 413-420.
32. Park JH, Dixit MP, Onuchic LF, Wu G, Goncharuk AN, Kneitz S, Santarina LB, Hayashi T, Avner ED, Guay-Woodford L, Zerres K, Germino GG, Somlo S. A 1-Mb BAC/PAC-based physical map of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene (PKHD1) region on chromosome 6. *Genomics* 1999; 57, 249-255.
33. Pohl M, Stuart RO, Sakurai H, Nigam SK. Branching morphogenesis during kidney development. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 595-620.
34. Praetorius HA, Spring KR. Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* 2001; 184: 71-79.
35. Qin H, Rosenbaum JL, Barr MM. An autosomal recessive polycystic kidney disease gene homolog is involved in intraflagellar transport in *C. elegans* ciliated sensory neurons. *Curr Biol* 2001; 11: 457-461.
36. Rosenbaum JL, Cole DG, Diener DR. Intraflagellar transport: the eyes have it. *J Cell Biol* 1999; 144, 385-388.

37. Rossetti S, Torra R, Coto E, Consugar M, Kubly V, Malaga S, Navarro M, El Youssef M, Torres VE, Harris PC. A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees. *Kidney Int* 2003; 64: 391-403.
38. Sandoval MP, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, de Brito T. Distribution of exoantigens and a 43-kDa glycoprotein (gp43) in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Mycol Méd* 1996; 6: 1-6, 1996.
39. Scholey JM. Intraflagellar transport. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 423-443.
40. Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* 1990; 185: 60-89, 1990.
41. Sunitha I, Shen R, McKillop IH, Lee JH, Resau J, Avigan M. A src-related kinase in the brush border membranes of gastrointestinal cells is regulated by c-met. *Exp Cell Res* 1999; 250: 86-98.
42. Tabuchi K, Sudhof TC. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 2002; 79, 849-859.
43. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, Comoglio PM. Plexins

are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 1999; 99: 71-80.

44. Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK. Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 589-599.
45. Tian L, Duncan RR, Hammond MS, Coghill LS, Wen H, Rusinova R, Clark AG, Levitan IB, Shipston MJ. Alternative splicing switches potassium channel sensitivity to protein phosphorylation. *J Biol Chem* 2001; 276: 7717-7720.
46. Timms BG. Postembedding immunogold labeling for electron microscopy using "LR White" resin. *Am J Anat* 1986; 175: 267-275.
47. Uhari M, Herva R. Polycystic kidney disease of perinatal type. *Acta Paediatr Scand* 1979; 68: 443-444.
48. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 2002; 30: 259-269.
49. Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC. Cellular and subcellular

localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2703-2710.

50. Watnick T, Germino G. From cilia to cyst. *Nat Genet* 2003; 34: 355-356.
51. Xie J, McCobb DP. Control of alternative splicing of potassium channels by stress hormones. *Science* 1998; 280: 443-446.
52. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM. The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2508-2516.
53. Zerres K, Mucher G, Bachner L, Deschenes G, Eggermann T, Kaariainen H, Knapp M, Lennert T, Misselwitz J, von Muhlen Dahl KE. Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat Genet* 1994; 7: 429-432.
54. Zerres K, Mucher G, Becker J, Steinkamm C, Rudnik-Schoneborn S, Heikkila P, Rapola J, Salonen R, Germino GG, Onuchic L, Somlo S, Avner ED, Harman LA, Stockwin JM, Guay-Woodford LM. Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet* 1998a; 7:137-144.
55. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Steinkamm C, Becker J, Mucher G. Autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Mol Med* 1998b; 76: 303-309.

ANEXO

Artigo no prelo:

Menezes LFC, Cai Y, Nagasawa Y, Silva AMG, Watkins ML, da Silva AM, Somlo S, Guay-Woodford LM, Germino GG, Onuchic LF. Polyductin, the *PKHD1* gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium and cytoplasm”, *Kidney Int, in press*

Polyductin, the *PKHD1* gene product, comprises isoforms expressed in plasma membrane, primary cilium and cytoplasm

Luís F. C. Menezes¹, Yiqiang Cai², Yasuyuki Nagasawa³, Ana M. G. Silva¹, Mary Lou Watkins⁴, Aline M. da Silva⁵, Stefan Somlo², Lisa M. Guay-Woodford⁴, Gregory G. Germino³, Luiz F. Onuchic^{1,*}

¹Department of Medicine, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, Brazil; ²Departments of Internal Medicine and Genetics, Yale University School of Medicine, New Haven; ³Departments of Medicine and Genetics, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore; ⁴Departments of Medicine and Pediatrics, University of Alabama School of Medicine, Birmingham; and ⁵Department of Biochemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

*Correspondence should be addressed to:

Luiz F. Onuchic

University of São Paulo School of Medicine, Division of Nephrology

Avenida Dr. Arnaldo, 455 – Sala 3310

São Paulo – SP - 01246-903 – Brazil

E-mail: lonuchic@lim12.fm.usp.br

Fax: 55-11-3088-2267.

Telephone: 55-11-3066-7342.

Key words: ARPKD, PKHD1 gene, Polyductin, Fibrocystin, Cilium, Isoforms, Protein expression profile

Abstract

Background. *PKHD1*, the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes multiple alternatively spliced transcripts predicted to generate membrane-bound and secreted proteins. The longest open reading frame encodes polyductin (fibrocystin), a putative 4,074-aminoacid protein with a single transmembrane domain and an intracellular C-terminus.

Methods. To characterize the *PKHD1* products and their expression profile, we raised polyclonal antibodies against different portions of polyductin and analyzed different organs using various methods.

Results. Western blot analyses demonstrated specific bands of >440 kDa in human adult kidney, liver and pancreas and ~230 kDa in kidney and liver, predominantly observed in membrane fractions. The >440-kDa putative membrane protein was immunoprecipitated from kidney and subsequently detected by western blotting using two distinct antisera. An additional product of ~140 kDa was specifically recognized by affinity-purified antisera predominantly in soluble fractions. Immunohistochemistry studies revealed specific staining in cortical and medullary collecting ducts and thick ascending limbs of Henle. Serial sections were stained with antibodies against aquaporin-2 and Tamm-Horsfall protein to confirm the nephron segment localization. Positive staining was also detected in biliary and pancreatic duct epithelia. Analyses of mouse developing tissues showed specific staining in the ureteric bud branches, intra and extra-hepatic biliary ducts, pancreatic ducts and salivary glands. Immunofluorescence studies in IMCD cultured cells and immunoelectron microscopy analysis of medullary collecting ducts demonstrated

that the protein localizes to the primary cilium. Positive signal was also detected in the apical membrane and in cytoplasm.

Conclusions. The results indicate that polyductin is part of the group of PKD-related proteins expressed in primary apical cilia. Our data also suggest that, in addition to its likely involvement in cilia function, polyductin probably serves in other subcellular functional roles. The detection of three different products using two antisera, with evidence for distinct subcellular localizations, suggests that *PKHD1* encodes membrane-bound and soluble isoforms.

Introduction

Several mechanisms may be involved in renal cystogenesis and cyst enlargement [1]. The polycystic kidney diseases (PKD) constitute a particularly important group among the renal cystic disorders, given their significant morbidity and mortality in humans. The identification of several PKD-associated genes and the characterization of their corresponding products have recently revealed that primary cilia may play a pivotal role in renal epithelial function and that disruption of ciliary structure or function may participate in the pathogenesis of PKD [2,3].

Autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) is a major cause of pediatric PKD, with an estimated incidence of 1:20,000 live births [4]. The disease is characterized by fusiform or cylindrical dilatation of renal collecting ducts and biliary dysgenesis [5]. While most of the cases are diagnosed early in infancy, the ARPKD clinical spectrum is broad, including the severe perinatal phenotype as well as milder and later onset presentations [6].

All typical forms of ARPKD are caused by mutations in a single gene, *PKHD1* (Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1) [7,8]. This gene was recently identified by positional cloning and by the characterization of an orthologous gene in the *pck* rat model [9,10]. *PKHD1* is a very large gene, extending over an at least 469-kb genomic segment and including a minimum of 86 exons. Its exons are assembled in a complex pattern of alternative splice variants, giving rise to a large number of transcripts that are potentially translated into membrane-bound and secreted protein products [9]. A 67-exon transcript encodes the putative longest open reading frame (ORF), predicted to yield a single transmembrane (TM) glycoprotein of 4,074 aminoacids (aa), polyductin. In its unglycosylated form, polyductin is expected to

have a molecular weight of ~447 kDa. Its extracellular portion contains more than 3800 aa and includes a series of IPT (Immunoglobulin-like-Plexin-Transcription factor) domains in the amino terminus and multiple PbH1 (Parallel beta-Helix 1) repeats between the last IPT and the TM domain. The protein short carboxyl tail includes putative cAMP/cGMP phosphorylation sites that may be important for its function.

PKHD1 is expressed at its highest level in adult and fetal kidney, suggesting that, in addition to its role in kidney development, the gene is also functionally important in the mature organ [9]. Expression at significantly lower levels was also detected in pancreas and liver. Initial structural analyses revealed significant homology with a superfamily of proteins involved in regulation of cell proliferation and cell adhesion/repulsion, including hepatocyte growth factor receptor (HGFR) and plexins [11,12]. In a recent work, we isolated the mouse orthologue, *Pkhd1*, and showed that the basic properties of the human gene are conserved in mouse, including the complicated splicing pattern [13]. In addition, expression analyses of *Pkhd1* in different organs support the existence of specific exon-arrangement transcripts in different structures and tissues.

A set of five studies performed to date revealed the first genotype-phenotype correlations in ARPKD patients [9,10,14-16]. The most significant observation was that all patients with two mutations truncating the longest-ORF product had the severe phenotype. The potentially pathogenic mutations were found to be scattered throughout the gene. More recently, Ward et al. have shown that polyductin is expressed in the branching ureteric bud and in collecting ducts and that the protein is

expressed in primary cilia of MDCK cells [17]. Expression has also been described in cholangiocyte cilia [18].

In our current work, we sought to study the polyductin expression profile in human adult and in mouse developing tissues using a comprehensive approach. This study supports our previous hypothesis, showing that *PKHDI* encodes products that apparently include membrane-anchored and soluble isoforms. We have detected a product that likely represents the longest ORF-related protein and shown that polyductin is expressed in the primary apical cilium and in the apical membrane. These observations should provide an important platform for determining polyductin function and the disease pathogenesis.

Methods

Polyclonal antibodies generation

To characterize the *PKHDI* translation products and their expression profile, we raised polyclonal antibodies against different portions of the longest ORF product using fusion-protein and synthetic-peptide based strategies. Two fusion proteins and six short synthetic peptides were included in the immunization protocol. Polyclonal antisera against one of the fusion proteins (fusion protein 2, FP2) and two short peptides (peptides 5 and 6, P5P6) were validated, showing sensibility and specificity to detect polyductin. These two antisera and respective pre-immune sera were used to perform all the experiments shown in this work. The gene fragment used for FP2 production encoded the polyductin intracellular C-terminus (aa 3884-4074), coupled to a polyhistidine N-terminus. The corresponding cDNA fragment was amplified from the cDNA clone 4.1, described in our previous report [9]. The amplicon was generated using the BamHI or EcoRI restriction site-containing primers FP2-forward 5'-GCGCGGATCCAGAAGCAAAAGCAGAAAAAC-3', and FP2-reverse 5'-GCGCGAATTCTCACAGTTGCTCCTCAATAG-3'. The digested insert was cloned into pAE (kindly provided by P. Ho, Instituto Butantan, Brazil), a pET-3His derived vector. The 6-His-polyductin fusion proteins were produced in BL21(DE3)pLysS *E. coli*, purified in Poly-Prep columns (Bio-Rad, CA, EUA) with Ni-NTA agarose resin (Qiagen, Germany) and eluted with urea buffer (urea 8.0 M, NaH₂PO₄ 0.1 M, TrisHCl 0.01 M, pH 4.5). The α -P5P6 antiserum was raised against the aminoacid sequences 3252-3266 (P5) and 3774-3785 (P6).

The immunization process was carried out in rabbits for both fusion proteins and synthetic peptides, and the antisera were subsequently affinity-purified using fusion protein and peptide columns, following the manufacturer's specifications (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX). Negative controls were generated by antisera immune depletion using the corresponding columns. Some experiments were performed using affinity purified α -FP2 (α -FP2 pAb) pre-competed with FP2 (1:5 mass ratio, overnight rocking at 4 °C).

Protein extraction, immunoprecipitation and western blotting

Samples of normal adult kidneys, liver and pancreas were procured in the operating room from tissue specimens resected for carcinoma. Histological analysis of the tissue margins assured the absence of carcinogenic involvement of the selected samples. The specimens were immediately flash frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at -80°C.

Protein extraction followed a previously described protocol slightly modified [19]. Tissue samples were minced in liquid nitrogen, homogenized in ice cold homogenization buffer (255 mM sucrose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4 and protease inhibitor cocktail (SIGMA, Saint Louis, Missouri, USA)) with a Potter apparatus and centrifuged at 1,000 g for 20 min at 4 °C to remove nuclei and cell debris. To obtain membrane fractions, the total extract, contained within the initial supernatant, was further centrifuged at 100,000 g for 30 min at 4 °C. The pellet was suspended in ice cold homogenization buffer, giving rise to the membrane fraction, while the residual supernatant included the soluble protein phase.

The immunoprecipitation experiments were carried out using an affinity-purified antibody/tissue total extract mass ratio of 20 µg:1.5 mg. The total extract samples were incubated with α -FP2 pAb in immunoprecipitation buffer (20 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, 10% glycerol, 1% Triton X-100, pH 7.2 and protease inhibitor cocktail) and gentle agitation for 2 h at 4 °C. A subsequent 2-h incubation in gentle agitation at 4 °C was performed following the addition of 60 µl of protein A sepharose 4 Fast Flow (Amersham Biosciences, Sweden). The total mix was then centrifuged at 400 g for 1 min and the pellet washed three times, resuspended in SDS sample buffer (1.5% SDS, 10 mM TrisHCl pH 6.8, 0.6% DTT, 6% glycerol) and denatured for 3 min at 97 °C.

Western blot analyses were performed using denatured protein samples and 5% or 7% SDS-PAGE, followed by blotting onto PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences, Sweden) membranes. The primary immunoprobings steps were carried out with non-purified and purified antisera, pre-immune sera, immune-depleted sera or pre-competed purified antibody, according to the nature of the experiment. An α -rabbit IgG HRP-conjugated antibody was used for the secondary immunoprobings step, followed by detection with the ECL system (Amersham Biosciences, Sweden). The molecular weight of the highest band was established by comparison with a series of high molecular weight markers based on phosphorylase-b cross linking, according to the manufacturer's specifications (phosphorylase-b, cross-linked SDS molecular weight marker, SIGMA, Saint Louis, Missouri).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded samples of normal adult kidneys, livers, pancreas, mammary glands, parotids, colon and lung were obtained from medically indicated biopsies or resections. Mouse embryos were harvested at 9-19 dpc and adult mice were sacrificed at 3 months of age. Embryos and organs were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Four- μ m human tissue sections and 3- μ m mouse sections were mounted on slides coated with silane, treated for 20 min in steamer with TRS (Target Retrieval System, DAKO, Carpinteria, CA), blocked with 50% methanol/3% H_2O_2 , and incubated with 6% dried non-fat milk in PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.4 for 30 min. Primary antibody incubation was performed at 4 °C for 18 h in tissue serial sections. According to the nature of the experiment, the primary immunoprobng was done with α -FP2 or α -P5P6 antisera, their corresponding pre-immune sera (PI), immuno-depleted α -FP2 sera (α -FP2/dep), α -FP2 pAb or α -FP2 pAb pre-competed with FP2 (α -FP2 pAb/comp). The immunostaining analyses were performed with both alkaline phosphatase and peroxidase-based techniques, except for mouse-tissue, since the available appropriate secondary antibody was peroxidase-conjugated.

Human kidney samples were also probed with α -aquaporin-2 (DAKO, Carpinteria, CA) and α -Tamm-Horsfall protein (kindly provided by C. Bacchi, UNESP, Brazil) to identify the collecting duct and thick ascending limb of Henle, respectively. Secondary antibody incubation was carried out using EnVision+-Alkaline phosphatase or LSAB (DAKO, Carpinteria, CA) in human samples and EnVison+-HRP (DAKO, Carpinteria, CA) in mouse samples, following the manufacturer's orientations. The aquaporin-related experiments were performed with

LSAB the peroxidase-based technique, since the suitable secondary antibody was peroxidase-conjugated.

IMCD cells immunofluorescence

For immunofluorescence studies, we used a well-characterized, mouse inner medullary collecting duct cell line (mIMCD-K2) [20]. Cells were grown in DMEM/F12 medium (BioWhittaker/Fisher cat# 12-719Q) supplemented with 10% FBS (BioWhittaker/Fisher Cat# 14-901E), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin, in 5% CO₂/95% air at 37 °C. Stable lines were selected with 400 µg/ml G418 (BioWhittaker/FisherBP-673-5). Cells were plated at confluence on glass coverslips (Fisher 12-545-82 12CIR-1D). Immunofluorescent studies were performed 3-4 days after the cells were confluent, so as to optimize cell polarization and cilia formation. Cells were washed with PBS, fixed with 1% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and processed for immunofluorescence microscopy as described [21]. Cells were stained with the following primary antibodies: α -acetylated α -tubulin (diluted 1:200), α -FP2 pAb (diluted 1:100), and α -FP2-corresponding pre-immune serum (diluted 1:500); then washed; and incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes). Antibody controls were evaluated to ensure that the results were not a consequence of cross-reactivity or non-specific binding of the secondary antibodies. Nuclei were stained with Hoescht 33528 (Sigma). Immunofluorescence microscopy was performed on a Nikon TE200 inverted DIC optics microscope as previously described [21]. Images were captured digitally using a Roper Scientific Coolsnap FX-HQ camera and MetaMorph (5.0) software.

Immunoelectron microscopy

Samples of normal tissue of human adult kidneys obtained from nephrectomy were fixed in 4% paraformaldehyde, transferred to 0,2% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde for 2 h, postfixed in 8% paraformaldehyde and 2% sucrose in 0,2 M Tris-buffered saline (TBS), pH 7.4, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in L. R. White resin (London Resin Company, Ltd, Berkshire, England). Thin sections were cut, mounted on nickel grids and processed for immunolabeling using the protein A gold technique [22], following the protocol previously described [23]. The grids were rinsed in TBS and incubated in 1% ovalbumin, fraction V (globulin free) in TBS-0,05% Tween 20 for 30 min. The sections were then incubated overnight at 4 °C with the primary antibody and treated with protein-A colloidal gold particles of 10 nm (Amersham Biosciences, Sweden) for 60 min at room temperature. The antibody complexes were stabilized with aqueous 2% glutaraldehyde, stained with aqueous 2% osmium tetroxide and counterstained with 4% aqueous uranyl acetate and Reynolds' lead citrate. The specimens were examined in a Jeol 1010 transmission electron microscope.

Additional experiments were performed using mouse renal medullary tissue, using similar techniques for tissue preparation and signal detection.

Results

Western blot analyses

Total protein extracts, membrane fractions and soluble fractions of human adult normal kidneys, livers and pancreas were evaluated by western blotting. Analyses with α -FP2 and α -P5P6 demonstrated specific bands of >440 kDa in kidney, pancreas and liver, and of ~230 kDa in kidney and liver (Figure 1). These bands were detected in total extract and membrane fraction, with weaker signal also present in kidney and liver supernatants. While α -FP2 detects the >440 kDa band very weakly in lysates, this signal is strongly and specifically enriched following its affinity purification. An additional ~140-kDa polypeptide was specifically detected by both antisera in kidney, liver and pancreas total extracts, with a strong signal present in the supernatants and a weaker signal in the membrane fractions (Figure 1). The relative signal intensity between these bands differed significantly among the samples. A ~380-kDa band, detected by α -FP2, was a variably present species of unknown significance.

To confirm specificity to polyductin we sought to prove that the same product could be recognized by antisera against distinct portions of the molecule. Human kidney total extract was therefore immunoprecipitated with α -FP2 pAb and subsequently detected by western blotting with the α -P5P6 (Figure 2-A). These experiments revealed a clear and discrete band of >440 kDa, confirming the specificity for the largest protein product. The ~230-kDa band, on its turn, was only very faintly detected by α -FP2 pAb and α -P5P6 following immunoprecipitation (data

not shown). To better characterize the molecular weight of the specific top band, additional immunoprecipitation followed by western analyses were performed using high-molecular-weight markers. Such evaluation showed that this band lies between the 398-kDa and 487-kDa markers, in a position closer to the last of them (Figure 2-B).

Immunohistochemistry analyses of human adult normal tissues

Immunohistochemical evaluation of adult normal human kidney specimens with α -FP2 pAb and α -P5P6 revealed specific staining of cortical and medullary collecting ducts and thick ascending limbs of Henle (TALH) (Figure 3-A, B and C). Similar staining patterns were obtained with both antisera. Immunoprobings with the corresponding pre-immune sera, immuno-depleted sera and α -FP2 pre-competed with FP2 did not detect these structures. Serial kidney sections were stained with antibodies α -aquaporin-2, a marker for collecting ducts, and α -Tamm-Horsfall protein, a marker for TALH. Colocalization of specific staining confirmed the nephron-segment localization pattern described above (Figure 3-D).

Specific staining was also detected in biliary and pancreatic duct epithelia. Signal in hepatocytes and pancreatic islets was detected by the antisera, pre-immune sera and depleted sera, indicating non-specific staining. Other ductal-structure-containing organs, such as parotid glands and mammary glands, were also analyzed with these reagents, but no specific staining was detected. No specific staining could be seen in heart, brain and colon samples either.

Mouse embryos immunohistochemistry analysis

Immunohistochemistry reactions were performed on sections from paraffin-embedded tissues from 15-19 dpc mouse embryos. These studies showed specific staining in the branching ureteric bud but not in metanephric mesenchyme, S-shaped bodies and glomeruli (Figure 4-A). Liver analysis revealed strongly positive signal in intra and extra-hepatic biliary ducts and in some hepatocytes from 15 dpc on (Figure 4-B). The surrounding embryonic blood cells were not stained. Pancreatic ducts were also strongly stained (Figure 4-C). However, while staining with α -FP2 pAb showed positive signal in acini, α -P5P6 did not follow such a pattern, staining the ducts exclusively. Strong specific staining was detected in 19-dpc salivary gland with both antibodies. As in pancreas, only α -FP2 pAb detected positive signal in salivary gland acini.

Immune, pre-immune and immune-depleted signals did not differ significantly in heart, brain, lung, intestine and dorsal root ganglia, suggesting non-specific staining in these tissues (data not shown).

Immunofluorescence subcellular co-localization studies

The subcellular localization of endogenous polyductin in IMCD mouse cells was evaluated by immunofluorescence (IF). These studies revealed that α -FP2 pAb detected a small domain on the apical cell surface (Figure 5-A), in a distribution that co-localizes with α -tubulin, a known constituent of the ciliary axoneme (Figure 5-B and C). This signal was not detected with α -FP2 pre-immune serum. Additional

cytoplasmic signal was also detected by α -FP2 pAb. Though much fainter, cytoplasmic staining was also detected with the pre-immune serum. No immunofluorescence signal was observed when secondary antibodies were used alone or in combination (data not shown).

Immunoelectron microscopy studies

The immunoelectron microscopy (IEM) analyses on normal human adult kidney samples and mouse renal medullary tissue were performed using α -FP2 pAb and α -P5P6. Studies with both antisera revealed gold-labeled specific antigens in collecting duct cells (CDC). A lower level of signal was also detected in human TALH cells. Specific signal could be detected in apical cilium in human and mouse CDC samples, while no particles were detected in cilium in corresponding negative controls run with pre-competed and immunodepleted antisera. (Figure 6-A). Positive labeling was identified in the transition between the basal body and the axoneme and in the axoneme itself.

Specific labeling was also present in the luminal membrane of human and mouse CDC samples (Figure 6-B). Cytoplasmic labeling was detected but apparently not specific, since it was also seen in negative control experiments with pre-competed and immunodepleted antisera. Analyses of proximal tubule cells are also suggestive of non-specific signal, given that the corresponding negative control studies revealed approximately the same level of staining.

Discussion

If a significant number of *PKHDI* and mouse *Pkhd1* alternatively spliced products are translated, their exon arrangements predict that both membrane-bound and soluble proteins are produced. Additional lines of evidence support this thesis. First, *PKHDI* has high homology to D86, a mouse protein secreted from lymphocytes. Second, northern blotting with the D86-encoding human orthologue, *PKHDL1* [24], suggests that this gene has multiple transcripts, similar to the pattern observed for *PKHDI*, and is also expected to generate membrane-anchored and soluble proteins.

Polyductin shares significant homology to single-pass cell surface receptors that belong to the Sema superfamily [9,10,13]. Such homology, based on the presence of multiple IPT domains tandemly arranged, suggests that membrane-bound forms of polyductin, including the longest ORF product, may also serve as cell surface receptors. On the other hand, the PbH1 repeats may confer enzymatic activity to membrane-associated isoforms. In addition, the products lacking the TM domain may function as ligands for as yet to be identified receptors. Altogether, the final effect of the several polyductin isoforms may be determined by the sum of their actions, which may change in different tissues, functional situations and stages of organ development.

Our western results identified three potential *PKHDI*-related bands in human adult tissues. The top band, of >440 kDa and expressed in kidney, liver and pancreas, was detected in total extracts and corresponding membrane fractions, while no signal (in pancreas) or minor signal (in kidney and liver) was visualized in soluble

fractions. The expected size range may be consistent with the glycosylated form of the longest ORF-encoded protein and the membrane expression pattern follows this product's predicted expression profile. Although similar-size bands were detected by antisera raised against different polyductin-derived peptide sequences, more definitive confirmation that these antibodies recognized the same polypeptide was carried out using the immunoprecipitation strategy. We pursued several levels of evidence to confirm specificity of the detected products, in order to minimize the possibilities of experimental artifacts, as experienced in the characterization of polycystin-1 [25]. Another band of ~230 kDa was detected, showing a similar expression profile in kidney and liver. This band likely represents a shorter alternative membrane-bound isoform with a broad tissue expression profile. The ~140-kDa band was also specifically detected in kidney, liver and pancreas, but shown to be expressed predominantly in the soluble fraction.

The three products identified in this study may be the same bands detected by Ward et al. in their recent study [17]. However, there are important differences between our data and theirs. Our results identify the two shorter products as isoforms expressed at significantly higher levels than in their study and suggest that the identified bands comprise membrane-bound and soluble proteins. Ward et al., on the other hand, suggest that the three bands represent membrane-associated products. The fact that our three specific bands are recognized by the α -C terminus antiserum and that the ~140-kDa isoform likely represents a soluble protein strongly suggests that the lower-molecular-weight products (at least the ~140-kDa protein) are encoded by alternative transcripts, therefore not corresponding to degradation products as suggested by these authors as a possibility. It is also important to mention that

products detected by the α -C-terminus antibody are not necessarily membrane-bound. One previously reported, partially characterized mouse transcript is in fact predicted to encode a shorter portion of the C-terminus and not to include the TM domain (product 6.1 of figure 1 in reference 13). The likely recognition of three distinct products using only two antibodies indicates that *PKHDI* encodes several isoforms, and suggests that a comprehensive design of reagents should lead to the detection of a considerably higher number of alternative proteins. In addition, the expression analysis of the currently identified products supports the existence of membrane-bound and soluble products. Based on our previous gene expression data [9], however, one could expect a significantly higher number of translated products than what we found, even considering the limited domains used to raise our antibodies. A number of possibilities could explain such observation: a) alternatively translated products could be expressed during specific time periods and/or specific tissue/cell types; b) a significant number of alternative polypeptides may be generated in very low amounts, not detected by western blot; c) a high number of alternative transcripts may not be translated; and d) some of the smeared northern blot signal [9] may still be secondary to mRNA degradation. In addition, a combination of such possibilities may explain the observed results.

The tissue expression profile evaluated by immunohistochemistry showed cortical and medullary collecting duct (CD) staining, a pattern consistent with the histological features seen in ARPKD. The TALH staining, on its turn, was not a previously expected overlapping signal, but careful microdissection of ARPKD kidneys evidenced in approximately 30% of the cases that the angle of the loop of Henle was dilated [26]. Our data were confirmed by double staining with tubular

specific markers (α -aquaporin-2 and α -Tamm-Horsfall protein) in serial kidney sections to assure structure specificity. On the other hand, it is important to mention that the described staining pattern was obtained in adult human kidney and thus likely reflects the functional tubular distribution of polyductin in the terminally-differentiated organ. While a similar staining pattern was described by Ward et al. in CD, they report positive signal in TALH in human infantile kidney, but not in adult kidney. We presently do not have an explanation for the reported differences. The presence of biliary duct staining is consistent with the biliary dysgenesis associated with ARPKD and similarly suggests the potentiality for *PKHD1* function in mature liver. Specific staining in pancreatic ducts may be also compatible with ARPKD phenotype [27]. Overall, the immunohistochemical profile was consistent with northern and *in situ* hybridization analyses previously performed in multiple human and mouse tissues [9,13]. The liver and pancreas expression profile followed the basic pattern reported by Ward et al. In our case, however, the faint staining in hepatocytes and pancreatic islets were likely unspecific.

Staining of the branching ureteric bud suggests that the subsequent ARPKD collecting duct abnormalities occur as a consequence of a primary defect in this structure. The absence of specific staining in metanephric mesenchyme, S-shaped bodies and glomeruli are in accordance with the apparent limited involvement of other nephron segments in the pathogenesis of ARPKD. Strong specific staining in intra and extra-biliary ducts are also consistent with the hypothesis of maturational abnormality of biliary and renal tubulo-epithelial differentiation proposed for ARPKD. Positive signal in pancreatic ducts also supports the concept that polyductin is involved in some ductal epithelia terminal differentiation. In addition, the acinar

staining pattern seen in pancreas and salivary gland is consistent with the existence of structure-specific transcripts, as previously reported [13]. The presence of specific staining in some hepatocytes in the later phases of mouse liver development, not detected in human adult hepatocytes, raises the possibility that the positively stained fetal cells might differentiate into other cell-types, contributing to the biliary tract formation [28]. The lack of staining in tubule-epithelial structures such as human salivary and mammary glands may suggest that polyductin is not ubiquitously expressed in adult tubular epithelia, although the used reagents might have been unable to detect true expression. The strong specific staining seen in ducts of mouse salivary glands at 19 dpc, however, may be consistent with a broad polyductin expression in tubular epithelia of developing tissues.

Immunofluorescence analysis of cultured IMCD cells and immunoelectron microscopy of renal CD revealed positive signal in primary cilium, both in axoneme and basal body-axoneme transition. Our results are consistent with the Ward et al.'s data describing positive polyductin staining in canine-derived MDCK cell cilia [17]. Polyductin, therefore, constitutes one more PKD-related protein expressed in the primary apical cilium, emphasizing the possible fundamental role of cilium in ductal epithelia differentiation and the critical contribution of ciliary structural or functional defects in renal cystic disease pathogenesis. The PKD-associated set of proteins expressed in cilia has now been broadened to include polycystins 1 and 2, cystin, polaris, inversin, nephrocystin, polyductin, and very likely nephrocystin-3 [21, 29-32]. Cilia may sense physical or chemical stimuli/variatioins and transduce the signals via intracellular calcium transients [33]. It has been postulated that polycystins 1 and 2 may regulate intracellular calcium influx, a process activated by cilia movement

[34-36]. Since the primary apical cilium may potentially modulate centriolar function, these signals may control the growth of kidney epithelial cells, allowing them to terminally differentiate and form mature renal tubules, a process that has been investigated in depth [37, 38]. The precise nature of how these cystoproteins, including polyductin, contribute to this process, however, is presently unknown.

The detection of polyductin in apical membrane and in cytoplasm suggests that it has functional roles beyond its cilia-related functions and thus, by extension, the pathogenesis of ARPKD likely involves disruptions in other subcellular domains. Polyductin expression in the luminal membrane raises the possibility of multiple functional roles for the membrane-bound isoforms. They may behave as apical-membrane anchored receptors, a less common localization for cell receptors, but a well-documented fact [39-41]. Various combinations of middle domains in membrane-associated products may contribute to the generation of receptors with distinct binding specificities or affinities, an interesting hypothesis for a developmental disorder. In this case, response to ligands may vary by organ and stages of differentiation/maturation. In addition, the presence of an alternative number of PbH1 repeats in different products could also allow variation in the recognition of different glycoproteins, leading to specific interactions with extracellular matrix or neighboring cells. The demonstration of cytoplasmic staining for polyductin and the fact that one of the specific products identified by western blot is likely a soluble protein support an additional ligand role for a group of polyductin isoforms. Similar prominent splicing variations have been seen in the neurexin gene family, promoting significant structural and functional variability [42,43].

This potential complex mechanism, along with missense mutations scattered throughout *PKHD1* in ARPKD patients, supports the potential existence of a large number of hypomorphic alleles, and suggests that the combination of pathogenic mutations may be a key feature in establishing the final disease phenotype. We believe that the progressive characterization of *PKHD1* products will be essential to analyze the questions raised in this report. These studies will likely include eukaryotic cell transfection models and will naturally extend to the generation of various *PKHD1*-targeted mouse models. The detailed characterization presented in this work should contribute to the future studies to further define the complex function of polyductin and the molecular and functional basis of ARPKD pathogenesis.

Acknowledgments

We thank Thales de Brito, MD, PhD, and Fabiana de Almeida, PhD, for their technical suggestions, Antônio M. Lucon, MD, PhD and Marcel C. C. Machado, MD, PhD, for their valuable help in providing human tissue samples. We also thank the Department of Pathology/University of São Paulo, for its technical support. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grants 2000/00280-3 (LFO) and 2000/14187-5 (LFCM and LFO), and National Institute of Health, grant RO1 DK51259 (GGG, LMGW and SS).

References

1. Igarashi P, Somlo S: Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 13:2384-98, 2002
2. Watnick T, Germino G: From cilia to cyst. *Nat Genet* 34:355-6, 2003
3. Calvet JP: Ciliary signaling goes down the tubes. *Nat Genet* 33:113-4, 2003
4. Zerres K, Mucher G, Becker J, *et al*: Prenatal diagnosis of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): molecular genetics, clinical experience, and fetal morphology. *Am J Med Genet* 76:137-44, 1998
5. Zerres K, Rudnik-Schoneborn S, Steinkamm C, *et al*: Autosomal recessive polycystic kidney disease. *J Mol Med* 76:303-9, 1998
6. Guay-Woodford LM, Desmond RA: Autosomal recessive polycystic kidney disease: the clinical experience in North America. *Pediatrics* 111:1072-80, 2003
7. Zerres K, Mucher G, Bachner L, *et al*: Mapping of the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD) to chromosome 6p21-cen. *Nat Genet* 7:429-32, 1994

8. Guay-Woodford LM, Muecher G, Hopkins SD, *et al*: The severe perinatal form of autosomal recessive polycystic kidney disease maps to chromosome 6p21.1-p12: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 56:1101-7, 1995
9. 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* 70:1305-17, 2002
10. Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, *et al*: The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet* 30:259-69, 2002
11. Bardelli A, Ponzetto C, Comoglio PM: Identification of functional domains in the hepatocyte growth factor and its receptor by molecular engineering. *J Biotechnol* 37:109-22, 1994
12. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, *et al*: Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* 99:71-80, 1999

13. Nagasawa Y, Matthiesen S, Onuchic LF, *et al*: Identification and characterization of Pkhd1, the mouse orthologue of the human ARPKD gene. *J Am Soc Nephrol* 13:2246-58, 2002
14. Bergmann C, Senderek J, Sedlacek B, *et al*: Spectrum of mutations in the gene for autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD/PKHD1). *J Am Soc Nephrol* 14:76-89, 2003
15. Furu L, Onuchic LF, Gharavi A, *et al*: Milder presentation of recessive polycystic kidney disease requires presence of amino Acid substitution mutations. *J Am Soc Nephrol* 14:2004-14, 2003
16. Rossetti S, Torra R, Coto E, *et al*: A complete mutation screen of PKHD1 in autosomal-recessive polycystic kidney disease (ARPKD) pedigrees. *Kidney Int* 64:391-403, 2003
17. 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* 12:2703-10, 2003
18. Masyuk TV, Huang BQ, Ward CJ, *et al*: Defects in cholangiocyte fibrocystin expression and ciliary structure in the PCK rat. *Gastroenterology* 125:1303-10, 2003

19. Devuyst O, Burrow CR, Schwiebert EM, *et al*: Developmental regulation of CFTR expression during human nephrogenesis. *Am J Physiol* 271:F723-35, 1996
20. Kizer, N., B. Lewis, and B. Stanton: Electrogenic sodium absorption and chloride secretion by an inner medullary collecting duct cell line (mIMCD-K2). *Am J Physiol* 268:F347-F355, 1995
21. Hou, X., M. Mrug, B. Yoder, *et al*: Cystin, a novel cilia-associated protein, is disrupted in the cpk mouse model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 109:533-540, 2002
22. Timms BG: Postembedding immunogold labeling for electron microscopy using "L. R. White" resin. *Am J Anat* 175:267-275, 1986
23. Sandoval MP, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, de Brito T: Distribution of exoantigens and a 43-kDa glycoprotein (gp43) in the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Mycol Méd* 6:1-6, 1996
24. Hogan MC, Griffin MD, Rossetti S, *et al*: PKHDL1, a homolog of the autosomal recessive polycystic kidney disease gene, encodes a receptor with inducible T lymphocyte expression. *Hum Mol Genet* 12:685-98, 2003
25. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, *et al*: Biochemical characterization of bona fide polycystin-1 in vitro and in vivo. *Am J Kidney Dis* 38:1421-9, 2001

26. Osathanondh, V. and E. Potter: Pathogenesis of polycystic kidneys. Type 1 due to hyperplasia of interstitial portions of the collecting tubules. *Arch Pathol* 77:466-73, 1964
27. Uhari M, Herva R: Polycystic kidney disease of perinatal type. *Acta Paediatr Scand* 68:443-4, 1979
28. Lemaigre FP: Development of the biliary tract. *Mech Dev* 120:81-7, 2003
29. Taulman PD, Haycraft CJ, Balkovetz DF, Yoder BK: Polaris, a protein involved in left-right axis patterning, localizes to basal bodies and cilia. *Mol Biol Cell* 12:589-99, 2001
30. Yoder BK, Hou X, Guay-Woodford LM: The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia. *J Am Soc Nephrol* 13:2508-16, 2002
31. Otto EA, Schermer B, Obara T, *et al*: Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet* 34:413-20, 2003

32. Olbrich H, Fliegauf M, Hoefele J, *et al*: Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet* 34:455-9, 2003
33. Praetorius HA, Spring KR: Bending the MDCK cell primary cilium increases intracellular calcium. *J Membr Biol* 184:71-9, 2001
34. Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, *et al*: Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet* 33:129-37, 2003
35. Hanaoka K, Qian F, Boletta A, *et al*: Co-assembly of polycystin-1 and -2 produces unique cation-permeable currents. *Nature* 408:990-4, 2000
36. Xu GM, Gonzalez-Perrett S, Essafi M, *et al*: Polycystin-1 activates and stabilizes the polycystin-2 channel. *J Biol Chem* 278:1457-62, 2003
37. Boletta A, Qian F, Onuchic LF, *et al*: Polycystin-1, the gene product of PKD1, induces resistance to apoptosis and spontaneous tubulogenesis in MDCK cells. *Mol Cell* 6:1267-73, 2000
38. Bhunia AK, Piontek K, Boletta A, *et al*: PKD1 induces p21(waf1) and regulation of the cell cycle via direct activation of the JAK-STAT signaling pathway in a process requiring PKD2. *Cell* 109:157-68, 2002

39. Chen MC, Solomon TE, Kui R, Soll AH: Apical EGF receptors regulate epithelial barrier to gastric acid: endogenous TGF- α is an essential facilitator. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283:G1098-106, 2002
40. Sunitha I, Shen R, McKillop IH, *et al*: A src-related kinase in the brush border membranes of gastrointestinal cells is regulated by c-met. *Exp Cell Res* 250:86-98, 1999
41. Leipziger J: Control of epithelial transport via luminal P2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F419-32, 2003
42. Missler M, Sudhof TC: Neurexins: three genes and 1001 products. *Trends Genet* 14:20-6, 1998
43. Tabuchi K, Sudhof TC: Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics* 79:849-59, 2002

Figure legends

Figure 1. Western blot analysis of polyductin.

A) Kidney total extract samples on 5% SDS-PAGE, probed with α -FP2 pAb, pre-competed α -FP2 pAb, α -FP2 and depleted α -FP2. B) Kidney total extract samples on 5% SDS-PAGE, probed with α -FP2 pAb, α -P5P6 and pre-immune serum (PI) corresponding to α -P5P6. C) Kidney total extract sample on 7% SDS-PAGE, probed with α -FP2 pAb. D) Kidney membrane (MF) and soluble (SF) fractions on 5% SDS-PAGE, probed with α -FP2 pAb. E) Liver total extract samples on 7% SDS-PAGE, probed with α -FP2 pAb and pre-immune serum (PI) corresponding to α -FP2. F) Pancreas total extract (TE), membrane fraction (MF) and soluble fraction (SF) samples on 7% SDS-PAGE, probed with α -P5P6 and pre-immune serum (PI) corresponding to α -P5P6. (—▶): Polyductin-specific bands described in the text. (—●): ~380-kDa band detected; see text for detail (—◆): Unspecific band, detected by pre-immune sera and immunodepleted sera.

Figure 2 The largest detected *PKHD1* product is >440 kDa in size and was immunoprecipitated from kidney total extract. A) Kidney total extract (TE) and TE α -FP2 pAb-immunoprecipitated (IP) samples on 7% SDS-PAGE, probed with α -P5P6 and pre-immune serum (PI) corresponding to

α -P5P6. B) Kidney TE α -FP2 pAb-immunoprecipitated (IP) samples run beside high-molecular-weight markers on 3.5 % polyacrylamide gel, probed with α -P5P6 and pre-immune serum (PI) corresponding to α -P5P6. (—▶): Immunoprecipitated product.

Figure 3 Immunohistochemical analysis for polyductin in human adult normal kidney samples revealed specific staining in collecting ducts and thick ascending limb of Henle. A) Analyses with α -FP2 (a), showing specific collecting duct and TALH staining in medulla, and with α -FP2 depleted antiserum (b), showing absence of signal in a serial section. Original magnification: x200; peroxidase-based technique. B) Analyses with α -FP2 pAb (a), showing specific collecting duct and TALH staining in medulla, and with pre-competed α -FP2 pAb (b), showing negative staining in a serial section. Original magnification: x400; alkaline phosphatase-based technique. C) Analyses with α -P5P6 (a, c) and pre-immune serum corresponding to α -P5P6 (b, d), showing specific collecting duct staining in cortex (a) and collecting duct and TALH staining in medulla (c), and negative staining in serial sections (b, d). Original magnification: a, b: x200; c, d: x400; alkaline phosphatase-based technique. D) Co-localization studies in cortical (a, b, c) and medullary (d, e, f) serial sections. α -FP2 (a, d) stains collecting ducts (red arrow) and TALH (green arrow) in cortex (a) and medulla (d); α -Aquaporin 2 (b, e) stains collecting ducts (red arrow) in cortex (b) and medulla (e); α -Tamm-Horsfall protein (c, f) stains TALH (green arrow)

in cortex (c) and medulla (f). Original magnification: x200; a, c, d, f; alkaline phosphatase-based technique.

Figure 4. Immunohistochemical analysis of the developmental polyductin expression profile in mouse embryos A) Kidney studies showing specific ureteric bud and tubular structure staining at 15 dpc (a: probed with α -FP2 pAb, b: probed with α -P5P6), 17 dpc (c: probed with α -FP2 pAb, d: probed with α -P5P6) and 18 dpc (e: probed with α -P5P6). Glomeruli and S-shaped bodies not stained. Original magnifications: a, b: x200, c, d, e: x400. B) Liver analysis showing specific staining in biliary ducts and some hepatocytes at 17 dpc (a: probed with α -FP2 pAb; b: probed with α -P5P6). Embryonic blood cells not stained. Original magnification: x400. C) Pancreas analysis revealing specific staining in pancreatic ducts at 17 dpc (a: probed with α -FP2 pAb; b: probed with α -P5P6). Acini were marked exclusively by α -FP2 pAb (a). Original magnification: x200. D) Salivary gland studies showing specific duct staining at 19 dpc (a: probed with α -FP2 pAb; b: probed with α -P5P6). Acini were marked exclusively by α -FP2 pAb (a). Original magnification: x200. Arrow: extra-hepatic biliary duct.

Figure 5. Immunofluorescence reveals co-localization of polyductin and acetylated α -tubulin in the primary cilium of mouse IMCD cells grown in culture. A) Ciliary and cytoplasmic expression of polyductin (green). B) Expression of acetylated α -tubulin, a primary cilium marker (red). C)

Merged image (yellow) of A and B demonstrating co-localization of polyductin and acetylated α -tubulin in cilia.

Figure 6. Immunoelectron microscopy analysis reveals polyductin specific signal in apical membrane and primary cilium of collecting duct cells. A) Specific polyductin expression in primary apical cilium with α -FP2. The image suggests two cuts in the ciliary structure, giving rise to two distinct portions of the same apical cilium visualized in this section. The sketch inset (top) indicates the likely cilium orientation. The labeling pattern detected in the middle portion of the cilium was not observed in any other evaluated structure, strongly suggesting cilium specific labeling and supporting the proposed organelle orientation. Original magnification: x40000 (bottom inset: x6000). Asterisk: nucleus. B) Specific polyductin expression in apical membrane detected with α -FP2 (a); control image showing occasional non-specific labeling with immuno-depleted α -FP2 (b). Original magnifications: a: x60000 (inset: x6000); b: x60000 (inset: x5000). Arrows and brackets: gold particles.