

Aus der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen der
Medizinischen Hochschule Hannover

angefertigt im Rahmen der strukturierten Doktorandenausbildung StrucMed

**Einfluss eines *Pkd1*-Knockout auf die Ausbildung funktionaler
Epithelstrukturen in induzierten murinen renalen Epithelzellen (iRECs)**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Friederike Heymer
geboren in Dortmund

Hannover 2020

Angenommen vom Senat am 07.03.2022

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer/in der Arbeit: Prof. Dr. med. Dieter Haffner

1. Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. Jan Faix

2. Referent/in: Prof. ' in Dr. med. Sibylle von Vietinghoff

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2022

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. med. Philipp Beerbaum

1. Prüfer/in: Prof. ' in Dr. rer. nat. Hildegard Büning

2. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Dietrich Peest

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Polyzystische Nierenerkrankungen	1
1.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)	1
1.1.1 Ätiologie der ADPKD	1
1.1.2 Diagnose und klinische Symptomatik.....	2
1.1.3 Einfluss der Mutation auf das klinischen Outcome	4
1.1.4 Genprodukte	4
1.1.5 ADPKD als Ziliopathie	5
1.1.6 Epithelzelldefekte.....	6
1.1.7 Molekulare Pathomechanismen innerhalb der Epithelzelle	9
1.1.8 Therapieoptionen.....	12
1.2. Induzierte renale Epithelzellen (<i>induced renal epithelial cells</i> , iRECs).....	13
2 Gegenstand der Arbeit	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Materialien.....	17
3.1.1 Chemikalien	17
3.1.2 Antikörper und Färbereagenzien.....	18
3.1.3 Puffer und Lösungen	18
3.1.4. Zellkultur-Medien	20
3.1.5 Geräte und Hilfsmittel	20
3.1.6. Sonstige Materialien	22
3.1.7 Software.....	22
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Induzierte renale Epithelzellen (iRECs)	23
3.2.2. Zellkultur.....	24

3.2.3 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit über die metabolische Aktivität ...	25
3.2.4 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit über die Impedanz der bedeckten Fläche.....	27
3.2.5 Einzelzelladhäsion auf mikrostrukturierten Adhäsionschips.....	27
3.2.6 Sphäroidbildung auf mikrostrukturieren Adhäsionschips.....	30
3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion	32
3.2.8 Statistische Auswertung	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Nachweis der <i>Pkd1</i> -Allele	35
4.2 Proliferationsraten von <i>Pkd1</i> -Knockoutklonen und korrespondierenden Kontrollen	36
4.2.1 Bestimmung von Populationsverdopplungszeiten anhand der metabolischen Aktivität.....	36
4.2.2. Bestimmung von Populationsverdopplungszeiten anhand der bedeckten Fläche (Impedanz).....	38
4.2.3 Vergleich der Populationsverdopplungszeiten der iREC-Klone 4 [Ctrl./ KO] und 7 [Ctrl./ KO] anhand metabolischem Assay und Impedanz der bedeckten Fläche	41
4.3 Untersuchung von Ein-Zell-Stadien von <i>Pkd1</i> -Knockout-Klonen und Kontrollen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips (700/1600 μm^2).....	42
4.3.1 Ausbreitungsregulation und Zellgröße auf kreisförmigen Adhäsionsflächen (700/1600 μm^2)	43
4.3.2 Zell-Matrix-Adhäsion von <i>Pkd1</i> -Knockout-Klonen und Kontrollen auf Kollagenbeschichteten Adhäsionsflächen	47
4.3.3 Ausbreitungsverhalten von <i>Pkd1</i> -Knockoutklonen und Kontrollen auf kreisförmigen Adhäsionsflächen (700/1600 μm^2).....	50
4.4. Ausbildung von Sphäroidstrukturen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips in 3D-Zellkultur	52
4.4.1 Technische Probleme und Protokolloptimierung	52
4.4.2 Entstehung und Charakteristik dreidimensionaler Sphäroide auf mikrostrukturierten Adhäsionschips	55
5 Diskussion	59
5.1 <i>Pkd1</i> -defiziente iRECs als Modell für Epithelzelldefekte bei ADPKD	59

5.2 Proliferationsverhalten von iREC-Klonen mit und ohne <i>Pkd1</i> -Knockout unter Zellkulturbedingungen	60
5.3. Einfluss des <i>Pkd1</i> -Knockouts auf die Kontrolle der Zell-Matrix-Interaktion	63
5.4. Ausbildung von Sphäroiden durch iRECs	66
5.5. Fazit und Ausblick	69
6 Zusammenfassung	71
7 Literaturverzeichnis	73
8 Lebenslauf.....	89
9 Danksagung.....	91
10 Erklärung zur Dissertation nach §2 Abs. 2 Nr. 7 + 8.....	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AU	arbitrary units
AVP	Arginin-Vasopressin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Zyklisches Adenosin Monophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (<i>chronic kidney disease</i>)
Ctrl.	Kontrolle
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSP	Dithiobis[succinimidylpropionate]
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ESRD	Terminale Niereninsuffizienz (<i>end-stage renal disease</i>)
FCS	Fetales Kälber Serun (<i>fetal calf serum</i>)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
iRECs	induzierte Nierenepithelzellen (<i>induced renal epithelial cells</i>)
kDA	Kilodalton
KO	Knockout
MDCK II	<i>Madin-Darby Canine Kidney II</i>
MEFs	Embryofibroblasten der Maus (<i>mouse embryofibroblasts</i>)
Min	Minute
ml	Milliliter
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered Saline</i>)

PKD	Polyzytische Nierenerkrankung (<i>polycystic kidney disease</i>)
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumteperatur
V2-Rezeptor	Vasopressin-Rezeptor Typ 2
Vgl.	Vergleich

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Pathogenese von Zystenbildung und Wachstum
- Abb. 2: cAMP vermittelte Mechanismen in Epithelzellen von ADPKD Patienten
- Abb. 3: Entstehung von iREC-Klonen
- Abb. 4: Schritte der Bildverarbeitung zur Ermittlung der Kontaktfläche
- Abb. 5: Kontrolle der *Pkd1*-Allele in iREC-Knockout-Klonen und Kontrollen
- Abb. 6: Proliferation *Pkd1*-defizienter iREC-Klone und der korrespondierenden Kontrollen anhand der metabolischen Aktivität
- Abb. 7: Impedanz Messungen innerhalb der Mikrotiter-Platte
- Abb. 8: Proliferation von *Pkd1*-Knockout-Klonen und Kontrollen, Bestimmung der Populationsverdopplungszeiten anhand der bedeckten Fläche
- Abb. 9: Vergleich der Populationsverdopplungszeit *Pkd1*-defizienter Klone und spezifischer Kontrollen anhand unterschiedlicher Messverfahren
- Abb. 10: Beispiele von Einzelzellen auf 700 μm^2 und 1600 μm^2 [Klon WT]
- Abb. 11: Prozentuale Häufigkeit der Zellgrößen auf 700/1600 μm^2 [Klon 7 Ctrl./KO]
- Abb. 12: Einzelzellen auf mikrostrukturiertem Adhäsionschips [Klon 7 Ctrl. auf 700 μm^2]
- Abb. 13: Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten von iREC-Zellklonen mit und ohne *Pkd1*-Expression
- Abb. 14: Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die Zell-Matrix-Adhäsion verschiedene iREC-Klone auf 700/1600 μm^2
- Abb. 15: Korrigierte Bestimmung der relativen Zell-Matrix-Adhäsion von *Pkd1*-defizienten iREC-Klone und Kontroll-Klonen unter Berücksichtigung aller Zellen > 450 μm^2
- Abb. 16: Ausbreitungsverhalten *Pkd1*-defizienter iREC-Klone und spezifischer Kontrollen
- Abb. 17: Sphäroidbildung auf mikrostrukturierten Adhäsionschip [Klon 7 KO auf 700 μm^2]
- Abb. 18: Beispiele für Sphäroid-Strukturen und Aggregate unterschiedlicher iREC-Klone auf Adhäsionschips

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten (Adhäsion)
- Tab. 2: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten (Sphäroidbildung)
- Tab. 3: Zusammensetzung des Master-Mix (Volumen für 1 Probe)
- Tab. 4: Versuch der Einteilung dreidimensionaler Strukturen auf Adhäsionschips

1 Einleitung

1.1 Polyzystische Nierenerkrankungen

Polyzystische Nierenerkrankungen sind genetische Nierenerkrankungen, die durch die Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Zysten charakterisiert sind. Zu den primären Zystennierenerkrankungen im Kindesalter gehören die autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD), die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), die Nephronophthise, medullär-zystische Nierenerkrankungen und HNF1 β -assoziierte zystische Nieren (Liebau, Haffner, 2015).

1.1 Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung ist die häufigste der polyzystischen Nierenerkrankungen und außerdem die häufigste genetische Nierenerkrankung des Menschen (Torres, Vicente, Harris & Pirson, 2007). Sie ist Ursache für die Niereninsuffizienz bei ca. 10% aller Patienten mit Nierenersatzverfahren (Spithoven et al., 2014) und wird meist mit einer Prävalenz von 1/400 – 1/1000 beschrieben. Diese Daten beruhen vor allem aus Studien in Kopenhagen (Dalgaard, 1957) und Olmsted County (Iglesias et al., 1983). In anderen Ländern wie z.B. Wales (Davies et al., 1991), Japan (Higashihara et al., 1998) und Frankreich (Simon et al., 1996) wurden geringere Prävalenzen erfasst (zitiert nach Torres, Vicente, Harris & Pirson, 2007).

1.1.1 Ätiologie der ADPKD

Ausgelöst wird die autosomal dominant vererbte polyzystische Nierenerkrankung durch Mutationen im *PKD1*-Gen auf Chromosom 16 (Reeders et al., 1985, The European Polycystic Kidney Disease Consortium, 1994) oder im *PKD2*-Gen auf Chromosom 4 (Kimberling et al., 1988, Kimberling et al., 1993, Peters et al., 1993) wobei ca. 85% der Patienten eine *PKD1*-Mutation und nur ca. 15% eine *PKD2*-Mutation tragen (Torra, R. et al., 1996, Rossetti et al., 2007). ADPKD-Patienten zeigen auf Grund der autosomal dominanten Vererbung meist eine positive Familienanamnese, allerdings fehlt diese in ca. 10-25% der Fälle. Für eine Erkrankung in Patienten ohne offensichtlich positiver Familienanamnese werden das Auftreten von de-novo-Mutationen, Keimzell- und somatische Mosaik oder milde Erkrankungsformen durch hypomorphe *PKD1*- oder *PKD2*-Mutationen und zum Teil auch fehlende Krankenakten der Eltern verantwortlich gemacht (Reed et al., 2008, Iliuta et al., 2017).

Neben einer Haploinsuffizienz wird bei der Entstehung von Nieren und Leberzysten außerdem ein „second- Hit“ Mechanismus diskutiert. Zusätzlich zur Keimbahn-Mutation sind weitere somatische Mutationen des normalen *PKD*-Allels bis hin zu einem kompletten Verlust der Heterozygotie mögliche entscheidende Schritte in der Ausbildung von Nierenzysten (Qian et al., 1996, Brasier, Henske, 1997, Wu et al., 1998, Pei, Y. et al., 1999, Nauli et al., 2006, Harris, 2010).

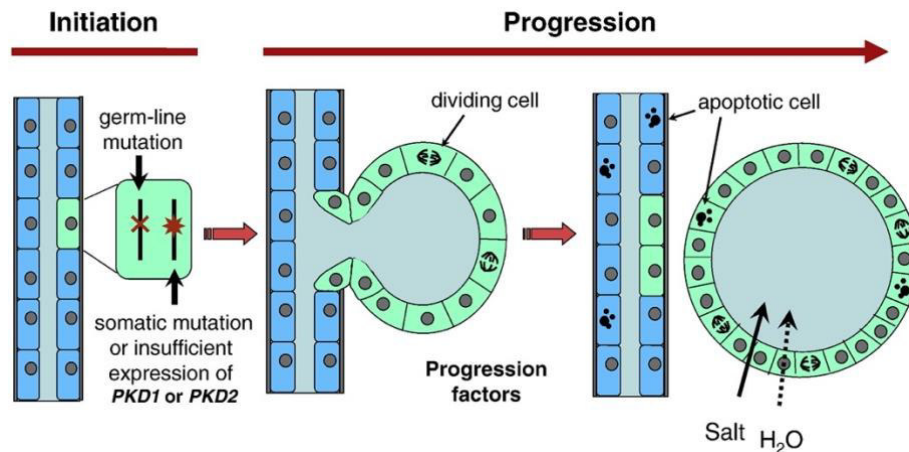


Abbildung 1: Pathogenese von Zystenbildung und -wachstum. Neben der Keimbahnmutation führt eine somatische Mutation oder insuffiziente Expression des normalen *PKD1*-Allels zur Initiierung der Zystenbildung. Faktoren wie AVP oder cAMP-Agonisten stimulieren die NaCl- und Wasser-Sekretion ins Zystenlumen, was zu Wachstum und Ausdehnung der Zysten führt (Wallace, Darren, 2011).¹

Der Nachweis einer *PKD1*-Überexpression in Epithelien aus Zysten in Nieren von ADPKD-Patienten (Geng et al., 1996, Ward et al., 1996) sowie ein Mausmodell, in dem eine Überexpression von normalen humanen Polycystin zur Zystenbildung führt (Pritchard et al., 2000), hinterfragt diese Second-Hit-Hypothese. Mögliche Ursache für die erhöhte Polycystin-Detektion in ADPKD-Zysten könnte aber auch sein, dass es sich dabei um mutiertes Polycystin ohne suffiziente Proteinfunktion handelt (Lu et al., 2001).

1.1.2 Diagnose und klinische Symptomatik

Klinisch ist die ADPKD durch beidseits massiv vergrößerter Nieren sowie das Vorliegen von ubiquitär in der Niere vorkommenden Zysten gekennzeichnet. Zur sonographischen Diagnosestellung wurden einheitliche Kriterien definiert (Pei, York et al., 2009), der definitive Ausschluss einer ADPKD im Kindesalter anhand dieser sonographischen Kriterien ist aber nicht möglich (Liebau, Haffner, 2015). Wichtigste Differentialdiagnose einer frühen Form der ADPKD ist die autosomal rezessive Form der polyzystischen Nierenerkrankungen (ARPKD) (Bergmann, 2015, Bergmann, 2019).

Die ADPKD wird häufig als Erkrankung des erwachsenen Menschen beschrieben, da die Nierenfunktion meist über einen langen Zeitraum erhalten bleibt, was durch eine kompensatorische Hypertrophie und Hyperfiltration nicht betroffener Nephrone erklärt wird (Grantham, Jared, 2015). Häufig kann die Diagnose ADPKD in Patienten mit positiver Familienanamnese aber auch schon im Kindesalter oder bereits im Uterus und der neonatalen Periode durch sonographische Darstellung von vergrößerten Nieren mit Zysten gestellt werden

¹ Reprinted from Cyclic AMP-mediated cyst expansion, *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1812 (10), Darren P. Wallace, Fig. 1. Schematic diagram illustrating the initiation and progression of cyst formation, Page No. 1292, Copyright (2020), with permission from Elsevier.

(Fick et al., 1993, Michaud et al., 1994, MacDermot et al., 1998). Eine Studie an 182 betroffenen Kindern, bei denen mittels Ultraschalles die Diagnose gesichert wurde, zeigte auch, dass betroffene Kinder im Vergleich zu nicht-betroffenen Geschwistern bereits im Kindesalter ein schnelleres Nierenwachstum und somit ein größeres Nierenvolumen haben. Trotz Progression der strukturellen Veränderungen der Niere im Kindesalter konnte in dieser Studie mit Ausnahme von 2 Kindern mit besonders schwerem Verlauf bei keinem betroffenen Kind eine Abnahme der Nierenfunktion (beschrieben durch die GFR) vor dem 25. Lebensjahr gemessen werden (Fick Brosnahan, G. M. et al., 2001). Andererseits können auch selten Fälle sehr früh-manifester ADPKD (*very early onset ADPKD*) diagnostiziert werden, die häufig im jungen Alter zu einer Einschränkung der Nierenfunktion führen (Nowak et al., 2016).

Es besteht somit eine wachsende Evidenz, dass die renale Erkrankung bereits im Uterus mit der Bildung von ersten Zysten beginnt (Grantham, Jared et al., 2010), sodass die Beschreibungen der ADPKD als Erkrankung des erwachsenen Menschen zunehmend in Frage gestellt werden (De Rechter, Breyssem & Mekahli, 2017).

Das totale Nierenvolumen sowie das totale Zystenvolumen nimmt mit dem Alter exponentiell zu und geht mit einer Abnahme bzw. einem Verlust der Nierenfunktion einher (Grantham, Jared et al., 2006). Die Zunahme des Nieren- und Zystenvolumens korreliert dabei direkt mit der Abnahme der glomerulären Filtrationsraten (Fick Brosnahan, Godela et al., 2002, Chapman, Arlene et al., 2003). Neben der Zunahme des Nierenvolumens und der Ausbildung von Zysten treten außerdem Urinkonzentrationsdefekte auf: ADPKD Pateinten zeigten im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant geringere maximale Urinosmolalität, die auch mit der Größe der Nieren negativ korreliert (Gabow et al., 1989).

Extrarenale Manifestationen

Neben den Nieren kommt es zu extrarenalen Manifestationen in ADPKD-Patienten. Leberzysten sind häufig und nehmen mit Alter und Fortschreiten der Nierenerkrankung zu (Milutinovic et al., 1980). Sie korrelieren mit der Schwere der Nierenerkrankung und treten in Frauen häufiger auf (Gabow et al., 1990, Bae et al., 2006). Es können auch Pankreaszysten (Torra, R. et al., 1997, Kim et al., 2016), Arachnoidalzysten (Schievink et al., 1995), Zysten der Samenbläschen (Torra, Roser et al., 2008), eine Divertikulose (Scheff et al., 1980, Lederman et al., 2000) und Herzklappenerkrankungen (Hossack et al., 1988, Lumiaho et al., 2001) auftreten.

Die wichtigste nicht zystische extrarenale Manifestation ist das Auftreten von intrazerebralen Aneurysmen. Die Prävalenz liegt bei 11% für nicht rupturierter Aneurysmen, wobei bevorzugt die Arteria cerebri media betroffen ist (Cagnazzo et al., 2017).

Neben den Organmanifestationen ist die ADPKD auch mit einem frühen Auftreten arterieller Hypertonie im Kindesalter assoziiert (Massella et al., 2018). Ca. 20% aller Kinder mit ADPKD

haben Bluthochdruck (Marlais et al., 2016) und das Zystenvolumen und die Zystenanzahl steigt bei Kindern mit Bluthochdruck im Vergleich zu nicht hypertensiven Kindern vermehrt an (Fick Brosnahan, G. M. et al., 2001, Cadnapaphornchai et al., 2011). Arterielle Hypertonie ist in ADPKD Patienten mit einer schlechteren Nierenfunktion assoziiert (Gabow et al., 1992) und führt zu einer Hypertrophie des linken Ventrikels (Chapman, A. B. et al., 1997, Ivy et al., 1995, Cadnapaphornchai et al., 2008). Linksventrikuläre Hypertrophie sowie arterielle Hypertonie sind Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse, die zu den häufigsten Todesursachen in ADPKD-Patienten zählen (Fick et al., 1995, Rahman et al., 2009). Trotz unterschiedlicher Ausprägung der Erkrankung beschreiben eine Vielzahl der ADPKD-Patienten zudem Schmerzen. Am häufigsten treten Schmerzen im unteren Rücken auf, aber auch abdominelle Schmerzen, Beinschmerzen, Kopfschmerzen und Brustschmerzen wurden beschrieben (Bajwa et al., 2004).

1.1.3 Einfluss der Mutation auf das klinischen Outcome

PKD1-Mutationen sind im Vergleich zu *PKD2*-Mutationen mit einem schwereren Verlauf und einem schlechteren Outcome assoziiert. Das mediane Alter bei Erreichen des terminalen Nierenversagens (*end stage renal disease*, ESRD) liegt bei Patienten mit *PKD1*-Mutation bei 58 Jahren, bei Patienten mit *PKD2*-Mutation hingegen erst bei 80 Jahren (58,1 vs. 79,7 Jahre, Cornec-Le Gall et al., 2013). Zu Beginn der Erkrankung sind Nieren an *PKD1*-Mutationen erkrankter Patienten bereits größer und haben mehr Zysten. Da kein signifikanter Unterschied der Wachstumsraten gezeigt werden konnte, wird für den schwerwiegenden Krankheitsverlauf eine frühere Ausbildung von Zysten und nicht ein schnelleres Wachstum verantwortlich gemacht (Harris et al., 2006).

Zudem beeinflusst die Lokalisation der Mutation im *PKD1*-Gen den Phänotyp der Erkrankung. Patienten mit einer Mutation in der 5' Hälfte des *PKD1*-Gens zeigen einen schwerwiegenderen Krankheitsverlauf mit einem 3 Jahre eher auftretenden terminalen Nierenversagens (ESRD) als Patienten mit einer Mutation in der 3' Hälfte des Gens (medianes Alter bei ESRD 53 vs. 56 Jahre, Rossetti et al., 2002). Die Lokalisation der Mutationen im *PKD2*-Gen beeinflusst das Alter bei Auftreten des terminalen Nierenversagens (ESRD) nicht (Magistroni et al., 2003).

1.1.4 Genprodukte

Die durch die Gene codierten Proteine Polycystin I (ca. 460 kDa) und Polycystin II (ca. 110 kDa) sind integrale Transmembranproteine (Hughes et al., 1995, The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995, Hayashi et al., 1997). Sie können miteinander interagieren und formen einen heterooligomeren *PKD1-PKD2*-Proteinkomplex (Su et al., 2018).

Polycystin I ist ein Rezeptor-ähnliches Membranprotein. Es besteht aus elf Transmembrandomänen, einem kurzen cytoplasmatischen C-Terminus und einem langen extrazellulären N-

Terminus. Dieser enthält eine Vielzahl an Domänen, die an Protein-Protein und Protein-Carbohydrat Interaktionen beteiligt sind (Hughes et al., 1995, The International Polycystic Kidney Disease Consortium, 1995, Burn et al., 1995).

Polycystin II enthält sechs Transmembrandomänen und ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der zur TRP (transient receptor potential) - Familie gehört (Mochizuki et al., 1996, Hoffmeister et al., 2011). Der Kanal weist eine erhöhte Permeabilität für Calcium auf (González Perrett et al., 2001, Vassilev et al., 2001) und wird durch eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration aktiviert (Koulen et al., 2002).

Beide Proteine wurden an unterschiedlichen Lokalisationen innerhalb der Nierenepithelzellen nachgewiesen. Polycystin I wurde in Fokalkontakten, Desmosomen sowie Adhärenzverbindungen lokalisiert (Huan, van Adelsberg, 1999, Wilson, P. D. et al., 1999, Scheffers, M. S. et al., 2000, Silberberg et al., 2005). Polycystin II wurde im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen, konnte aber auch in der Plasma-Membran und dem Golgi-Apparat lokalisiert werden (Cai et al., 1999, Scheffers, Martijn et al., 2002).

1.1.5 ADPKD als Ziliopathie

Eine gemeinsame Lokalisation von Polycystin I und II konnte in der primären Zilie von Nierenzellen nachgewiesen werden (Pazour et al., 2002, Yoder, Hou & Guay Woodford, 2002, Nauli et al., 2003). Primäre Zilien sind nicht motile, aus neun zirkulär angeordneten Mikrotubulus-Paaren aufgebaute Strukturen, deren Ursprung im Basalkörper der Zelle liegt (Satir, Pedersen & Christensen, 2010). Sie sind auf den meisten Zellen in Säugetieren zu finden, nehmen dort eine Vielzahl an Reizen zur Regulation von Differenzierung und Wachstum der Zelle aus dem Extrazellularraum auf und übertragen diese Signale ins Innere der Zelle (Hildebrandt, Benzing & Katsanis, 2011, Sánchez, Dynlacht, 2016).

Auf der Basis der Beobachtung, dass Inaktivierung essentieller Proteine des Zilien-Zentrosomen-Komplexes in einem zystischen Nieren-Phänotyp resultiert (Lin et al., 2003) sowie der Lokalisation verschiedenster betroffener Genprodukte polyzystischer Nierenerkrankungen innerhalb der primären Zilie (Hildebrandt, Benzing & Katsanis, 2011), wurde die sogenannte ziliäre Hypothese formuliert (Pazour, 2004). Diese beinhaltet, dass die Zilie als Schaltstelle in Signal-Transduktion-Wegen fungiert, welche die Integrität des Nierennephrons überwachen und Zellproliferation und Differenzierung kontrollieren (Pazour, 2004). Eine Dysfunktion der primären Zilie führt zu einer gestörten Regulation dieses Signalwegs und kann zur Zystenbildung führen (Pazour, 2004). Der primären Zilie wird somit eine zentrale Rolle in der Pathogenese polyzystischer Nierenerkrankungen zugeschrieben, weshalb auch die ADPKD den Ziliopathien zugeordnet wird (Hildebrandt, Benzing & Katsanis, 2011). Die genauen Pathomechanismen, die für die Entwicklung von Zysten verantwortlich sind, sind nicht endgültig geklärt und stehen im Fokus aktueller Forschung.

Auch die Funktionen des Polycystine I und II in der apikalen Membran der primären Zilie werden diskutiert. Möglicherweise fungiert Polycystin I als ein Mechanosensor, der durch Flüssigkeitsstrom verursachte Krümmungen der primären Zilie aufnimmt. Durch Aktivierung von Polycystin II Calcium-Kanälen kommt es zu einem lokalen Calcium-Influx und somit zu einer Umwandlung von einem mechanischen in ein chemisches Signal. Dieser Calcium-Einstrom führt zu einer Calcium getriggerten Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Die daraus resultierende lokale Änderung der Calcium-Konzentration reguliert möglicherweise molekulare Zellaktivitäten (Nauli et al., 2003). Nauli et al., (2006) konnten ebenfalls zeigen, dass immortalisierte und primär kultivierte Zystenepithelzellen von ADPKD Patienten mit *PKD1*-Mutation nicht auf Flüssigkeits-induzierten Scherstress reagieren. Nierenepithelzellen aus nicht-dilatierten, normalen humanen ADPKD Nierentubuli hingegen zeigten nach Flüssigkeits-induziertem Stress eine Änderung der zytosolischen Calcium-Konzentration. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass ein Verlust der Mechanosensorik eine zentrale Eigenschaft von Nierenepithelzellen in PKD-Zysten ist (Nauli et al., 2006).

Im Gegensatz dazu konnten Delling et al. (2016) in multiplen Zelltypen sowie in Nierenepithelzellen keine Änderung der intrazellulären Calcium-Konzentration nach mechanischer Stimulation nachweisen, was den Verlust der Mechanosensorik, vermittelt über einen Calcium-Signalweg, als zentralen Mechanismus polyzystischer Nierenerkrankungen in Frage stellt.

1.1.6 Epithelzelldefekte

Neben einer Dysfunktion der primären Zilie konnten verschieden Epithelzelldefekte in Epithelien tubulärer Nierenzysten in ADPKD Patienten nachgewiesen werden. Zu den wichtigsten Defekten gehören eine gesteigerte Flüssigkeitssekretion (1), ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose (2), Abnormalitäten der Zell-Matrix-Adhäsion (3) und eine veränderte Polarität von Membranproteinen (4). Diese zentralen Epithelzelldefekte werden im Folgendem ausgeführt.

(1) Gesteigerte Flüssigkeitssekretion

Die ADPKD ist durch eine große Anzahl flüssigkeitsgefüllter Zysten charakterisiert. Da die meisten Zysten keine Verbindung zum Tubuluslumen mehr haben, wird eine erhöhte Sekretion der Zysten-begrenzenden Epithelzellen für die Flüssigkeitsansammlung im Lumen verantwortlich gemacht (Grantham, J. J., Geiser & Evan, 1987). Antrieb für diese Flüssigkeitssekretion ist vor allem eine cAMP vermittelte Chlorid-Sekretion durch CFTR-Kanäle ins Zystenlumen (Grantham, J. J. et al., 1995, Hanaoka et al., 1996, Davidow et al., 1996, Wallace, D. P., Grantham & Sullivan, 1996). Zudem ist auch die Fehllokalisation und erhöhte Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase in der apikalen Plasmamembran von ADPKD-Epithelien ein entscheidender Faktor in der Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Zysten, da diese zu einer abnormalen Natrium-Sekretion ins Lumen führt (Wilson, P. D. et al., 1991). Chlorid- und Natrium-Ionen konnten als wesentliche Bestandteile in Zystenflüssigkeit von ADPKD-Nieren nachgewiesen werden (Grantham, J. J. et al., 1995).

(2) Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation

Eine erhöhte Proliferation tubulärer Epithelzellen ist ein essenzieller Schritt in der Entwicklung von Nierenzysten, die mit einer Zunahme des Nierenvolumens einhergeht. Erste Beobachtungen eines veränderten Wachstums von Nierenepithelzellen in ADPKD-Patienten wurden anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen gemacht, in denen eine Hyperplasie der Nierenepithelzellen als Voraussetzung zur Ausbildung von Zysten beschrieben wurde (Evan, Gardner & Bernstein, 1979, Grantham, J. J., Geiser & Evan, 1987). Zudem konnten in kultivierten zystischen Nierenepithelzellen sowohl von ADPKD- als auch ARPKD-Patienten eine erhöhte proliferative Aktivität und gesteigerte Proliferationsraten im Vergleich zu Nierenepithelzellen aus gesunden Nieren gezeigt werden (Wilson, P. D. et al., 1986, Wilson, P. D., Hreniuk & Gabow, 1992, Nadasdy et al., 1995).

Hinweise auf eine bedeutsame Funktion einer gesteigerten Proliferation in der Ausbildung von Zysten geben Untersuchungen, in denen induzierte Proliferation durch genetische Manipulationen in Nierenzysten resultieren. Beispielsweise führte eine Überexpression von c-myc oder SV40-LT in transgenen Mäusen ebenfalls zu vergrößerten zystischen Nieren (Trudel, D'Agati & Costantini, 1991, Kelley et al., 1991) und auch transgene Mäuse mit einem mutierten Ras-Onkogen entwickelten Nierenzysten (Schaffner et al., 1993). Der epidermale Wachstumsfaktor EGF konnte zusätzlich als wichtiger Faktor bei der Expansion von Nierenzysten identifiziert werden. Epithelzellen aus Nierenzysten von ADPKD-Patienten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber EGF-Stimuli und eine vermehrte EGF Sekretion ins Zystenlumen konnte nachgewiesen werden. Die zusätzliche Fehllokalisation empfindlicher EGF-Rezeptoren in der apikalen Membran der Epithelien ermöglicht einen autokrinen

Kreislauf zwischen Sekretion von EGF und dadurch induzierte Proliferation der Nierenepithelzellen (Wilson, P. D., Du & Norman, 1993, Du, Wilson, 1995).

Neben einer erhöhten Proliferation spielt auch die Apoptose eine entscheidende Rolle. Nach Inaktivierung von Apoptoseinhibitoren wie *bcl-2* konnten in Knockout-Mäusen zystische Nieren beobachtet werden (Veis et al., 1993). Zudem konnte eine erhöhte Anzahl an Apoptosen in nicht dilatierten Nephronen aus polyzystischen humanen Nieren von *cpk* sowie *pcy* Mäusen ermittelt werden. Im Gegensatz dazu konnten in Nierenzellen von gesunden Menschen und Mäusen keine apoptotischen DNA-Fragmente im Zellkern nachgewiesen werden. (Woo, D., 1995). Diese Studie weist somit einen möglichen Zusammenhang zwischen Apoptose und dem progressiven Verlust des gesunden Nierenparenchyms nach (Woo, D., 1995).

Insgesamt wurden damit sowohl erhöhte Proliferationsraten als auch Apoptoseraten in polyzystischen Nieren nachgewiesen. Dabei wird vor allem die Kombination aus Apoptose und kompensatorischer Proliferation der Nierenepithelzellen als zentraler Mechanismus in der Pathogenese von Nierenzysten gesehen (Wilson, Patricia, 2004, Edelstein, 2005, Goilav, 2011).

(3) Veränderungen der Zellmatrix-Interaktion

Bereits in den 1980er Jahren konnten Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktion von Epithelzellen aus Nierenzysten von ADPKD Patienten nachgewiesen werden: Basalmembranen der zystenbegrenzenden Epithelien in Nieren von ADPKD Patienten sind deutlich verdickt (5-25 fach) (Katz et al., 1989, Wilson, P. D., Hreniuk & Gabow, 1992) und weisen im Vergleich zu gesunden Nieren eine veränderte Morphologie und Ultrastruktur auf, was Defekte in der Synthese der Basalmembran vermuten lässt (Cuppige et al., 1980, Wilson, P. D. et al., 1986). Auch wurde eine Überproduktion von Proteinen der extrazellulären Matrix in PKD-Epithelien (Candiano et al., 1992) sowie eine Überexpression von Alpha2-Integrinen (Wilson, P. D. et al., 1999) und Beta4-Integrinen (Joly et al., 2003) nachgewiesen.

Die Kolo-kalisation von Polycystin I mit Alpha2-Beta1-Integrinen, Vinculin und Paxillin in Fokalkontakten deutet eine Funktion des Polycystins in der Regulation der Zell-Matrix-Adhäsion an, die durch Polycystin-Defekte in ADPKD Patienten gestört ist. Beispielsweise zeigen ADPKD-Epithelzellen im Vergleich zu gesunden renalen Epithelzellen eine verstärkte Adhäsion zu Kollagen Typ I *in vitro* (Wilson, P. D. et al., 1999).

Weitere Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Veränderungen in der ECM und der Ausbildung von Zysten geben Maus-Studien, in denen Mutationen in Proteinen der ECM oder Fokalkontakten ebenfalls zur Ausbildung von Nierenzysten führen. Eine Insertion im Laminin-alpha-5 Gen verursacht polyzystische Nieren (Shannon et al., 2006) und auch das Fehlen des Fokalkontakt-Proteins Tensin induziert eine unterschiedlich stark ausgeprägte Zystenbildung in den Nieren (Lo et al., 1997).

Die Proliferation von ADPKD-Epithelien und gesunden Epithelzellen wird zudem durch exogen zugefügte Matrixproteine beeinflusst. Dies lässt vermuten, dass Veränderungen der extrazellulären Matrix von renalen Epithelien in ADPKD-Patienten ebenfalls einen Einfluss auf das proliferative Verhalten der Zellen haben (Wilson, P. D. et al., 1999).

(4) Polaritätsdefekte

Funktionelle Asymmetrie von Epithelzellen ermöglicht in gesunden Nierenzellen einen vektoriellen Transport zwischen Blut und Tubuluslumen (Silbernagl, 2018). In Nierenzysten begrenzenden Epithelzellen ist diese Polarität vor allem durch veränderte Lokalisation von Membranproteinen gestört (Wilson, P. D., 1997). Unter normalen Bedingungen ist eine basolaterale Natrium-Kalium-ATPase zur Ausbildung und Aufrechterhaltung von osmotischen und elektromechanischen Gradienten verantwortlich. Diese Gradienten sind Antrieb für den Transport von Ionen und gelösten Substanzen und indirekt auch für die Rückresorption von Flüssigkeit (Silbernagl, 2018). Wilson et al. (1991) konnten eine Fehllokalisierung und eine erhöhte spezifische Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase in der apikalen Membran von ADPKD Epithelien nachweisen (Wilson, P. D. et al., 1991). Diese Fehllokalisierung korreliert mit einer Umkehr des vektoriellen Natrium-Transportes von basalen in apikale Kompartimente und führt zu einer abnormalen Natrium-Sekretion ins Lumen der Zysten (Wilson, P. D. et al., 1991). Zudem wurden fehllokalisierte hochaffine EGF-Rezeptoren in der apikalen Membran gefunden. Ins Zystenlumen sezerniertes EGF kann diese EGF-Rezeptoren aktivieren und somit einen autokrinen, mitogenen Effekt innerhalb der Epithelzelle induzieren (Wilson, P. D., Du & Norman, 1993, Du, Wilson, 1995).

Des Weiteren konnte eine Änderung der Sekretionsrichtung der lysosomalen Proteine Cathepsin B und L ins basolaterale Kompartiment nachgewiesen werden, die durch Degradation mitverantwortlich für Veränderungen der ECM und Basalmembranzusammensetzung sein könnten (Hartz, Wilson, 1997).

Nicht alle Proteine zeigten eine geänderte Polarität; diverse Matrix-Proteine (Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat Proteoglykane) waren weiterhin in der basalen Membran lokalisiert, sodass es sich in ADPKD-Epithelien nicht um eine komplette Umkehr der Membranpolarität handelt (Wilson, P. D., 1997).

Den Proliferations- und Sekretionsdefekten liegt somit eine geänderte Kontrolle der Polarität von ADPKD-Epithelzellen zu Grunde.

1.1.7 Molekulare Pathomechanismen innerhalb der Epithelzelle

Zyklisches Adenosin Monophosphat (cAMP) spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ADPKD (Torres 2004) und ist stimulierender Faktor für Proliferation und Wachstum sowie für transepitheliale Flüssigkeitssekretion (Hanaoka, Guggino, 2000, Belibi et al., 2004).

In diversen ADPKD Mausmodellen konnte eine Erhöhung des intrazellulären cAMP in zystischen Nierenepithelzellen nachgewiesen werden (Yamaguchi, T. et al., 1997, Gattone et al., 2003, Torres, Vincente, 2004, Smith et al., 2006, Starremans et al., 2008, Hopp et al., 2012). Hierfür können unterschiedliche Mechanismen verantwortlich sein:

(1) Arginin Vasopressin (AVP), ein cAMP Agonist, führt zu einer Erhöhung der cAMP Spiegel in Nierenepithelzellen (Yasuda, Jeffries, 1998) und spielt somit eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Nierenzysten. In ADPKD-Patienten konnten beispielsweise hohe Copetin-Plasma-Konzentrationen (als Marker für Vasopressin (Morgenthaler et al., 2006)) gemessen werden, die mit einer Abnahme der Nierenfunktion assoziiert sind (Boertien et al., 2012).

Die genetische Elimination von AVP führte in einem PKD-Rattenmodell zu einer nahezu kompletten Inhibition der Zystenbildung. Synthetisches AVP führte zu erhöhten cAMP-Spiegeln und zu einer Verstärkung des PKD-Phänotyps (Wang et al., 2008). Auch konnte eine erhöhte renale Expression des Vasopressin-Rezeptors 2 im zystischem Nierengewebe in Mäusen nachgewiesen werden (Gattone et al., 2003, Torres, Vicente et al., 2004, Starremans et al., 2008).

(2) Des Weiteren wird cAMP auch durch die intrazelluläre Calcium-Konzentration reguliert. In kultivierten Epithelzellen aus Zysten von ADPKD-Patienten konnte im Vergleich zu normalen humanen Nieren geringere intrazelluläre Calcium Konzentrationen gemessen werden (Yamaguchi, Tamio et al., 2006). Eine verminderte Calcium-Konzentration erhöht die Aktivität der Ca^{2+} -inhibierbare Adenylcyclase IV, inhibiert die Ca^{2+} -abhängige Phosphodiesterase I und führt somit zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration an cAMP (Kusano et al., 1985, Chabardès, Imbert Teboul & Elalouf, 1999, Héliès Toussaint et al., 2000, Wang et al., 2010). cAMP stimuliert die Proliferation, das Wachstum und die transepitheliale Chlorid-Sekretion durch CFTR Kanäle von Epithelzellen in ADPKD Patienten (Wallace, D. P., Grantham & Sullivan, 1996, Hanaoka et al., 1996, Hanaoka, Guggino, 2000, Yamaguchi, T. et al., 2000, Belibi et al., 2004). Dies wird durch Aktivierung der Proteinkinase A und weiterer Signalwege wie dem ERK (extracellular signal regulated kinase)/MAPK (mitogen activated protein kinase) - Signalweg, dem m-Tor-Signalweg und dem Wnt-Signalweg vermittelt (Devuyst, Torres, 2013).

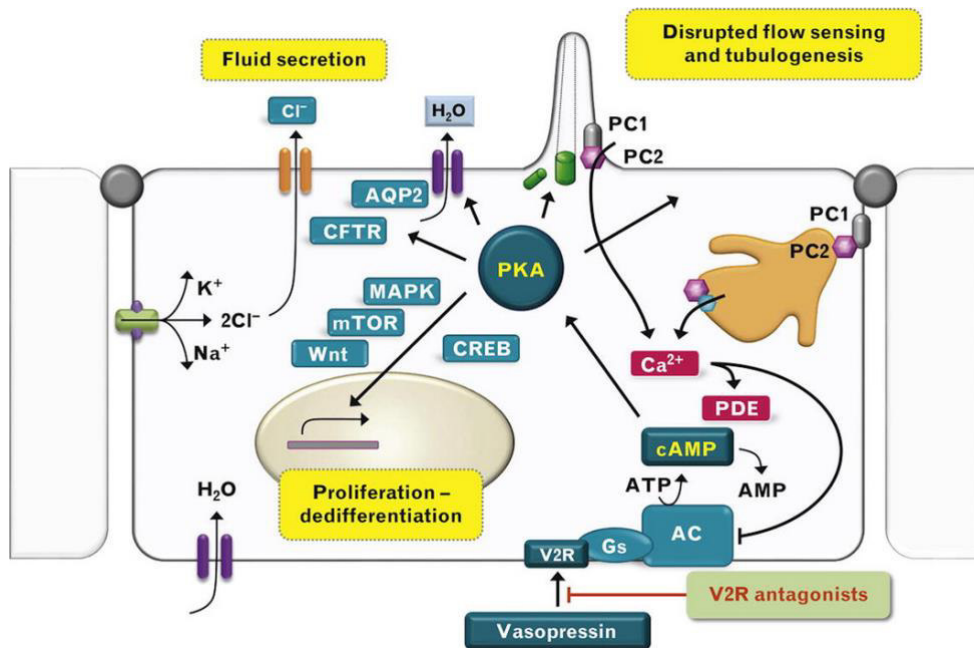


Abbildung 2: cAMP vermittelte Mechanismen in Epithelzellen von ADPKD Patienten. Epithelzellen von ADPKD Patienten weisen erhöhte cAMP-Spiegel auf, die vermutlich durch eine verminderte intrazelluläre Calcium-Konzentration und eine Stimulation des Vasopressin-Signalwegs verursacht werden. cAMP fördert u.a. über eine Aktivierung der Proteinkinase A die Proliferation und Flüssigkeitssekretion der Epithelzelle (Devuyst, Torres, 2013).²

Folglich dienen Vasopressin-Rezeptoren in verschiedene Studien als möglicher therapeutischer Angriffspunkt. V2-Rezeptor-Antagonisten konnten in unterschiedlichen PKD-Modellen (ADPKD, ARPKD, Nephronophthise) den Krankheitsfortschritt inhibieren (Gattone et al., 2003, Torres, Vicente et al., 2004, Wang et al., 2005, Meijer et al., 2011, Hopp et al., 2015). Auch Tolvapatan (Jinarc), das einzig zugelassene Medikament zur Behandlung der adulten ADPKD in der EU, ist ein Vasopressin Antagonist (European Medicines Agency, 2018).

² Reprinted from Osmoregulation, vasopressin, and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease, Current Opinion in Nephrology and Hypertension, 22(4), Olivier Devuyst and Vicente E. Torres, Figure 1. Role of 3'-5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in autosomal dominant polycystic kidney disease cyst-lining epithelial cells, Page No. 461, <https://journals.lww.com/co-nephrolhypertens/pages/default.aspx>, with permission from Wolters Kluwer Health. Wolters Kluwer Health, Inc. and its Societies take no responsibility for the accuracy of the translation from the published English original and are not liable for any errors which may occur.

1.1.8 Therapieoptionen

Für Erwachsene ist seit 2015 der Vasopressin-Antagonist Tolvaptan (Jinarec) zugelassen, der zunächst in PKD-Tiermodellen zu einer Reduktion der cAMP Konzentration innerhalb Epithelzellen und zur Reduktion der Zystenbildung führte (Aihara et al., 2014). Die TEMPO 3:4 Studie (Tolvaptan Efficacy and Safety in Management of PKD and Outcomes) konnte zeigen, dass Tolvaptan im Vergleich zum Placebo in Patienten mit früher ADPKD (18-50 Jahre, eGFR $\geq 60\text{ml/min}^{-1}$) die Zunahme des totalen Nierenvolumens vermindert und mit einem geringeren Verlust der Nierenfunktion assoziiert ist (Torres, Vicente et al., 2012).

In der ergänzenden REPRISE Studie konnte Tolvaptan 2017 ebenfalls positive Effekte auf den Verlust der GFR in späten ADPKD Stadien (Alter 18-65, eGFR 25-65ml/min/1,73m²) zeigen (Torres, Vicente et al., 2017). Als unerwünschte Arzneimittelwirkung wurde in beiden Studien unter der Therapie eine Erhöhung der Serum-Transaminasen beobachtet, sodass für Tolvaptan behandelte Patienten ein Monitoring der Leberenzyme wichtiger Bestandteil der Therapie ist (Torres, Vicente et al., 2012, Torres, Vicente et al., 2017).

Zudem führten mTOR-Inhibitoren im PKD-Tiermodell zu einer Reduktion von Zystenwachstums und Proliferation sowie zu einem geringeren Verlust der Nierenfunktion (Wahl et al., 2006, Shillingford et al., 2010). In klinischen Studien konnten mTor-Inhibitoren jedoch bisher nicht überzeugen: In einer 18 Monatigen Studie an 100 frühmanifesten ADPKD-Patienten (18-40 Jahre) führte Sirolimus nicht zu einer verringerten Zunahme des Nierenvolumen (Serra et al., 2010). In ADPKD-Patienten mit schwerer Niereninsuffizienz (CKD Stadium 3b-4) hatte Sirolimus ebenfalls keine positiven Effekte. Auf Grund schwerer unerwünschter Arzneimittelwirkungen wurde die Studie frühzeitig beendet (Ruggenti et al., 2016).

Neben der Behandlung der symptomatischen Beschwerden wird, auf Grund der Korrelation zwischen Bluthochdruck, Nierenvolumen und Zystenanzahl im Kindesalter, vor allem bei Kindern mit schwerwiegende strukturellen Veränderungen der Niere eine regelmäßige Kontrolle des Blutdrucks sowie gegebenenfalls eine Einstellung des Hypertonus empfohlen (Seeman et al., 2003).

Bei Eintreten des terminalen Nierenversagens (ESRD) ist letztlich ein Nierenersatzverfahren (renal replacement therapy, RRT) indiziert. Der prozentuale Anteil aller RRT-Patienten mit ADPKD beträgt ca. 9,8%. Nach einer Analyse des ERA-EDTA-Registers (1991-2010) erhielten die meisten ADPKD-Patienten eine Nierentransplantation (59,1%) oder Hämodialyse (35,1%). Eine Peritonealdialyse erhielten nur 5,8% der Patienten (Spithoven et al., 2014).

Bisherige beschriebene Forschungsergebnisse und Behandlungsansätze beruhen vor allem auf Studien an verschiedenen Tiermodellen (Guay Woodford, 2003, Nagao et al., 2012, Menezes, Germino, 2013, Happé, Peters, 2014, Woo, Y., Ko & Lee, 2016), sowie auf Analysen

an Zellen, die aus resezierten polyzystischen Nieren von betroffenen Patienten isoliert und kultiviert wurden (z.B. Wilson, P. D. et al., 1985, Wilson, P. D. et al., 1986).

Ein von Kaminski et al. 2016 publiziertes *in vitro* Zellmodell liefert mit sogenannten induzierten renalen Epithelzellen (iRECs) einen weiteren neuen, alternativen Ansatz, der erlauben soll, genetische Nierenerkrankungen, wie die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung, effizienter zu erforschen und Krankheitsprozesse besser verstehen und behandeln zu können (Kaminski et al., 2016).

1.2. Induzierte renale Epithelzellen (*induced renal epithelial cells*, iRECs)

Induzierte renale Epithelzellen (iRECs) sind Nierenepithelzellen die mit Hilfe direkter Reprogrammierung erzeugt werden: Durch Expression der vier nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren *Emx2*, *Hnf1b*, *Hnf4a*, *Pax8* können murine Fibroblasten in induzierte renale Epithelzellen (iRECs) reprogrammiert werden. Diese zeigen epitheliale Eigenschaften, ähneln natürlichen Nierentubuluszellen in Aussehen und Form und zeigen zudem ein vergleichbares Stoffwechselprofil.

Trotzdem bestehen einige Unterschiede zu primären Nierenepithelzellen. Beispielsweise exprimieren iRECs segmentspezifische Proteine von multiplen renalen Tubulussegmenten und können somit keinem spezifischen Tubulusabschnitt zugeordnet werden.

Insgesamt sollen iRECs vor allem der Etablierung von Krankheitsmodellen dienen, die neue Ansätze zur Erforschung genetisch verursachter Nierenerkrankungen ermöglichen könnten. Zudem wäre der Einsatz in pharmakologische und toxikologische Tests möglich, da iRECs sensitiv gegenüber nephrotoxischen Substanzen sind (Kaminski et al., 2016, Lagies et al., 2018)

2 Gegenstand der Arbeit

Die genauen Pathomechanismen der Epithelzelldefekte in polyzystischen Nierenerkrankungen sind bisher nicht abschließend geklärt, weiterhin fehlen geeignete, genetisch definierte Zelllinien zur Untersuchung spezifischer Funktionseinschränkungen. Induzierte renale Epithelzellen (iRECs) sollen einen neuen, alternativen Ansatz zur Erforschung genetisch verursachter Nierenerkrankungen ermöglichen und werden in dieser Arbeit erstmals als Zellmodell für genetisch verursachte Epithelzelldefekte getestet. Mutationen im *PKD1*-Gen bilden die häufigste Ursache für autosomal dominante polyzystische Nieren im Menschen. Daher werden als Modell für Defekte der Nierenepithelzellen von ADPKD Patienten murine iRECs mit selektivem *Pkd1*-Verlust verwendet und mit Kontrollzellen ohne *Pkd1*-Knockout verglichen.

iREC-Klone mit und ohne *Pkd1*-Knockout [KO/Ctrl.] wurden durch direkte Reprogrammierung über die kombinierte Expression der nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren *Emx2*, *Hnf1b*, *Hnf4a* und *Pax8* (Kaminsiki et al., 2016) aus transgenen Mäusen mit einem geflochtenen *Pkd1*-Allel erzeugt. Anschließend wurden die Klone mit Cre bzw. Flippase transduziert, sodass Klone mit *Pkd1*-Knockout (Cre-Behandlung) und korrespondierende Kontrollklone (Flippase-Behandlung) entstehen. Diese iREC-Klone geben uns die Möglichkeit, gezielt epitheliale Funktionen *in vitro* zu untersuchen, und lassen einen direkten Vergleich zwischen genetisch identischen Nierenepithelzellklonen mit und ohne selektivem *Pkd1*-Knockout zu.

Eine vergleichende Analyse der Ausbildung funktionaler Epithelzellstrukturen, sowie deren Störung durch einen selektiven Verlust des *Pkd1*-Gens soll uns erlauben einzuschätzen, inwiefern iRECs als Modell zur Untersuchung zellautonomer Epithelzelldefekte geeignet sind. Für den direkten Vergleich werden mehrere iREC-Zellklone mit *Pkd1*-Knockout und korrespondierende Kontrollklone sowie der in Kaminski et al. (2016) verwendete Wildtyp-iREC-Klon (als zusätzlicher Kontrollklon) kultiviert und hinsichtlich ihrer Zelleigenschaften und Epithelzellcharakteristiken untersucht. Im Fokus steht dabei eine Betrachtung der zentralen Eigenschaften Proliferation, Zell-Matrix-Interaktion, und Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels, für welche Änderungen an Epithelzellen von ADPKD-Patienten beschrieben wurden. Zur Bestimmung dieser Eigenschaften werden Populationsverdopplungszeiten ermittelt, sowie Zellmorphologie und Verhalten in 3D-Zellkultur untersucht.

Die Untersuchung der Zell-Matrix-Interaktion erfolgt anhand mikrostrukturierter Adhäsionschips (CYTOO SA, Grenoble, Frankreich), auf denen kreisförmige Flächen eine definierte Adhäsionsfläche vorgeben. Die Anordnung ist den Bedingungen im Gewebe nachempfunden, in dem das Mikroumfeld, d.h. die extrazelluläre Matrix und die benachbarten Zellen, das Zellvolumen und die Zellausbreitung begrenzen (Théry, 2010).

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels kann anhand von dreidimensionalen Sphäroiden ebenfalls auf mikrostrukturierten Adhäsionschips in 3D-Zellkultur untersucht werden. Die Sphäroid-Kultur ist eine *in vitro* Methode, in der Epithelzellen hochorganisierte Strukturen mit apiko-basaler Polarität und einem zentralen Lumen ausbilden. Diese 3D-Zellkultur bildet, im Vergleich zur konventionellen Zellkultur, die physiologischen *in vivo* Bedingungen besser ab (Pampaloni, Reynaud & Stelzer, 2007) und wird in dieser Arbeit genutzt, um Konsequenzen des *Pkd1*-Verlustes in iRECs als Modell für die Erkrankung ADPKD zu untersuchen. Kaminski et al. (2016) konnten bereits zeigen, dass iRECs im Matrigel Sphäroide mit zentralem Lumen und apiko-basaler Polarität ausbilden. In dieser Arbeit wurde die Sphäroidbildung von iRECs mit und ohne *Pkd1*-Verlust auf mikrostrukturierten Adhäsionschips getestet.

Ziel dieser Arbeit ist die Prüfung und Etablierung induzierter renaler Epithelzellen (iRECs) als Zellmodell zur Untersuchung genetisch verursachter Epithelzelldefekte der Niere, am Beispiel der polyzystischen Nierenerkrankung ADPKD. Die Untersuchung wird anhand einer vergleichenden Analyse von iREC-Klonen mit und ohne selektivem *Pkd1*-Knockout durchgeführt.

Wir möchten prüfen, ob genetisch veränderte iRECs die gleichen epithelialen Charakteristiken aufweisen, wie dies für den *Pkd1*-Wildtyp-Klon in Kaminski et al. (2016) beschrieben wurde (Kaminski et al., 2016). Ferner soll beantwortet werden, inwiefern iRECs mit einem *Pkd1*-Knockout (KO) epitheliale Defekte renaler Tubuluszellen zeigen, die in bisherigen ADPKD-Modellen beschrieben wurden.

Die aus diesen Analysen resultierenden Ergebnisse sollen uns eine Beurteilung ermöglichen, ob iRECs ein geeignetes Zellmodell zur Untersuchung genetisch verursachter Epithelzelldefekte darstellen können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Chemikal	Firma
10x PCR Puffer	Quiagen; Hilden, DE
Agarose neo Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH; Karlsruhe, DE
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Gebro Biotechnik; Heidelberg, DE
Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck; Darmstadt, DE
CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega; Madison, USA
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Dithiobis[succinimidylpropionate] (DSP)	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), high Glucose (#41965-039)	Life technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
dNTP Mix	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Esel Normal Serum – <i>Normal donkey Serum (NDS)</i>	Merck Millipore; Darmstadt, DE
Ethanol 99,8%, vergällt	AppliChem; Darmstadt, DE
Fetal Bovine Serum (FBS) South America, #S1810, Chargen: #S09108S1810, #S11971S1810	Biowest; Nuaille, FR
Fibrinogen	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
GlutaMAX -(100X)	Life technologies, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt; DE
Kollagen I (0,1 %, <i>from calf skin</i>), #C8919	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Magensiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Merck; Darmstadt, DE
Matrigel Basement Membrane Matrix, #354234	Corning; Kaiserslautern, DE
Natronlauge (NaOH), 2 mol/L	AppliChem; Darmstadt, DE
Paraformaldehyd Tabletten ~ 1g technisch	AppliChem; Darmstadt, DE
Penicillin Streptomycin #A2212	Biochrom; Berlin, DE
Phosphate Buffered Saline (10X)	Life technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Proteinkinase K	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Renal Epithelial Cell Basal Medium, PCS-400-030	ATCC; Wesel, DE
Renal Epithelial Cell Growth Kit, PCS-400-040 (Epinephrine, FBS, rh EGF, rh Insulin,	ATCC; Wesel, DE

Triiodthyronine, Hydrocortisone, L-Ala-L-Gln, Transferrin)	
Shandon Immu-Mount	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Taq DNA Polymerase	Quiagen; Hilden, DE
Triton X-100	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Trypsin / EDTA 0,25%,	Biochrom; Berlin, DE
Ziege Normal Serum – <i>Normal Goat Serum (NGS)</i>	Agilent, Dako; Frankfurt, DE

3.1.2 Antikörper und Färbereagenzien

Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Klon	Firma
Anti-Acetyliertes Tubulin-IgG	Maus	6-11B-1 (monoklonal)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Anti-E-Cadherin-IgG #3195	Kaninchen	24E10 (monoklonal)	Cell Signalling Technologies; Frankfurt, DE
Anti-Vinculin-IgG #4650	Maus	hVIN-1 (monoklonal)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE (Catalog Number V9131)

Sekundärantikörper und Färbereagenzien

Antikörper	Firma
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), 0,25 µg/ml	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, DE
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) #A21202	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Alexa Fluor 555 goat anti-mouse IgG (H+L) #21422	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt DE
Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (H+L) #A21428	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt DE
Alexa Fluor 647 Phalloidin #A22287	Life Technologies, Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE

3.1.3 Puffer und Lösungen

Phosphatgepufferte Saline (1x PBS, pH 7,2), in ddH₂O

Substanz	Konzentration
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	2,71 mM
Kaliumhydrogenphosphat (KHPO ₄)	1,54 mM
Natriumchlorid (NaCl)	155,17 mM

DPBS, Dulbecco's PBS (PBS mit Ca^{2+} und Mg^{2+}), in 1x PBS

Substanz	Konzentration
Kalziumchlorid (CaCl_2)	9 mM
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	5 mM

4% PFA in PBS (4% PFA), 25ml

Substanz	Menge (Volumen/Gewicht)
Paraformaldehyd PFA	1 g
1x PBS	20 ml
0,2 M Natronlauge (NaOH)	2 Tropfen

Die PFA-Tablette (1 g) wurde unter Wärme in 1x PBS gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde mit Natronlauge ein pH-Wert von 7,2 eingestellt. Anschließend wurden mit destilliertem Wasser auf 25ml aufgefüllt.

Färbepuffer, verdünnt in DPBS, steril filtriert

Substanz	Konzentration
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	2,5% (w/v)

Permeabilisationspuffer, verdünnt in DPBS

Substanz	Konzentration
Triton-X-100	0,25% (v/v)

Blockierungspuffer, verdünnt in DPBS

Substanz	Konzentration
Ziege Normal Serum – <i>Normal Goat Serum</i> (NGS)	5% (v/v)

Zehnfach MGB-Puffer, verdünnt in ddH₂O (10ml)

Substanz	Volumen
Tris pH 8,8, 1M	6,7 ml
MgCl_2 , 1M	0,650 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1M	1,66 ml

Lysepuffer, verdünnt in ddH₂O

Substanz	Konzentration
10% Triton	5% (v/v)
10x MGB Puffer	10% (v/v)
Proteinkinase K (600 U/ml)	0,25% (v/v)

50x Tris-Acetat-EDTA-Elektrophoresepuffer (TAE-Puffer), 1L

Substanz	Volumen/Gewicht
Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	100 ml

Mit destilliertem Wasser auf 1 L auffüllen.

3.1.4. Zellkultur-Medien

Medium	Supplement
ATCC- Epithelzellmedium (Renal Epithelial Cell Basal Medium (PCS-400-030)	FCS (2/4%) Penicillin-Streptomycin (1%) Renal Epithelial Cell Growth Kit (PCS-400-040)
iREC-Medium (DMEM-Medium, high Glucose)	FCS (5%) Glutamax (1%) Penicillin-Streptomycin (1%)

3.1.5 Geräte und Hilfsmittel

Gerät/ Hilfsmittel	Firma
Cedex XS Cell Analyzer	Roche; Mannheim, DE
CYTOOchips™ DC-S-A	CYTOO SA.; Grenoble, FR
CYTOOchips™, Custom-Design: DC-700/1600 µm ² -A,	CYTOO SA.; Grenoble, FR
Eismaschine	Ziegra; Isernhagen, DE
Fluoreszenz-Filtersätze: (1) Alexa Fluor 488 - filter set 38 HE, (2) Atto550 - Filterset 43 HE, (3) Alexa Fluor 647/660 - Filterset 50 (4) DAPI – Filterset 49	Zeiss; Göttingen, DE
Fluoreszenz-Mikroskop AxioObserver Z1 Kamera: AxioCam MRm Rev.3, Lichtquelle: HXP-120 OSRAM HXP-R120W/45C VIS	Zeiss; Göttingen, DE

Objektive: EC Plan-Neofluar 10x (NA 0.3), Ph1 LD Plan-Neofluar 20x (NA 0.4), Ph2 63x Plan-Apochromat (NA 1.4), Ölobjektiv	
Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System	Bio-Rad; München, DE
Heizrührer Heat-Stir CB 162	Stuart; Staffordshire, UK
HeraCell 240i CO ₂ Incubator	Thermo Fischer Scientific; Braunschweig, DE
Heraeus Multifuge X3 Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific; Braunschweig, DE
HLC BlockThermostat TH 26 Heizblock	HLC; Bovenden, DE
Horizontale Gelelektrophorese Kammer: Sub-Cell® GT Cell	Bio-Rad; München, DE
Infinite M200 Pro	Tecan; Männedorf, CH
Labcycler	SensoQuest; Göttingen, DE
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fischer Scientific; Braunschweig, DE
Neubauer Zählkammer improved	Brand; Wertheim, DE
pH-Meter Lab 865	SI Analytics; Weilheim, DE
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt, DE
Präzisionswaage Extend ED22025-CW	Sartorius; Göttingen, DE
Sicherheitswerkbank SAFE 2020	Thermo Fischer Scientific; Braunschweig DE
Smart slide (Zählkammer für Cedex XS Cell Analyzer)	Ibidi; Martinsried, DE
Vacuu Hand Control	Vacuu-brand; Wertheim, DE
Vortex-Genie 2 Reagenzschüttler	Scientific Industries; Bohemia, USA
Wasserbad GFL 1083	GFL; Burgwedel, DE
xCELLigence RTCA DP	ACEA Biosciences Inc., Roche; Mannheim, DE
Zellkultur-Mikroskop: Axiovert 40 CFL	Zeiss; Göttingen, DE
Zentrifuge 5424R	Eppendorf; Hamburg, DE

3.1.6. Sonstige Materialien

Material	Firma
96 Well Cell Culture Plate, steril verpackt	Greiner Bio-One; Frickenhausen, DE
Cryo.s™ Kryokonservierungs-Röhrchen, 2 mL	Greiner Bio-One; Frickenhausen, DE
E-Plate View 16	ACEA Biosciences Inc., Roche; Mannheim, DE
Handschuhe, Vasco Nitril white	B.Braun; Melsungen, DE
Objektträger, Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Fischer Scientific; Darmstadt, DE
Reaktionsgefäße Polypropylen 15ml (optisch klar), 50ml (optisch klar), 50ml (braun)	Eppendorf; Hamburg, DE
Reaktionsgefäße Safe Lock Tubes 0,5/1,5/2 ml	Eppendorf; Hamburg, DE
Serologische Pipetten (5/10/25ml), steril verpackt	Sarstedt; Nümbrecht, DE
Zellkulturflächen T25/T75, Ventilationskappe, steril verpackt	Sarstedt; Nümbrecht, DE

3.1.7 Software

Software	Firma
Excel	Microsoft Cooperation; München, DE
Graph Pad Prism 6	GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA, USA
Adobe Illustrator CS6 (64bit)	Adobe; München, DE
ZEN Version 2.0	Zeiss; Göttingen, DE
AxioVision Version 4.8.2.	Zeiss; Göttingen, DE
Magellan 7.2.SP1	Tecan; Männedorf, CH
ImageJ Version 2.0.0-rc-59/1.51k mit FIJI Plugin-Paket	(Schindelin et al., 2012, Schindelin et al., 2015)

3.2 Methoden

3.2.1 Induzierte renale Epithelzellen (iRECs)

iREC-Klone mit und ohne *Pkd1*-Knockout [KO/Ctrl.] sind durch direkte Reprogrammierung und kombinierte Expression der nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren *Emx2*, *Hnf1b*, *Hnf4a* und *Pax8* (Kaminski et al., 2016) aus transgenen Mäusen mit einem geflochten *Pkd1*-Allel (Piontek et al., 2004) entstanden. Die Zellen wurden klonal hochgezogen und dann per qPCR auf ihre Tubulusidentität überprüft, sodass es sich um reine iREC-Zellen handelt.

Die Klone wurden anschließend mit Cre bzw. Flippase transduziert und mit Puromycin selektioniert, sodass Klone mit *Pkd1*-Knockout (Cre-Behandlung/ KO) und zugehörige Wildtyp-Kontrollklone (Flippase-Behandlung, spezifische Kontrolle/ Ctrl.) entstehen.

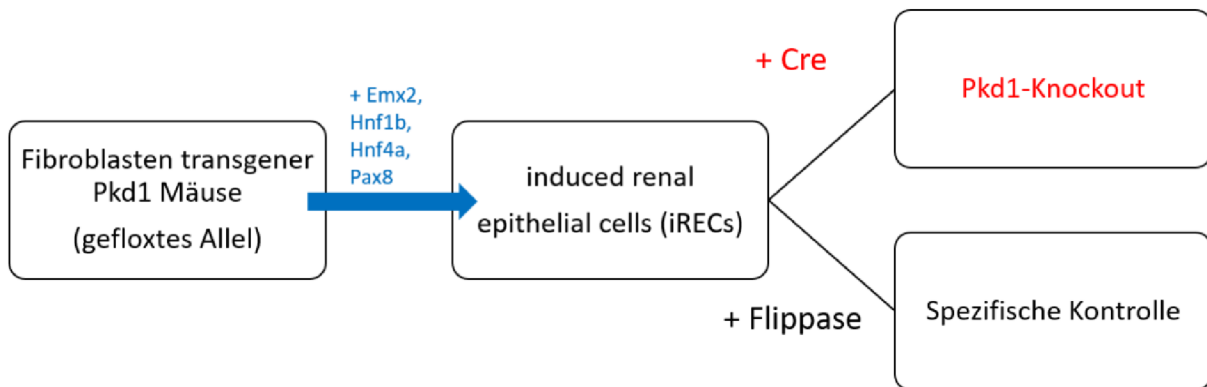


Abbildung 3: Entstehung von iREC-Klonen. iREC-Klone mit und ohne *Pkd1*-Knockout [KO/Ctrl.] sind durch direkte Reprogrammierung aus transgenen Mäusen mit einem geflochten *Pkd1*-Allel durch anschließende Transduktion einer Cre bzw. Flippase entstanden.

Cre und Flippase sowie die vier Transkriptionsfaktoren zur Reprogrammierung (iREC-Gewinnung) wurden über den lentiviralen Vektor WPXLd (Plasmid # 12258, Addgene, Watertown, USA) eingeschleust. Diese Arbeiten wurden von Dr. Roman Pichler aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Lienkamp an der Universitätsklinik Freiburg durchgeführt. Die entstandenen und überprüften Zellklone 4, 5, 7, 21 (jeweils KO/Ctrl.) und ein zusätzlicher iREC-Kontrollklon (Klon WT, nicht gefloxtes Allel), der in der Originalpublikation (Kaminski et al., 2016) verwendet wurde, wurden uns im Rahmen einer Kooperation zur Testung zur Verfügung gestellt.

Verwendete iREC-Klone entstammen Fibroblasten aus Mäusen folgender Mausstämme:

Klon	Mausstamm	Firma
Klon WT	Züchtung aus Gt(ROSA)26Sor ^{tm4} (ACTB-tdTomato,-EGFP) ^{Luo/J} und Ksp-Cre/C (B6.Cg-Tg(Cdh16-cre)91Igr/J, #012237) Mäusen (Kaminski et al., 2016)	The Jackson Laboratory; Bar Harbor, USA
Klone 4, 5, 7, 21 [jeweils KO/Ctrl.]	B6.129S4-Pkd1 ^{tm2Ggg/J} (Exone 2-4 gefloxt)	The Jackson Laboratory; Bar Harbor, USA

3.2.2. Zellkultur

Kultivierung

Die Kultivierung der induzierten renalen Epithelzellen (iRECs) erfolgte bei 37 °C und 5% CO₂ in Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe bis einschließlich Passage 40. Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien waren entweder steril verpackt oder wurden vor Verwendung unter der Sicherheitswerkbank mit Incidin (0,1%) gereinigt. Die verwendeten Medien wurden zuvor im Wasserbad bei 37 °C erwärmt.

Passagieren von Zellen

Vor dem Passagieren wurde die Zelldichte und der Zustand der Zellen am Lichtmikroskop kontrolliert. Unter der Sicherheitswerkbank wurde das Medium abgenommen und die konfluent wachsenden Zellen wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 4 ml Trypsin pro T75 oder 1,5 ml pro T25 Flasche wurden die Zellen erneut für 5 Minuten inkubiert, sodass sich die Zellen vom Flaschenboden ablösen. Die Abrundung und Ablösung der Zellen wurde am Mikroskop überprüft, gegebenenfalls wurden die Zellen durch leichte Klopfbewegungen vom Flaschenboden gelöst. Der Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe der doppelten Menge an iREC-Medium (5% FCS) abgestoppt und die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in iREC-Medium aufgenommen und in einer Verdünnung von 1:4 in eine neue Zellkulturflasche ausgesät. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen wieder bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Das Passagieren der Zellen erfolgte alle 3 Tage.

Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Um in den Versuchen definierte Zellzahlen zu verwenden wurde z.B. beim Passagieren die Zellzahl ermittelt. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer genutzt. Die Zählkammer wurde mit 10 µl der Zellsuspension gefüllt. Es wurden vier Großquadrate am Lichtmikroskop ausgezählt und der Mittelwert errechnet.

Die Zelldichte (Zellen/ml) errechnet sich mit folgender Formel:

Zelldichte (Zellen/ml) = (Zellzahl/ Anzahl der Großquadrate) x 10^4 x Verdünnungsfaktor

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen dauerhaft zu Lagern wurden Gefrierkulturen in Gefriermedium angelegt und in der Gasphase eines Zelltanks mit N_2 (fl)-Kühlung gelagert.

Gefriermedium: 10% DMSO in iREC-Medium (DMEM-Medium + 1% Glutamax, 1% Penicillin-Streptomycin, 5% FCS)

Einfrieren von Zellen:

Die konfluent wachsenden Zellen wurden wie beim Passagieren durch Trypsin vom Flaschenboden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahl wurde durch die Neubauerzählkammer ermittelt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten wurde das Zellpellet in der entsprechenden Menge Gefriermedium aufgenommen und in ein oder mehrere Kryoröhrchen überführt ($0,5-1 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen). Die Kryoröhrchen wurden im Mr. Frosty™ Gefrierbehälter kontrolliert auf -80 °C eingefroren (-1 °C/min) und am folgenden Tag in den Zelltank überführt.

Auftauen von Zellen:

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurden die Kryoröhrchen aus dem Zelltank im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und das Kryoröhrchen mit 1 ml vorgewärmten Medium noch einmal nachgespült. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm für 3 Minuten wurde das Zellpellet in frischem iREC-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Dieser Schritt diente zur Entfernung der zelltoxischen DMSO-Konzentration.

3.2.3 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit über die metabolische Aktivität

Aussaat verschiedener Zellzahlen für Verdünnungsreihe

Nach Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer wurden 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 und 12000 Zellen in 100 μ l iREC-Medium je Vertiefung jeweils in sechsfach Bestimmung in eine 96-Well Platte ausgesät. Zusätzlich wurden pro Zellzahl zwei Vertiefungen mit 100 μ l Medium gefüllt um den Blindwert zu ermitteln. Anschließend wurden die Platten bis zum nächsten Tag bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert.

Aussaat der Zellen für Zeitverlauf

Die Zellzahl wurde ermittelt und es wurden 4 ml Suspension mit 140000 Zellen in iREC-Medium erstellt. Es wurden jeweils sechs Vertiefungen einer Reihe mit 100 μ l der Zellsuspension gefüllt, sodass im Versuch mit einer Zellzahl von 3500 Zellen pro Vertiefung gestartet wurde. Zusätzlich wurden zwei Vertiefungen je Reihe mit 100 μ l Medium gefüllt um

den Blindwert zu ermitteln. Es wurde eine automatische Pipette verwendet und die Zellsuspension wurde mäanderförmig auf die Vertiefungen verteilt. Die Platten wurden für 3-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die erste Messung durchgeführt.

Farbentwicklung und Messung

Verdünnungsreihe:

In alle gefüllten Vertiefungen wurden je 25 µl des Farbreagens (Cell Titer 96 AQueous One Solution, Promega) hinzugefügt und die Platten wurden für 60 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Im Plattenlesegerät wurde die Absorption bei einer Messwellenlänge von 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm gemessen. Es wurden die Differenzdaten ermittelt und als Excel-Tabelle exportiert.

Zeitverlauf:

Um über die Änderung der metabolischen Aktivität im Zeitverlauf die Zellzyklusdauer zu ermitteln wurden Messungen zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Am Tag eins wurde einmal 3-4 Stunden nach Aussaat der Zellen gemessen. Am Tag zwei und Tag drei erfolgten jeweils zwei Messungen im Abstand von sechs Stunden und am Tag vier fand eine letzte Messung statt. Je Messzeitpunkt wurden in die acht gefüllten Vertiefungen (Sechsfachbestimmung und zweimal Blindwert) einer Reihe 25 µl des Farbreagens (Cell Titer 96 AQueous One Solution, Promega) hinzugefügt. Die Platten wurden ebenfalls für 60 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Plattenlesegerät wie oben beschreiben gemessen. Störende Luftblasen wurden vor der Messung mit einer Kanüle zerstoßen. Die photometrischen Messungen im Plattenlesegerät erfolgten ohne Deckel.

Auswertung

Die Auswertung der photometrischen Messungen erfolgte an Hand der Zunahme der metabolischen Aktivität, die über die enzymatische Farbentwicklung zu sechs definierten Zeitpunkten zwischen 0 und 70 Stunden gemessen wurde.

Die metabolische Aktivität steht im direkt proportionalen Zusammenhang zur Zellzahl, sodass sich aus der Änderung der metabolischen Aktivität Zellpopulationsverdopplungszeiten zur Abschätzung von Zellzyklusdauern ermitteln lassen. Die metabolische Aktivität [AU] zu einem definierten Zeitpunkt wird jeweils durch den Mittelwert der sechs Messwerte einer Messung nach Subtraktion des Mittelwertes aller Leerwerte beschrieben. Aus der logarithmierten Darstellung der metabolischen Aktivität gegen die Zeit kann mit Hilfe der Steigung der Ausgleichsgeraden die Populationsverdopplungszeit ermittelt werden. Die genaue Berechnung dieser ist unter 4.2.1 dargestellt.

3.2.4 Bestimmung der Populationsverdopplungszeit über die Impedanz der bedeckten Fläche

Zur Messung der Impedanz und der Änderung dieser über die Zeit wurde das XCELLigence RTCA DP genutzt. Es wurde folgende Schritte programmiert:

Schritt 1	Background Messung
Schritt 2	Proliferation Zeit (gesamt): 96 h Intervall: 5 min (Sweeps: 1152)

Für die Backgroundmessung wurden in jede Vertiefung des E-Plate Riegels 100 µl Medium gegeben. Der Riegel wurde ins Gerät gestellt und Schritt 1 gestartet.

Im Anschluss wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst, zentrifugiert und im Cedex XS Cell Analyzer gezählt. Je Vertiefung wurden 12000 Zellen in 100 µl Medium zu den 100 µl aus der Background-Messung hinzugefügt. Für jede Zellsorte wurde eine vierfache Bestimmung durchgeführt, sodass eine Konzentration von 48000 Zellen in 400 µl Medium eingestellt wurde. Der Riegel wurde für 30 Minuten unter der Sicherheitswerkbank bei RT inkubiert und anschließend ins Gerät gestellt (Schritt 2).

Nach 96 Stunden Messdauer wurde der Versuch beendet und die Daten als Excel-Tabelle exportiert. Der Cell Index (CI) zu einem bestimmten Zeitpunkt im Graphen wird jeweils durch den Mittelwert des vierfach bestimmten CI beschrieben.

Die Auswertung der Impedanzmessungen ist unter 4.2.2 dargestellt.

3.2.5 Einzelzelladhäsion auf mikrostrukturierten Adhäsionschips

Mikrostrukturierte Adhäsionschips sind Deckgläser, auf denen nur an definierten Flächen eine Zelladhäsion möglich ist. Die übrige Fläche ist mit Poly-L-Lysin-Polyethylenglycol beschichtet was die Zelladhäsion verhindert (Théry, Piel, 2009). Die Adhäsionsflächen können anschließend mit verschiedenen Proteinen beschichtet werden.

In dem dargestellten Versuch wurden mikrostrukturierte Adhäsionschips mit 700 µm² und 1600 µm² großen kreisförmigen Adhäsionsflächen verwendet (DC-S-A, CYTOO SA, Grenoble, Frankreich), die mit Kollagen beschichtet wurden.

Beschichtung

Die mikrostrukturierten Adhäsionschips wurden in einer Sechs-Well Platte mit 2 ml PBS bedeckt und anschließend mit 1 ml Kollagenlösung mit einer Konzentration von 60 µg/ml beschichtet, sodass die Endkonzentration auf dem Chip 20 µg/ml betrug. Die beschichteten Chips wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Chips viermal kontinuierlich mit jeweils 3 ml PBS gewaschen und erneut für 20 Minuten in PBS bei RT inkubiert.

Reinigung der CYTOO-Kammern

Die CYTOO-Kammern wurden durch eine Waschreihe bestehend aus einem Tropfen Waschlotion (Baktolin) in demineralisiertem Wasser, demineralisiertem Wasser und 70 prozentigem Ethanol gereinigt. Die Überführung unter die Sicherheitswerkbank fand in 70% Ethanol statt. Die Kammern wurden unter der Sicherheitswerkbank in einer sauberen Petrischale trocknen gelassen. Der Chip wurde in eine gereinigte 4-Well CYTOO-Kammer eingebaut, in einer Petrischale platziert und mit PBS bedeckt gehalten.

Aussaat der Zellen

Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und es wurden 15 000 Zellen pro Quadrant der 4-Well CYTOO-Kammer in 200 µl iREC-Medium ausgesät.

Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung

Nach 4 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit vier prozentigem Paraformaldehyd am Chip fixiert und nach anschließendem Waschen mit DPBS bei 4 °C gelagert bis eine Färbung erfolgte.

Die Zellen wurden mit 0,25% Triton X-100 Lösung in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem zweimaligen Waschritt mit 200 µl PBS erfolgte die Blockierung mit 5% Normal-Donkey-Serum Lösung in PBS. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zweifach mit PBS gewaschen

Färbung

Die Antikörperverdünnungen wurden in 2,5% BSA in PBS angesetzt. DAPI wurde in PBS angesetzt. Bei Fluoreszenzkopplung wurde im Dunkeln gearbeitet und die Antikörper wurden auf Eis aufgetaut. Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen verwendet. Es wurden 150 µl je Quadrant angesetzt.

Tabelle 1: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Vinculin, Maus, monoklonal (hVIN-1)	1:800	1 h
goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 555	1:1000	1 h
Phalloidin, Alexa Fluor 647	1:1000	1 h
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	1:800	15 min

Zwischen jedem Färbeschritt erfolgten zwei Waschriffe mit 150 µl DPBS pro Quadrant. Zuletzt wurde der Chip vorsichtig mit einem Tropfen Immumount auf einem Objektträger eingedeckt und anschließend bei 4 °C gelagert.

Mikroskopie

Es wurde das Fluoreszenz-Mikroskop AxioObserver Z1 und ein 63x Plan-Apochromat (NA 1.4), Öobjektiv verwendet. Pro Zelle wurden 10 Ebenen mit einem Abstand von 0,24 µm aufgenommen.

Auswertung

Durch Färbung des Strukturproteins Vinculin konnten Adhäsionsflächen visualisiert werden. Die Auswertung dieser erfolgte mittels ImageJ anhand von verschiedenen Makros (modifiziert nach Marg et al., 2010). Dazu wurden zunächst der richtige Kanal und die schärfste Z-Ebene des Fluoreszenzbildes ausgewählt (4 b).

Durch Anwendung der Befehle *Enhance contrast* → *FeatureJ Edges* → *Make binary* → *Fill holes* wurde die Zellgrenze erkannt sodass die Zellfläche (*area*) ermittelt (4 c) und der AR (*aspect ratio*) bestimmt werden konnten. Durch Reduktion des Hintergrundes *Substract background*) mittels Rolling Ball Algorithmus und Invertieren der Farben (*Make inverse*) wurden Kontaktflächen detektiert (4 d). Nach Segmentierung mittels Schwellenwertverfahren (*thresholding*) entsteht eine binäre Maske (*Convert to mask*) (4 e). Aus dieser konnten mittels der Funktion *Analyse particles* die Kontaktflächen quantifiziert und gemessen werden. Ball-Radius (*rolling ball*) und Schwellenwert (*threshold*) wurden für jede Färbung neu angepasst. Die Kontrolle der Bestimmung erfolgte durch Überlagerung des Fluoreszenzbildes mit der Segmentierung.

Es wurden insgesamt durchschnittlich 250 Zellen je Klon [WT, 4 Ctrl., 4 KO, 7 Ctrl., 7 KO, 21 Ctrl., 21 KO] und je Adhäsionsfläche aus drei unabhängigen Wiederholungen ausgewertet.

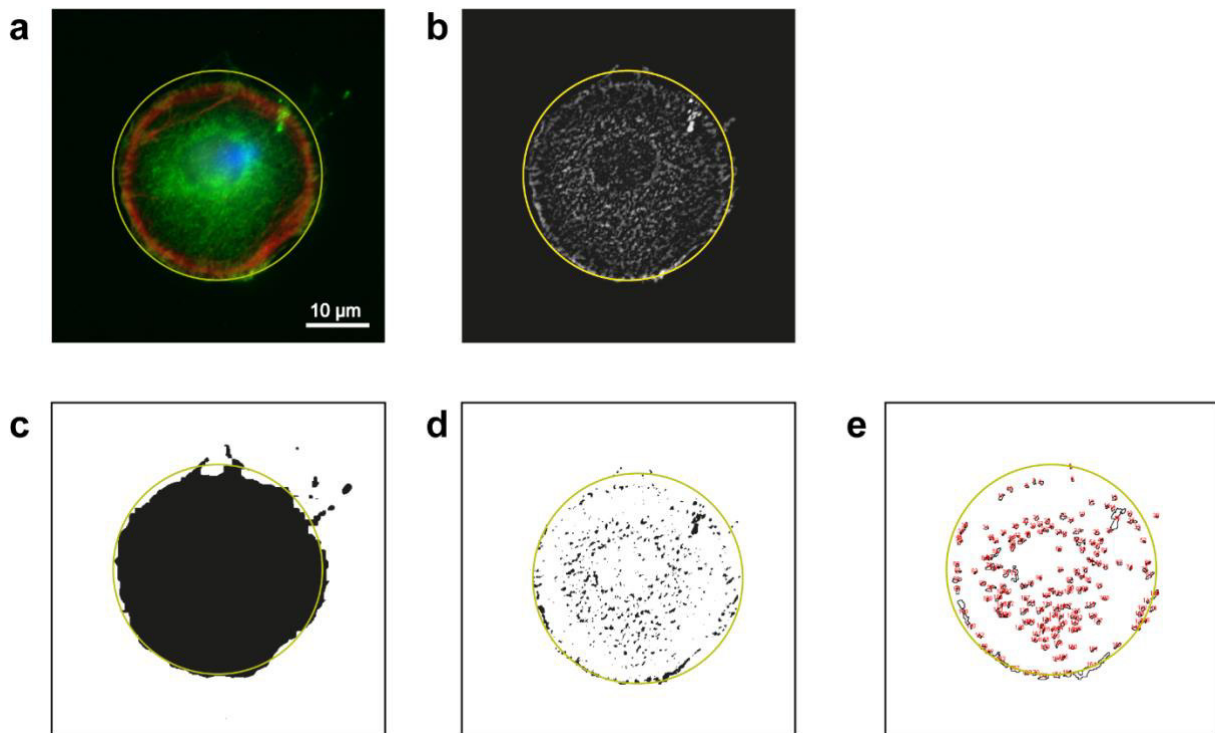


Abbildung 4: Schritte der Bildverarbeitung zur Ermittlung der Kontaktfläche. Die Zelladhäsion auf Kollagen beschichteten mikrostrukturieren CYTOO-Chips wurde durch Färbung des Adhäsionsproteins Vinculin visualisiert. (a) 3-Kanal Fluoreszenzbild: Kern (blau) F-Aktin (rot), Vinculin (grün). (b) Vinculin-Färbung. (c) Gesamtzellfläche. (d) Hintergrundreduktion. (e) Segmentierung und Analyse der Kontaktflächen. Maßstab, 10 µm

3.2.6 Sphäroidbildung auf mikrostrukturieren Adhäsionschips

Für die Sphäroidbildung wurden ebenfalls wie unter 3.2.3 beschriebene mikrostrukturierte Adhäsionschips genutzt.

Beschichtung

Die Beschichtung der Adhäsionschips für die Sphäroidbildung erfolgte mit Kollagen (16 µg/ml) und Fibrinogen (4 µg/ml). Inkubation und Waschvorgang erfolgten analog zur Beschichtung der Chips für die Einzelzelladhäsion. Die Kammern wurden wie in der Einzelzelladhäsion beschrieben gereinigt.

Aussaat der Zellen

Es wurden 12 000 Zellen pro Quadrant in 200 µl ATCC-Epithelzellmedium (2% oder 4% FCS) ausgesät.

ATCC-Epithelzellmedium: Renal Epithelial Cell Basal Medium + Renal Epithelial Cell Growth Kit + FCS (2%/ 4%) + Pencillin-Streptomycin (1%), anschließend steril filtriert.

Nach einer vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO₂ wurden je Quadrant das gesamte Medium entfernt und durch 200 µl einer 2,5% Matrigel-Lösung in ATCC-

Epithelzellmedium ersetzt. Anschließend wurden die CYTOO-Chips für 5 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert bevor eine Fixierung erfolgte.

Fixierung, Permeabilisierung und Blockierung

Die Fixierung der Sphäroide auf dem Chip erfolgte durch den Crosslinker DSP. Es wurden 100 µl Medium pro Quadrant entfernt und durch 10 µl DSP in DMSO ersetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden pro Quadrant 100 µl 4% PFA in PBS hinzugefügt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroide zweimal mit DPBS gewaschen und erneut mit 200 µl 4% PFA in DPBS bedeckt. Darauffolgend wurde zweimalig mit PBS gewaschen und ggf. bei 4 °C gelagert.

Die Sphäroide wurden mit 0,25% Triton X-100 Lösung in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach einem zweimaligen Waschritt mit 200 µl PBS erfolgte die Blockierung mit 5% Normal-Donkey-Serum Lösung in PBS. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut zweifach mit PBS gewaschen.

Färbung

Die Antikörperverdünnungen (150 µl pro Quadrant) wurden in 2,5% BSA in PBS angesetzt. DAPI wurde in PBS angesetzt. Bei Fluoreszenzkopplung wurde im Dunkeln gearbeitet und die Antikörper wurden auf Eis aufgetaut.

Es wurden folgenden Konzentrationen und Inkubationszeiten verwendet:

Tabelle 2: Antikörperverdünnungen und Inkubationszeiten

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Anti-Acetyliertes-Tubulin, Maus, monoklonal (6-11B-1)	1:200	1 h
Anti-E-Cadherin, Kaninchen, monoklonal (24E10)	1:500	
donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488	1:1000	1 h
goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 555	1:1000	
Phalloidin, Alexa Fluor 647	1:1000	1 h
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	1:800	15 min

Primärantikörper (Anti-Acetyliertes-Tubulin-IgG, Anti-E-Cadherin-IgG) und Sekundärantikörper (donkey anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG) wurden jeweils zusammen gefärbt. Zwischen allen Inkubationszeiten erfolgten zwei Waschschrte mit DPBS. Anschließend wurde der Chip vorsichtig mit einem Tropfen Immumount auf einem Objektträger eingedeckt und bei 4 °C gelagert bis dieser mit Öl mikroskopiert wurde.

Auswertung

Pro entstandene Struktur wurden 30-35 Ebenen in einem Abstand von 0,5 µm aufgenommen. Dazu wurde ebenfalls das das Fluoreszenz-Mikroskop AxioObserver Z1 und ein 63x Plan-Apochromat (NA 1.4), Ölobjektiv verwendet.

Die Einteilung der dreidimensionalen Strukturen erfolgte zunächst anhand der Fähigkeit zur Ausbildung eines Lumens im Vergleich zum Zellaggregat. Des Weiteren wurde das das Lumen begrenzende Epithel charakterisiert. Eine Anreicherung von F-Aktin im apikalen Bereich sowie E-Cadherin in der basolateralen Membran der Zelle geben außerdem einen Hinweis für eine korrekte Polarität des Epithels im Sphäroid.

3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion

Die Methode der Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifizierung spezifischer Gen-Sequenzen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs durch das Enzym DNA-Polymerase.

DNA-Isolation

Eine Zellsuspension mit 0,5 Millionen Zellen wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zentrifugation wurde das Medium entfernt und das Zellepellet eingefroren. Die Lyse die Zellpellets erfolgte in 150 µl Lysepuffer bestehend aus dd H₂O, 10 fachem MGB Puffer, 10% Triton und Proteinkinase K (600 U/ml).

Einfacher Ansatz des Lysepuffers: 165 µl dd H₂O, 20 µl 10x MGB Puffer, 5 µl 10% Triton, 5 µl Proteinkinase K (6000 U/ml)

Bei 56 °C und 700 rpm erfolgte über Nacht der Verdau. Am nächsten Tag wurde die Proteinkinase K bei 95 °C für 30 Minuten deaktiviert. Anschließend wurde die Probe im Reagenzglas-Schüttler gemischt. Nach Zentrifugation bei 1300 rpm für eine Minute wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4° C gelagert.

Mastermix

Tabelle 3: Zusammensetzung des Master-Mix (Volumen für 1 Probe)

Komponente	Volumen
RNAse freies H ₂ O	5,75 µl
10 x PCR-Puffer	1 µl
dNTPs	0,2 µl
Primer F4+R4	0,5 µl
Taq Polymerase	0,05 µl

Pro Probe wurde ein PCR Mastermix von 8 µl vorgelegt. Anschließend wurden 2 µl der Probe zu diesem Mastermix gegeben und bei folgendem Programm in den PCR-Cycler gegeben.

1. Initiale Denaturierung:	95 °C	3 Minuten	
2. Denaturierung:	94 °C	30 Sekunden	} 33 Zyklen
3. Annealing:	57 °C	45 Sekunden	
4. Elongation:	72 °C	60 Sekunden	
5. Abschließende Elongation:	72 °C	10 Minuten	

Primer

Die Primer-Sequenzen wurden dem Protokoll in Piontek et al. „A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo” entnommen.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
Pkd1-F4	cct gcc ttg ctc tac ttt cc
Pkd1-R4	tcg tgt tcc ctt acc aac cct cc

Annealingtemperatur und Zykluszahl

Pkd1-F4 + R4	57 °C	33 Zyklen
--------------	-------	-----------

Agarosegel

Zur Auswertung wurden die PCR Produkte auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen. 2 Gramm Agarose wurden in 100 ml TAE Puffer gelöst und aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 10 µl GelRed wurde das Gel in die Gelkammer gegossen. Ein Kamm bildet Taschen zur späteren Beladung mit Proben.

Nach 30 Minuten wurde das polymerisierte Gel in eine mit 1x TAE Puffer befüllte Elektrophoresekammer eingebaut, sodass das Gel vollständig mit diesem Puffer bedeckt war. Den DNA-Proben wurde je 2,5 µl DNA-Ladepuffer zugefügt. Anschließend wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Neben den Proben wurde ein Größenstandard (100 pb) aufgetragen. Es wurde für 50 Minuten eine Spannung von 120 Volt angelegt.

3.2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Prüfung und die grafische Darstellung der Untersuchungen wurde mit GraphPad Prism 6 durchgeführt. Die Daten wurden, wo immer dies vom Umfang her angebracht war, zunächst auf Normalverteilung geprüft. Dieser Test wurde jedoch von keiner Versuchsreihe bestanden. Auch für die verbliebenen Messungen konnte nicht sicher von einer Normalverteilung ausgegangen werden, so dass alle quantitativen Untersuchungen einer nicht-parametrischen Analyse, dem Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Dunn's Multiple Comparison, unterzogen wurden. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ gelegt. Für Vergleiche zwischen Knockout und jeweiligem Kontrollklon wurden Sterne (*), für Vergleiche innerhalb der Klone, auf unterschiedlich großen Adhäsionsflächen ($700\mu\text{m}^2$ vs. $1600\mu\text{m}^2$), Rautezeichen (#) verwendet. Entsprechend zeigen * / ** / *** und # / ## / ### Werte von $p < 0,05$, $p < 0,01$ beziehungsweise $p < 0,01$ an.

4 Ergebnisse

Als Modell für Defekte der Nierenepithelzellen bei ADPKD wurden murine induzierte renale Epithelzellen (iRECs) mit selektivem Verlust des *Pkd1*-Gens getestet.

iRECs wurden mittels direkter Reprogrammierung durch Expression von vier nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren aus murinen Fibroblasten erhalten (Kaminski et al., 2016). In dieser Arbeit wurden vier verschiedene iREC-Klone (Klon 4,5,7,21) jeweils mit und ohne *Pkd1*-Knockout (spezifische Kontrollen) verwendet. Diese sind durch Behandlung mit Cre- oder Flippase-Viren aus iRECs von transgenen Mäusen mit einem geflochten *Pkd1*-Allel erzeugt worden. Zudem wurde der in der Originalpublikation von Kaminski et al. (2016) verwendete Zellklon als zusätzlicher Kontrollklon (Klon WT) herangezogen. Dieser Klon unterscheidet sich von den anderen Klonen dadurch, dass er einer Fibroblastenpräparation aus einer anderen Mauslinie entstammt. Alle verwendeten Klone wurden von Dr. Roman Pichler in Freiburg (Universitätsklinik Freiburg) erstellt und uns zur Testung zur Verfügung gestellt.

Die vergleichende Analyse der Ausbildung funktionaler Epithelstrukturen durch murine iRECs, sowie deren Störung durch einen selektiven Verlust des *Pkd1*-Gens soll uns eine Einschätzung erlauben, inwiefern iRECs ein geeignetes Zellmodell zur *in vitro* Untersuchung zellautonomer Epitheldefekte der Niere darstellen.

4.1 Nachweis der *Pkd1*-Allele

Die *Pkd1*-Genetik der verwendeten iREC-Klone wurde in der PCR durch Verwendung spezifischer Primer für das *Pkd1*-Gen kontrolliert. Die PCR erlaubt eine Unterscheidung zwischen gefloxtem, rekombiniertem und Wildtyp-Allel (ohne loxP-Stellen). Der *Pkd1*-Knockout konnte anhand der 200 bp Bande für das rekombinierte Allel in allen Knockout-Klonen [4 KO, 5 KO, 7 KO, 21 KO] bestätigt werden. Die jeweiligen Kontroll-Klone [4 Ctrl., 5 Ctrl., 7 Ctrl., 21 Ctrl.] zeigten eine Bande von ca. 1400 bp, die das geflochte Allel nachweist. Der WT-Kontrollklon zeigte im Vergleich dazu die kleinere Bande des Wildtyp-Allels (Abb. 5).

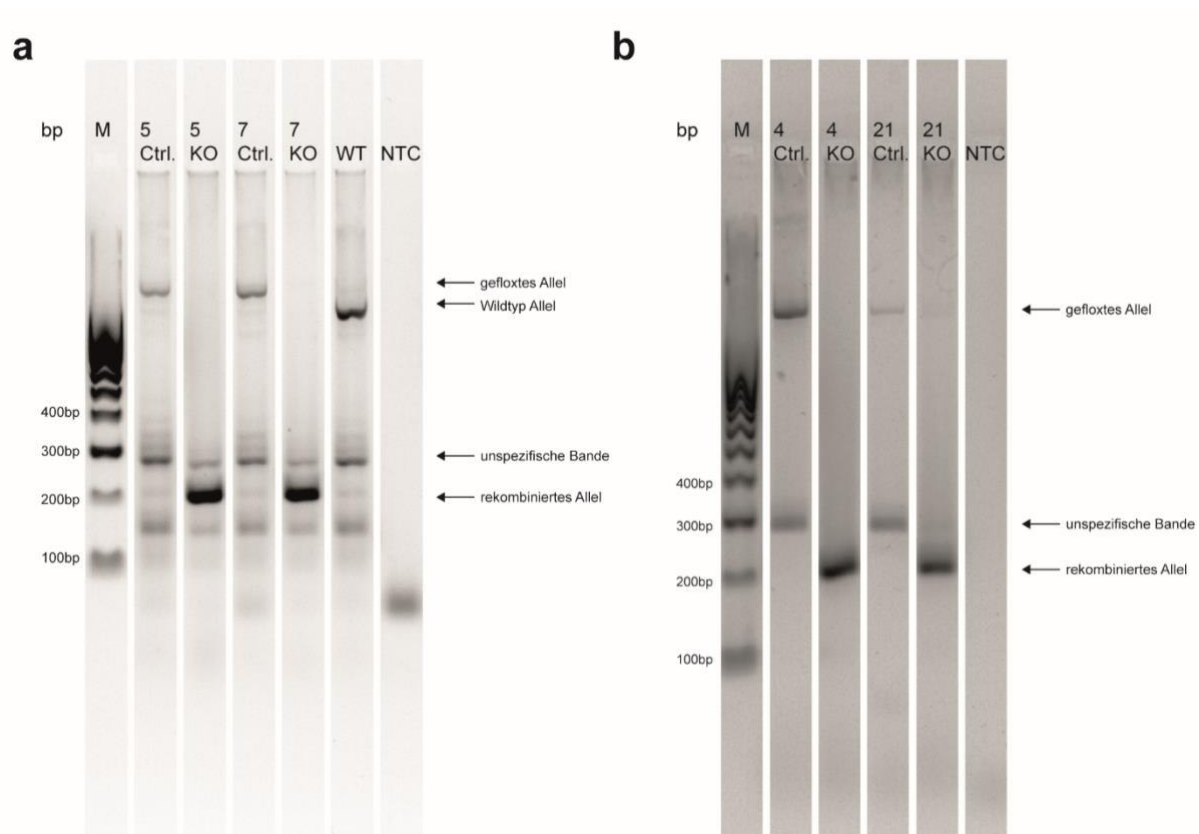


Abbildung 5: Kontrolle der *Pkd1*-Allele in iREC-Knockout-Klonen und Kontrollen. Mittels spezifischer *Pkd1*-Primer konnten in der PCR das gefloxtes Allel, das rekombinierte Allel und das Wildtyp-Allel unterschieden werden. In allen Knockout-Klonen [4 KO, 5 KO, 7 KO 21 KO] wurde eine 200 bp Bande nachgewiesen, die nach Cre-Rekombination zu erwarten war.

4.2 Proliferationsraten von *Pkd1*-Knockoutklonen und korrespondierenden Kontrollen

Die ADPKD gehört zu den proliferativen Erkrankungen, die mit einer exponentiellen Zunahme des Nierenvolumens durch die Bildung und Expansion von Zysten einhergeht (Grantham, Jared et al., 2006). In kultivierten Niereneithelien aus ADPKD-Patienten konnte eine gesteigerte proliferative Aktivität nachgewiesen werden (Wilson, P. D. et al., 1986, Wilson, P. D., Hreniuk & Gabow, 1992, Nadasdy et al., 1995), sodass wir im Vergleich zwischen Knockout und Kontroll-Klonen eine erhöhte Proliferation der Knockoutklone durch Verlust des *Pkd1*-Gens erwarteten.

4.2.1 Bestimmung von Populationsverdopplungszeiten anhand der metabolischen Aktivität

Die Zellzyklusdauer der iREC-Klone wurden anhand der Populationsverdopplungszeiten in wachsender Kultur über eine Bestimmung der metabolischen Aktivität der Kulturen abgeschätzt. Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte photometrisch anhand der Zunahme der metabolischen Aktivität, die über eine enzymatische Farbentwicklung zu sechs definierten Zeitpunkten zwischen 0 und 70 Stunden gemessen wurde (MTS-basierter Assay).

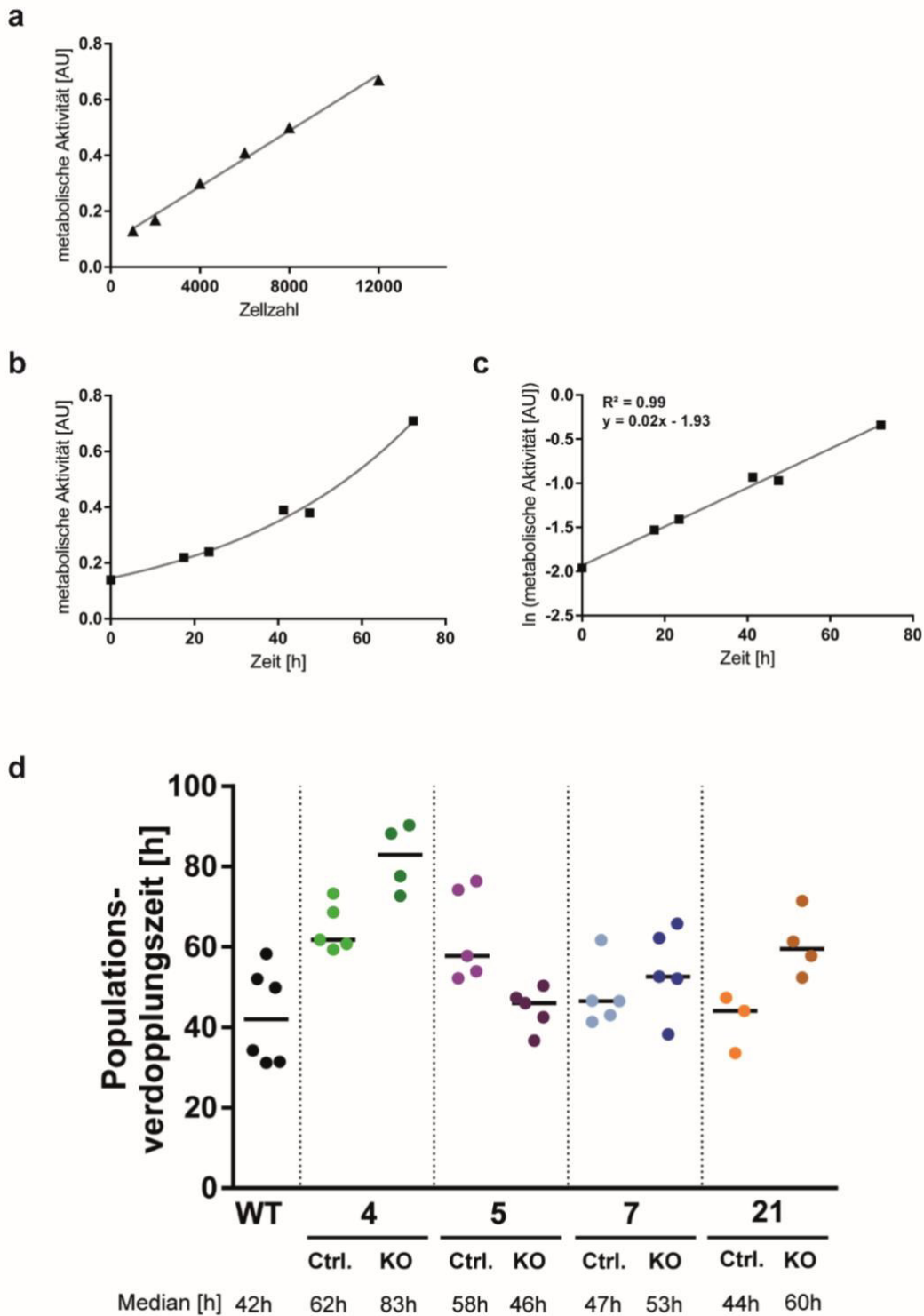


Abbildung 6: Proliferation *Pkd1*-defizienter iREC-Klone und der korrespondierenden Kontrollen anhand der metabolischen Aktivität. Populationsverdopplungszeiten wurden im MTS-basiertem Assay anhand der Zunahme der metabolischen Aktivität über sechs definierte Zeitpunkte gemessen. (a), (b), (c) zeigen exemplarisch eine Verdünnungsreihe und einen Messverlauf von Klon WT: (a) Ermittlung des linearen Bereichs zwischen Zellzahl und gemessener Aktivität, (b) exponentieller Anstieg der metabolischen Aktivität im Zeitverlauf und (c) logarithmische Darstellung des Zeitverlaufs mit Ausgleichsgerade ($y = 0,02x + 1,93$). (d) Populationsverdopplungszeit unabhängiger Messungen der iREC-Klone [WT, 4 Ctrl./ KO, 5 Ctrl./ KO, 7 Ctrl./ KO, 21 Ctrl./ KO] und Medianwerte der Messungen je Klon.

Zuvor wurde in Verdünnungsreihen der Bereich ermittelt, indem eine lineare Beziehung zwischen metabolischer Aktivität und der Zellzahl besteht. Das Verhältnis der metabolischen Aktivität zur Zellzahl war zwischen 1000 und 12000 Zellen pro Vertiefung linear (Abb.6 a), sodass wir in den Zeitverläufen eine Startzellzahl von 3500 Zellen pro Vertiefung verwendeten.

Die metabolische Aktivität stieg zwischen 0 und 70 Stunden exponentiell an (Abb.6 b). In der logarithmierten Darstellung kann eine lineare Ausgleichsgerade errechnet werden (MS Excel), mit der wir die Populationsverdopplungszeit ermittelten (Abb.6 c). Diese Zellzyklusdauer in Stunden wurde über den Quotienten aus $\ln(2)$ und der Steigung der Ausgleichsgeraden der logarithmierten Werte berechnet:

$$\frac{\ln(2)}{\text{Steigung der Ausgleichsgerade}} = \text{Populationsverdopplungszeit [h]}$$

Insgesamt lagen die ermittelten Populationsverdopplungszeiten im Bereich zwischen ca. 40 und 80 Stunden, wobei Ergebnisse aus unabhängigen Messungen des gleichen Klons teilweise deutlich variierten. Die Spannbreite der einzelnen Messungen eines Klons betrug bis zu 24 Stunden [Klon 5 Ctrl., Klon 7 KO].

Im direkten Vergleich unterschied sich die Proliferation der iREC-Knockout-Klone [4 KO, 5 KO, 7 KO, 21 KO] nicht signifikant von den korrespondierenden Kontroll-Klonen (Kruskal-Wallis Test) und war mit Ausnahme von Klon 5 sogar tendenziell reduziert (Abb. 6 d). Knockout-Klon 5 zeigte im Vergleich zum zugehörigen Kontrollklon eine tendenziell erhöhte Proliferation.

Die verwendeten iREC-Klone wurden kontinuierlich über mehrere Wochen kultiviert, typischerweise zweimal wöchentlich passagiert und in einer Verdünnung von 1:4 ausgesät. Da diese Splittingraten von 1:4 zweimal pro Woche kürzere Populationsverdopplungszeiten nahelegten (ca. 36 Stunden), verwendeten wir eine weitere Methode zur Ermittlung der Proliferationsraten, um Ergebnisse aus dem metabolischen Assay zu überprüfen.

4.2.2. Bestimmung von Populationsverdopplungszeiten anhand der bedeckten Fläche (Impedanz)

Zur Kontrolle der photometrisch ermittelten Zellzyklusdauern wurden Impedanz-Messungen durchgeführt. Die Impedanz (Wechselstromwiderstand) als Maß für die bedeckte Fläche innerhalb der Mikrotiterplatte steht im proportionalen Zusammenhang zur Zellzahl, sodass anhand der Zunahme der Impedanz Populationsverdopplungen zur Abschätzung der Zellzyklusdauern ermittelt werden konnten.

Am Boden der einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte befinden sich Goldelektroden. Zugabe von Elektronen-leitender Flüssigkeit (z.B. Medium) führt nach Anlegen eines elektrischen Potentials (22 mV) zur Bewegung von Elektronen vom negativen zum positiven Pol. Diese Elektronenbewegung ist abhängig von der Fläche der Elektroden, die mit dem

Medium in Kontakt steht. Adhärenz Zellen führen zu einer Einschränkung dieses Elektronenflusses und somit zu einer Zunahme der Impedanz (Abb. 7).

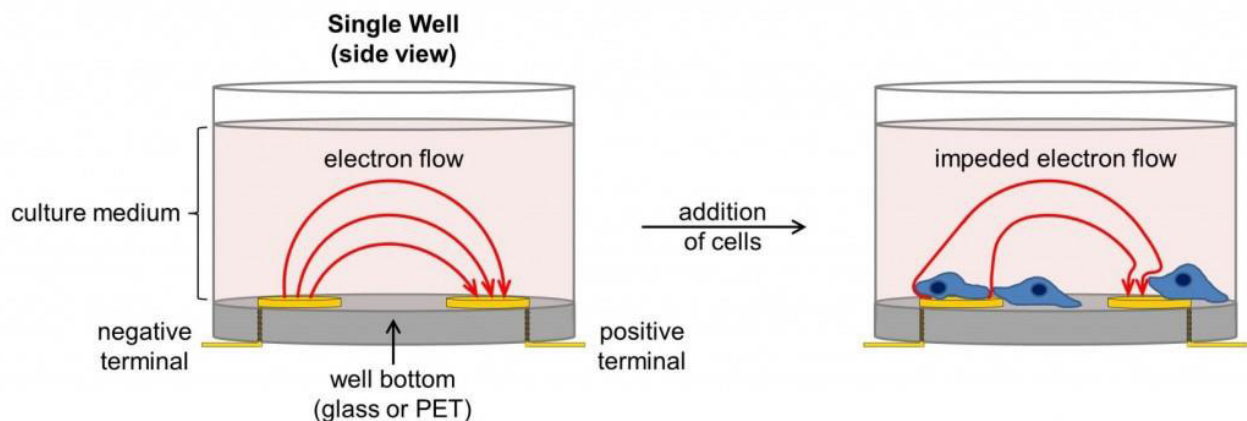


Abbildung 7: Impedanz Messungen innerhalb der Mikrotiter-Platte. Die Elektronenbewegung vom negativen zum positiven Pol innerhalb einer Vertiefung der Mikrotiterplatte wird durch adhärenz wachsende Zellen eingeschränkt, was zu einer Zunahme der Impedanz führt.³

Die gemessene Impedanz wird durch den Cell Index (CI) beschrieben. Dieser ist definiert als Differenz der Impedanz zu Zeitpunkt n ($t=n$) und der Impedanz in Abwesenheit der Zellen (Impedanz in Backgroundmessung).

$$CI = \text{Impedanz}_{t=n} - \text{Impedanz}_{\text{Background}}$$

Für die Impedanz-Messungen der iRECs testeten wir zunächst unterschiedliche Startzellzahlen pro Vertiefung aus. Diese Zellzahlaustestung ergab, dass eine Zellzahl zwischen 10000 Zellen und 14000 Zellen geeignet ist, um innerhalb von 96h eine Phase mit gleichmäßiger Proliferation zu erhalten, ohne auf Grund zunehmender Konfluenz der Zellen frühzeitig ein Plateau zu erreichen, wie es bei 20000 Zellen pro Vertiefung zu erkennen ist (Abb. 8 a). Auf Grund dieses Tests verwendeten wir nachfolgend eine Zellzahl von 12000 Zellen pro Vertiefung.

Die Austestung einer geeigneten Zellzahl zeigte außerdem, dass die ausgesäte Zellzahl pro Vertiefung einen Einfluss auf das proliferative Verhalten der Zellen hat. Beispielsweise konnte bei 3500 Zellen und 7000 Zellen pro Vertiefung nur eine minimale Zunahme des CI und damit der Proliferation beschrieben werden und bereits nach ca. 50 Stunden war ein Plateau zu erkennen, welches nicht durch Erreichen von Konfluenz erklärt werden kann. Hierfür könnte z.B. eine fehlende parakrine Stimulation durch benachbarte Zellen ursächlich sein.

³ © ACEA Biosciences, Inc. Reproduced with Permission, Courtesy of ACEA Biosciences, a part of Agilent Technologies, Inc.

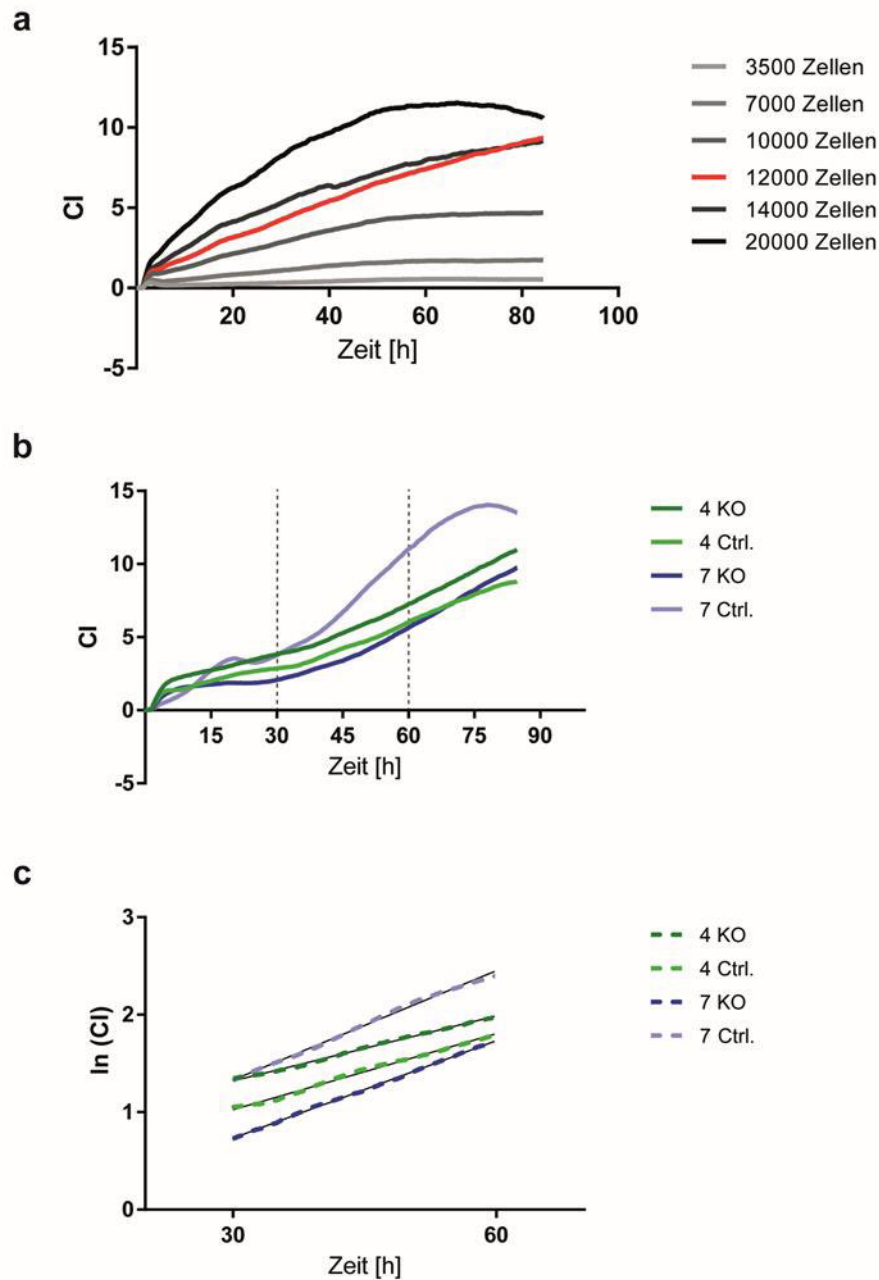


Abbildung 8: Proliferation von *Pkd1*-Knockout-Klonen und Kontrollen, Bestimmung der Populationsverdopplungszeiten anhand der bedeckten Fläche. Es wurde kontinuierlich die Impedanz der bedeckenden Fläche gemessen. Anhand der Zunahme der Impedanzwerte wurden Populationsverdopplungszeiten ermittelt [Klon 4 Ctrl./ KO, Klon 7 Ctrl./ KO]. Die Startzellzahl pro Vertiefung wurde exemplarisch für Klon WT optimiert (a). Gemessene Impedanz-Werte wurden über 90 h erfasst (b) und für den Bereich zwischen 30 und 60 h als natürlicher Logarithmus dargestellt. In die logarithmierte Darstellung wurden die Ausgleichsgeraden eingezeichnet (c). Impedanz-Werte wurden durch den Cell Index (Impedanz zu Zeitpunkt n minus Impedanz in Abwesenheit der Zellen) beschrieben.

Die Änderung des Cell Indexes (CI) für die Klone 4 [Ctrl./ KO] und 7 [Ctrl./ KO] wurde über 90 Stunden im xCELLigence RTCA (Real Time Cell Analyzer) erfasst. Die Verlaufskurve über 90 h lässt sich in Phasen gliedern: In den ersten Stunden nach Aussaat der Zellen ist ein initialer Anstieg des CI zu sehen, welcher sich durch Zelladhäsion erklären lässt. Zwischen 5 und 30 Stunden ist eine geringe Zunahme des CI zu erkennen, im Zeitraum zwischen 30 und 60 h kann eine exponentielle Zunahme des CI beschrieben werden (Abb.8 b), sodass für diesen Zeitraum Populationsverdopplungszeiten bestimmt wurden. Diese ermittelten wir analog zur Berechnung der Populationsverdopplungszeiten im metabolischen Assay anhand der Ausgleichsgerade der logarithmierten Werte (siehe 4.2.1). Die Populationsverdopplungszeit errechnet sich aus dem Quotienten von $\ln(2)$ und der Steigung der Ausgleichsgerade der logarithmierten Werte (Abb. 8 c) im Bereich zwischen 30 und 60 Stunden.

4.2.3 Vergleich der Populationsverdopplungszeiten der iREC-Klone 4 [Ctrl./ KO] und 7 [Ctrl./ KO] anhand metabolischem Assay und Impedanz der bedeckten Fläche

Werte aus den Impedanz-Messungen ergaben im Vergleich deutlich geringere absolute Populationsverdopplungszeiten als im metabolischem Assay ermittelt (Abb. 9), die aber tendenziell den anhand von Splittingraten (1:4, zweimal wöchentlich) vermuteten Verdopplungszeiten von ca.36 h entsprechen.

Im Vergleich zwischen Knockout- und korrespondierenden Kontrollklonen [4 Ctrl. vs. 4 KO / 7 Ctr. vs. 7 KO] konnten auch anhand der Impedanz-Messungen keine Unterschiede der Proliferation gezeigt werden.

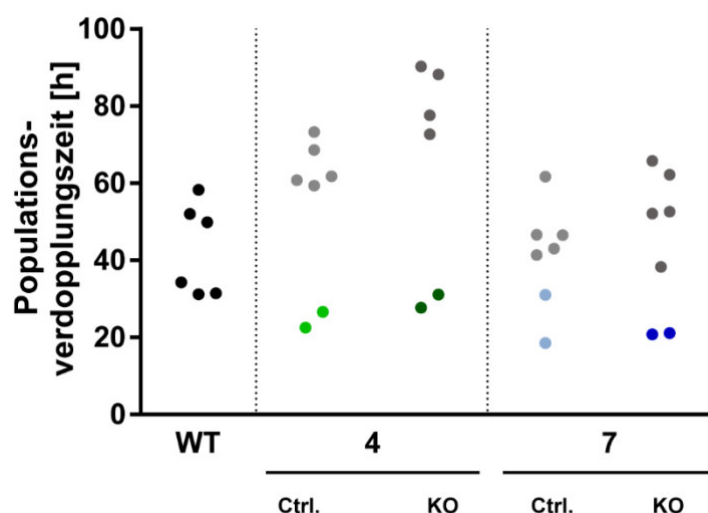


Abbildung 9: Vergleich der Populationsverdopplungszeit *Pkd1*-defizienter Klone und spezifischer Kontrollen anhand unterschiedlicher Messverfahren. Ermittelte Populationsverdopplungszeiten anhand der metabolischen Aktivität sind jeweils in schwarz [Klon WT] oder in grau [Klon 4,7] dargestellt. Populationsverdopplungszeiten aus jeweils zwei unabhängigen Impedanz-Messungen sind in grün [Klon 4] und in blau [Klon 7] dargestellt.

Beide Messverfahren zeigten trotz differenter absoluter Werte keinen Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf das Proliferationsverhalten (abgeschätzt anhand von Populationsverdopplungen) der Klone 4 und 7 und kommen somit im Vergleich zwischen Knockout- und Kontrollklonen insgesamt zum gleichen Ergebnis.

4.3 Untersuchung von Ein-Zell-Stadien von *Pkd1*-Knockout-Klonen und Kontrollen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips (700/1600 μm^2)

Neben einer gesteigerten Proliferation konnten in ADPKD-Epithelien auch Veränderungen der Zell-Matrix-Adhäsion nachgewiesen werden, wie vor allem von Wilson et al. in mehreren Publikationen gezeigt wurde (Wilson, P. D. et al., 1986, Wilson, P. D., Hreniuk & Gabow, 1992, Wilson, P. D. et al., 1999, Wilson, Patricia, 2004). Um einen möglichen Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die Zell-Matrix-Adhäsion in iRECs zu untersuchen, wurden Ein-Zell-Stadien von iRECs auf kreisförmigen Adhäsionsflächen unterschiedlicher Größe (700/1600 μm^2) auf mikrostrukturierten Adhäsionschips erfasst und die über Vinculin vermittelte Zell-Matrix-Adhäsion vergleichend analysiert.

Vinculin ist ein intrazelluläres Aktin-bindendes Protein, welches in Adhärenzverbindungen aber vor allem in Fokalkontakten angereichert ist. In Fokalkontakten ist Vinculin an der Verknüpfung von intrazellulären Proteinen des Zytoskeletts mit Integrinen beteiligt und wird daher häufig als Markerprotein für Zell-ECM-Interaktionen verwendet (Marg et al., 2010). Da ausschließlich Ein-Zell-Stadien analysiert wurden, kann in dieser Untersuchung die gegen Vinculin gefärbte Fläche als Maß für die Stärke der Interaktion zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett verwendet werden.

Zur Analyse der Zell-Matrix-Adhäsion wurden Adhäsionschips mit unterschiedlich großen Adhäsionsflächen verwendet (700 und 1600 μm^2). Eine Adhäsionsfläche von 700 μm^2 soll die Ausbreitung der Zelle begrenzen und somit gewebeähnliche Bedingungen repräsentieren, in denen das Mikroumfeld, d.h. extrazelluläre Matrix und benachbarte Zellen, Zellvolumen und Zellausbreitung limitieren (Théry, 2010).

iRECs wurden für 4 Stunden auf mikrostrukturierten Adhäsionschips inkubiert, anschließend fixiert und mittels spezifischer Immunfluoreszenz und farbstoffgekoppelten Chemikalien zur Detektion von Vinculin, Aktin (Zytoskelett) und dem Zellkern selektiv angefärbt. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen aufgenommen und in ImageJ unter Verwendung verschiedener Makros (Marg et al., 2010) hinsichtlich der Adhäsionsparameter ausgewertet. Mit Hilfe der Zellgrenze wurden Zellgrößen und Formparameter der Zellen bestimmt. Die Fläche der Zelladhäsion wurde an Hand der gegen Vinculin gefärbten Kontakte ermittelt. Anschließend analysierten wir den Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die gemessenen Parameter.

4.3.1 Ausbreitungsregulation und Zellgröße auf kreisförmigen Adhäsionsflächen (700/1600 μm^2)

iRECs nahmen auf kreisförmigen Adhäsionsflächen unterschiedliche Formen an. Sie können sich auf 700 μm^2 und 1600 μm^2 Adhäsionsflächen einerseits über die gesamte Adhäsionsfläche ausbreiten und diese komplett ausfüllen, andererseits wurden auch verschiedenste andere Zellformen in unterschiedlichen Größen auf kreisförmiger Adhäsionsfläche beobachtet (Abb. 10).

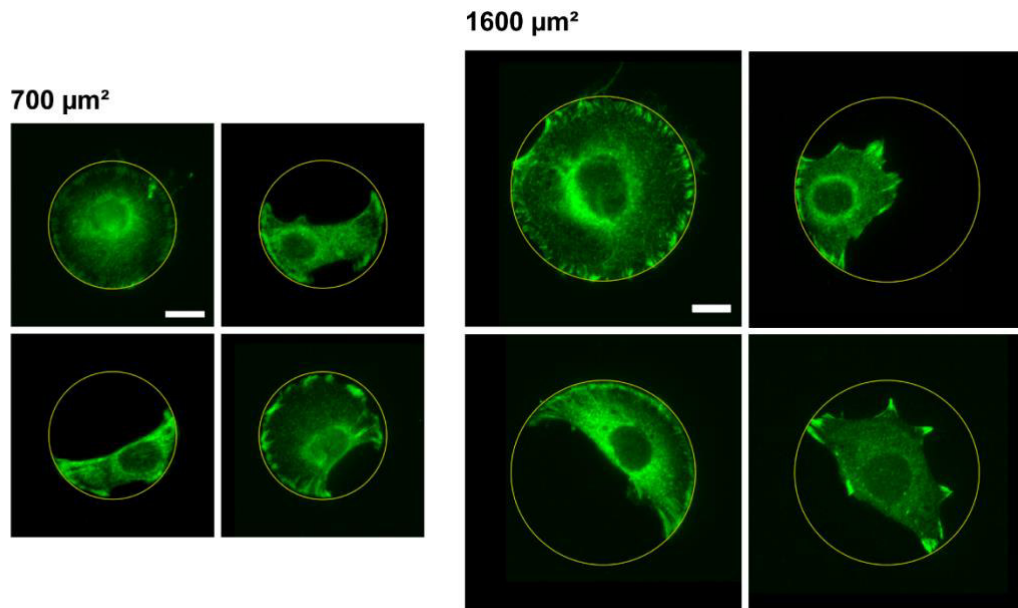


Abbildung 10: Beispiele von Einzelzellen auf 700 μm^2 und 1600 μm^2 [Klon WT]. Die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontrakten auf Kollagen wurde durch Anfärbung des Zytoskelett-Proteins Vinculin sichtbar gemacht. Maßstabsbalken, 10 μm .

Die Häufigkeitsverteilungen der Zellgröße (beispielhaft für Klon 7 in Abb. 11) verdeutlichen, dass Zellgrößen der iREC-Klone insgesamt stark variieren und es sich um eine heterogene Zellpopulation handelt.

Sowohl auf 700 μm^2 als auch auf 1600 μm^2 gab es viele Zellen, die deutlich kleiner als 500 μm^2 waren. Bei Klon 7 zeigten ca. 30% der Kontroll-Zellen und ca. 40% der Knockout-Zellen eine größere Zellausbreitung als die verfügbare Adhäsionsfläche von 700 μm^2 . Auf 1600 μm^2 trat dies nur vereinzelt auf (0,01% der Zellen [Klon 7 Ctrl.] bzw. 0,05% der Zellen [Klon 7 KO]).

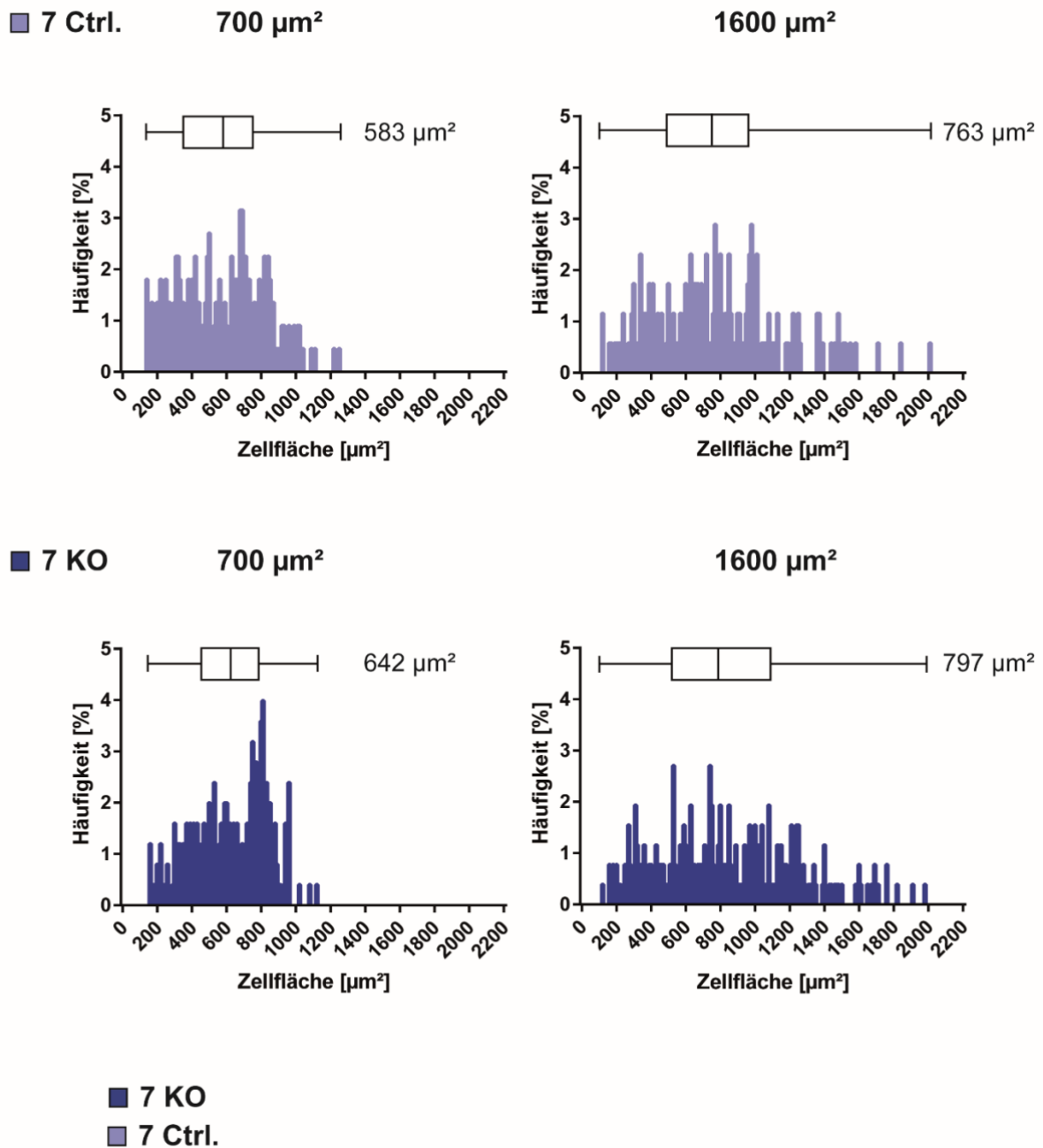


Abbildung 11. Prozentuale Häufigkeit der Zellgrößen auf 700/1600 μm² [Klon 7 Ctrl./ KO]. Die Häufigkeitsverteilung wurde exemplarisch für Klon 7 [Ctrl./ KO] auf 700 μm² (a) und 1600 μm² (b) Adhäsionsflächen dargestellt. Neben dem Boxplot ist jeweils der Median dargestellt. Die Bin-Breite beträgt 10 μm².

Bei Mikroskopie der Chips zeigte sich zudem, dass ein Anteil sehr kleiner Zellen existiert, die nur eine minimale Ausbreitung zeigen und damit nur wenig größer als der Zellkern waren. Diese wurden in den Auswertungen nicht erfasst (Abb. 12, rote Pfeile). Eine exemplarische Auszählung dieser sehr kleinen Zellen innerhalb eines definierten Bereiches auf drei Chips ergab im Durchschnitt einen Anteil von ca. 15%. Außerdem konnten sowohl auf 700 μm^2 als auch auf 1600 μm^2 teilweise mehrere kleine Zellen auf einer Adhäsionsfläche beobachtet werden (Abb. 12, weißer Pfeil)

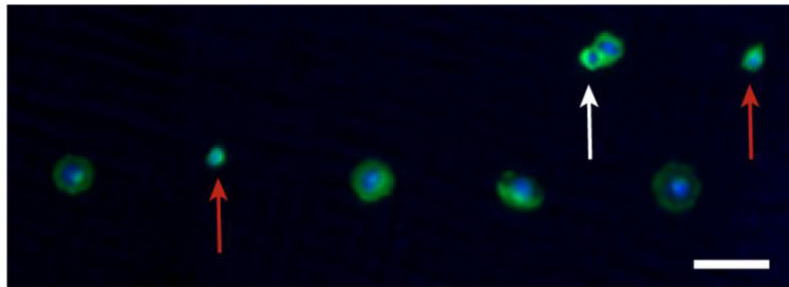


Abbildung 12. Einzelzellen auf mikrostrukturiertem Adhäsionschips [Klon 7 Ctrl. auf 700 μm^2]. Rote Pfeile kennzeichnen in den Auswertungen nicht erfasste, sehr kleine Zellen; der weiße Pfeil zeigt zwei Zellen die gemeinsam auf einer Adhäsionsfläche sitzen. Zellkerne (blau). Vinculin (grün). Maßstabsbalken, 50 μm .

Ausbreitungsregulation durch die verfügbare Adhäsionsfläche

Um zu überprüfen, inwiefern die verfügbare Adhäsionsfläche von 700 μm^2 die Zellausbreitung einschränkt, wurden Zellgrößen derselben Zellpopulation auf 700 μm^2 und 1600 μm^2 verglichen: Die Klone 4 [Ctrl.], 7 [KO/ Ctrl.] und 21 [KO/ Ctrl.] zeigten auf 1600 μm^2 Adhäsionsfläche jeweils signifikant größere Zellflächen als auf 700 μm^2 (Kruskal-Wallis Test). Klon WT und Knockout-Klon 4 zeigten ebenfalls tendenziell größere Zellflächen auf 1600 μm^2 Adhäsionsfläche, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test). Dies zeigte, dass eine verfügbare Adhäsionsfläche von 700 μm^2 die Zellausbreitung von iRECs begrenzt und spiegelt so das Verhalten der Zellen im Epithelzellverband wieder, indem die Zellausbreitung durch extrazelluläre Matrix und benachbarte Zellen begrenzt wird (They, 2010). Diese Ausbreitungsbegrenzung durch die definierte Adhäsionsfläche von 700 μm^2 trat in Knockout- und in Kontrollklonen gleichermaßen auf.

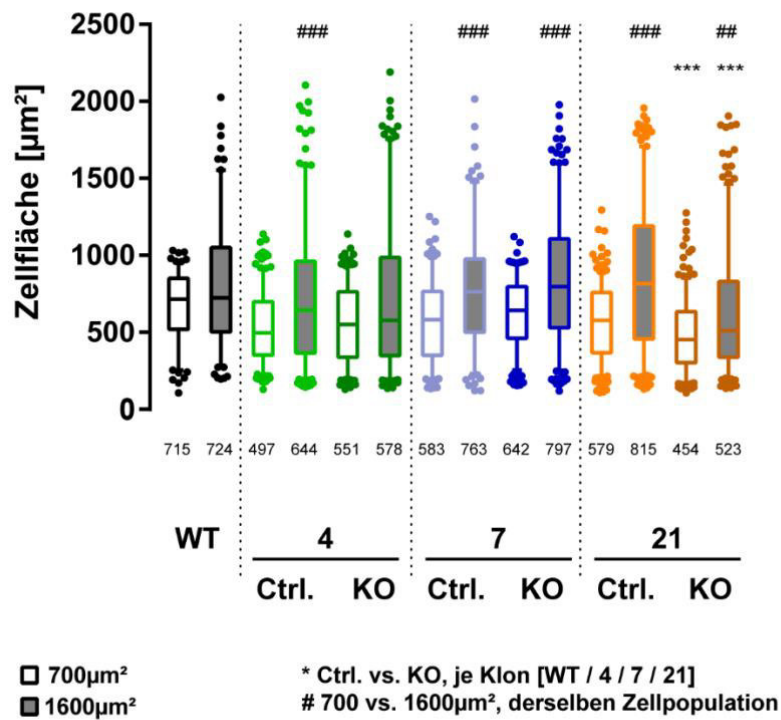


Abbildung 13: Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten von iREC-Zellklonen mit und ohne *Pkd1*-Expression. Größenverteilung der Zellflächen von *Pkd1*-Knockout und zugehörigen Kontrollen auf 700 μm² (weiße Füllung) und 1600 μm² (graue Füllung). Dargestellte Werte entsprechen dem Median des jeweiligen Klons. Es wurden durchschnittlich 250 Zellen je Klon und je Adhäsionsfläche aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

* / ** / ***, p < 0,05 / 0,01 / 0,001

/ ## / ###, p < 0,05 / 0,01 / 0,001

Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison

Zellgröße

Im direkten Vergleich zwischen Knockout- und korrespondierenden Kontroll-Klonen unterschied sich die Zellgröße mit Ausnahme von Klon 21 nicht signifikant. Knockout-Klon 21 zeigte sowohl auf 700 μm^2 als auch auf 1600 μm^2 signifikant kleinere Zellflächen als die zugehörigen Kontroll-Zellen auf jeweils gleicher Adhäsionsfläche (Kruskal-Wallis Test).

4.3.2 Zell-Matrix-Adhäsion von *Pkd1*-Knockout-Klonen und Kontrollen auf Kollagen-beschichteten Adhäsionsflächen

Um einen Einfluss des *Pkd1*-Knockoutes auf die Zell-Matrix-Interaktion in iRECs zu untersuchen wurde die Fläche der Zelladhäsion anhand der gegen Vinculin gefärbten Kontakte auf 700 μm^2 (Abb. 14 a) und 1600 μm^2 (Abb. 14 b) ausgewertet und absolute sowie relative Kontaktflächen bestimmt (Abb. 14 c).

Mit Ausnahme von Klon 21 wurden keine signifikanten Unterschiede der absoluten Kontaktflächen zwischen Knockout- und korrespondierendem Kontrollklonen ermittelt. Knockout-Klon 21 zeigte auf 700 μm^2 und auf 1600 μm^2 signifikant geringere absolute Adhäsionsflächen als die *Pkd1*-exprimierende Kontrolle (Kruskal-Wallis Test). Des Weiteren unterschied sich die Adhäsion der Klone insgesamt voneinander. Beispielsweise zeigte Klon 4 [KO/Ctrl.] tendenziell kleinere Kontaktflächen als Klon 7 [KO/Ctrl.].

Die relativen Adhäsionsflächen, berechnet aus dem Verhältnis von Kontaktfläche zu Zellfläche, unterschieden sich auf 700 μm^2 Adhäsionsfläche mit Medianwerten von 11-15% nicht signifikant zwischen Knockout und Kontroll-Klonen (Kruskal-Wallis Test). Auf 1600 μm^2 war die relative Adhäsionsfläche des Knockout-Klons 4 signifikant erhöht im Vergleich zum zugehörigen Kontrollklon (Kruskal-Wallis Test). Zudem zeigten Knockout-Klon 4 und Knockout-Klon 21 auf 1600 μm^2 Adhäsionsfläche signifikant größere relative Adhäsionsflächen als auf 700 μm^2 (Kruskal-Wallis Test).

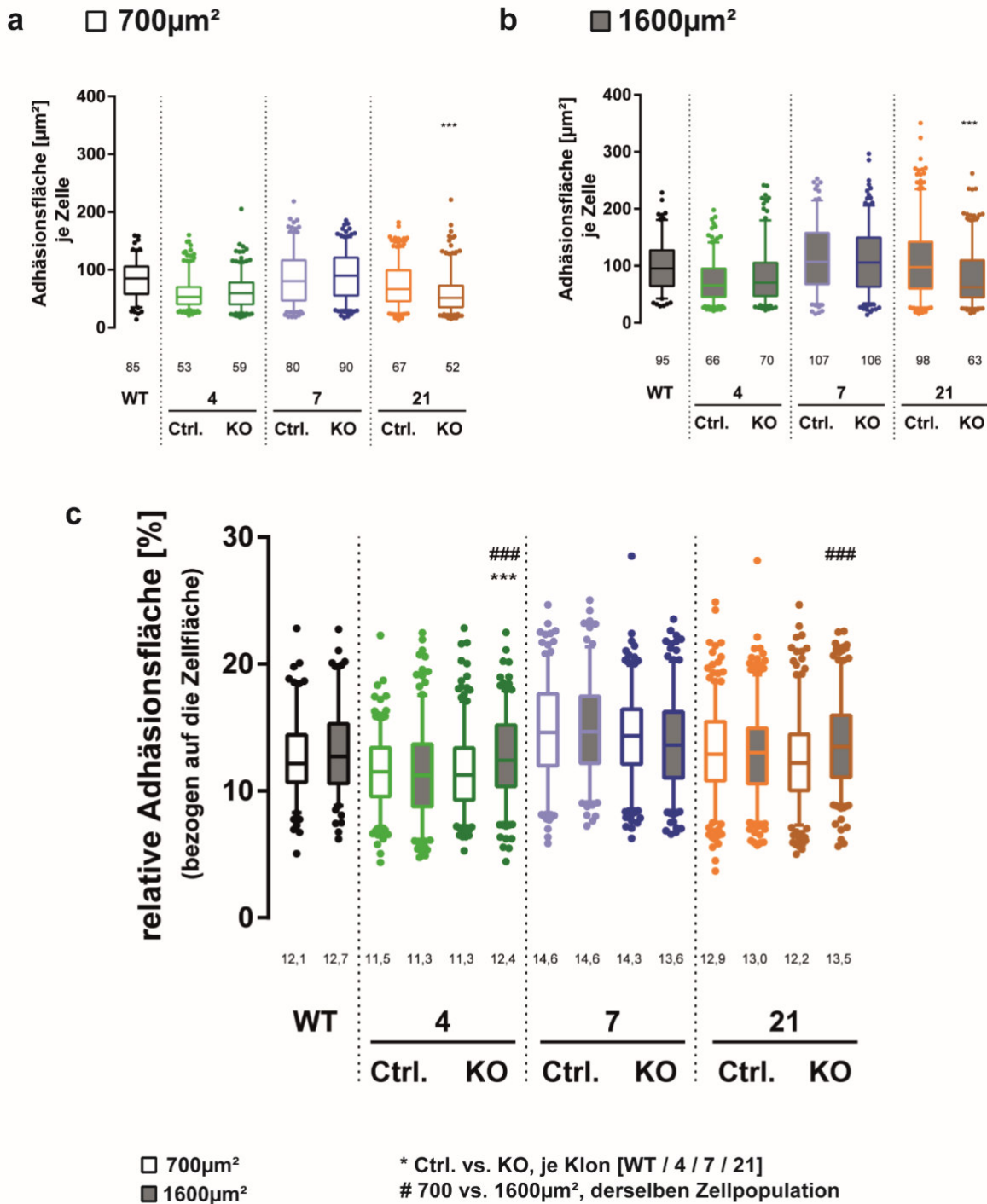


Abbildung 14: Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die Zell-Matrix-Adhäsion verschiedener iREC-Klone auf 700/1600 μm². Die Zelladhäsion wurde anhand der Fläche der gegen Vinculin gefärbten Kontakte auf 700 μm² (a) und 1600 μm² (b) erfasst. (c) zeigt die relativen Adhäsionsflächen auf 700 μm² (weiße Füllung) und 1600 μm² (graue Füllung). Dargestellte Werte entsprechen dem Median des jeweiligen Klons. Es wurden durchschnittlich 250 Zellen je Klon und je Adhäsionsfläche aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

* / ** / ***, p < 0,05 / 0,01 / 0,001

/ ## / ###, p < 0,05 / 0,01 / 0,001

Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison

Wir gehen davon aus, dass eine gesunde Zelle in der Lage ist, sich über die gesamte Adhäsionsfläche von $700 \mu\text{m}^2$ auszubreiten. Da, wie unter 4.1. beschrieben, auch einige Zellen deutlich kleiner als die verfügbare Adhäsionsfläche waren, haben wir in einer zweiten Auswertung alle Zellen mit einer Zellfläche kleiner als $450 \mu\text{m}^2$ ausgeschlossen, um zu überprüfen, ob Zellen mit einer sehr geringen Ausbreitung das Ergebnis beeinflussen.

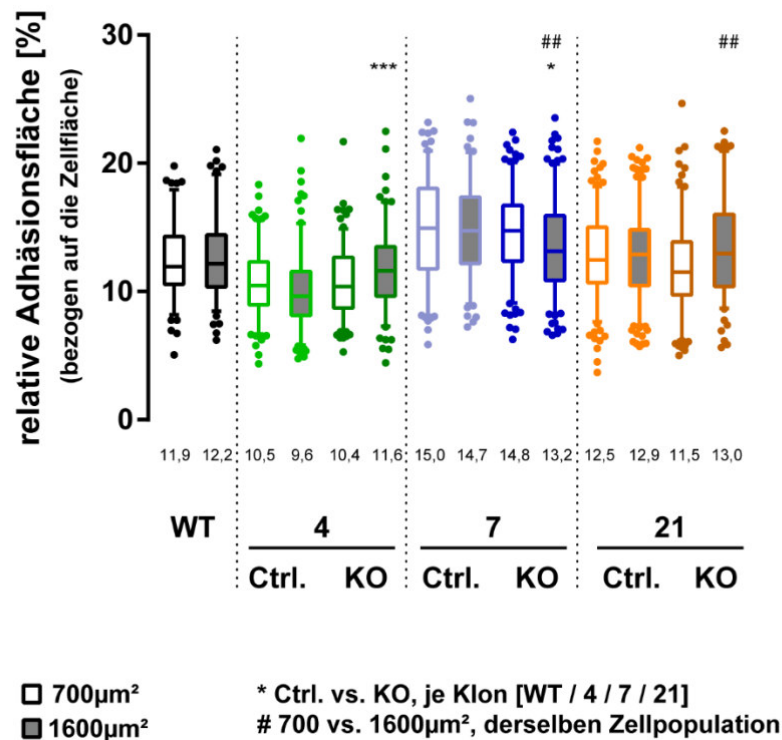


Abbildung 15: Korrigierte Bestimmung der relativen Zell-Matrix-Adhäsion von *Pkd1*-defizienten iREC-Klone und korrespondierenden Kontroll-Klonen unter Berücksichtigung aller Zellen $> 450 \mu\text{m}^2$. Aus der Auswertung der relativen Adhäsionsflächen (dargestellt in Abb. 14 c) wurden alle Zellen ausgeschlossen, die eine kleinere Zellfläche als $450 \mu\text{m}^2$ haben. Dargestellte Werte entsprechen dem Median des jeweiligen Klons.

* / ** / ***, $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$

/ ## / ###, $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$

Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison

Das Ergebnis wurde nicht wesentlich durch den Anteil von kleinen Zellen ($< 450 \mu\text{m}$) beeinflusst. Auf $700 \mu\text{m}^2$ wurde ebenfalls kein Unterschied zwischen Knockout- und Kontrollklonen nachgewiesen. Auf $1600 \mu\text{m}^2$ zeigten lediglich Knockout-Klon 4 und Knockout-Klon 7 signifikant unterschiedliche relative Adhäsionsflächen: Knockout-Klon 4 zeigte, wie auch in der Gesamtauswertung, signifikant erhöhte relative Adhäsionsflächen, Knockout-Klon 7 hingegen signifikant geringere relative Adhäsionsflächen als der korrespondierende Kontrollklon (Kruskal-Wallis Test).

Unter den dargestellten Versuchsbedingungen ergab sich damit kein Einfluss auf das an Hand von gegen Vinculin gefärbten Kontakten gemessene Adhäsionsverhalten verschiedener iREC-Klone [4,7,21] durch die Größe der verfügbaren Adhäsionsfläche ($700/1600 \mu\text{m}^2$) und durch den *Pkd1*-Knockout.

4.3.3 Ausbreitungsverhalten von *Pkd1*-Knockoutklonen und Kontrollen auf kreisförmigen Adhäsionsflächen ($700/1600\mu\text{m}^2$)

In bisherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Fibrocystindefiziente MDCK II Zellen (Nierenepithelzellen vom Hund), als Modell für Nierenepithelzellen in ARPKD-Patienten, auf $700 \mu\text{m}^2$ und $1600 \mu\text{m}^2$ Adhäsionsflächen länglichere Zellformen als Kontrollzellen ausbilden (Ziegler et al., 2020). Um zu überprüfen ob ein *Pkd1*-Verlust in iRECs das Ausbreitungsverhalten der Zellen beeinflusst, haben wir die Form der iRECs auf kreisförmiger Adhäsionsfläche mit Hilfe des Aspect Ratio (AR) bestimmt. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten von Länge und Breite der am besten passenden Ellipse (Länge und Breite stehen senkrecht zueinander und schneiden sich jeweils in der Hälfte). Ein AR von 1 beschreibt somit einen Kreis, während ein AR größer 1 einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Ellipse entspricht (Abb. 16 a).

Der Median des AR war für alle Klone sowohl auf $700 \mu\text{m}^2$ also auch auf $1600 \mu\text{m}^2 >1$, d.h. alle Zellen nahmen eher ovale Formen an. Im direkten Vergleich zwischen Knockout und jeweiligem Kontrollklon war der AR auf $700 \mu\text{m}^2$ und $1600 \mu\text{m}^2$ Adhäsionsfläche bei allen *Pkd1*-Knockoutklonen tendenziell erhöht und für die Klone 7 und 21 auch signifikant größer (Kruskal-Wallis Test). Dies bedeutet, dass die Kontrollklone im Vergleich runder als die korrespondierenden Knockout-Klone waren.

Der Klon WT zeigte auf $700 \mu\text{m}^2$ und auf $1600 \mu\text{m}^2$ einen tendenziell erhöhten AR im Vergleich zu allen anderen Klonen [4, 7, 21, jeweils KO und Ctrl.] und verhält sich somit anders als die anderen iREC-Kontroll-Klone [4 Ctrl., 7 Ctrl., 21 Ctrl.].

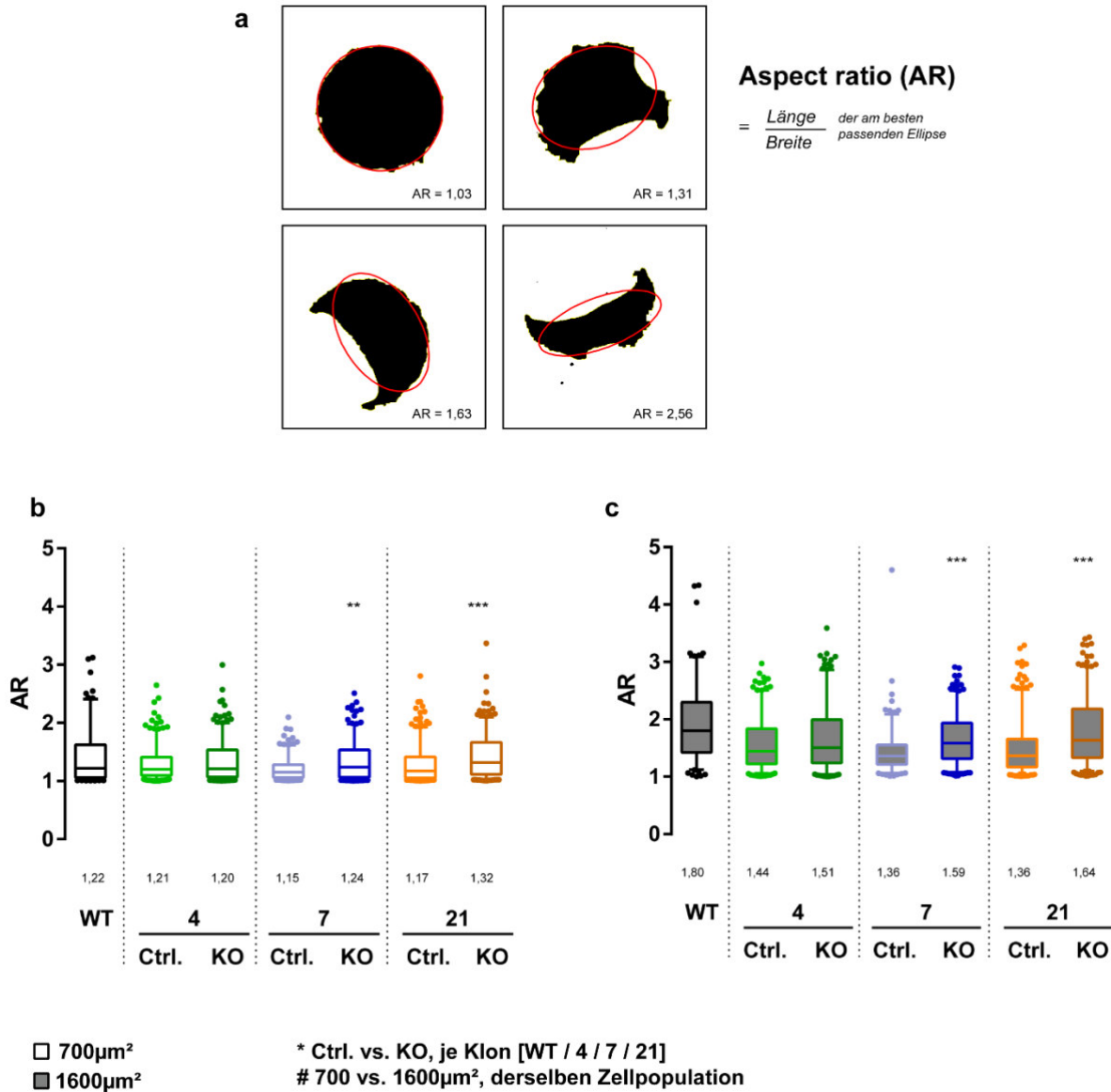


Abbildung 16: Ausbreitungsverhalten *Pkd1*-defizienter iREC-Klone und spezifischer Kontrollen
 Unterschiedliche Formtypen wurden exemplarische dargestellt (a). Die am besten passende Ellipse wurde eingezeichnet (rot). (b), (c) zeigen AR auf 700/1600 μm². Dargestellte Werte entsprechen dem Median des jeweiligen Klons. Es wurden durchschnittlich 250 Zellen je Klon und je Adhäsionsfläche ausgewertet aus drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

* / ** / ***, $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$

/ ## / ###, $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$

Kruskal-Wallis Test, Dunn's multiple comparison

4.4. Ausbildung von Sphäroidstrukturen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips in 3D-Zellkultur

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels ist eine charakteristische Eigenschaft von Nierenepithelzellen. In kultivierten Epithelzellen von ADPKD-Patienten wurden Polaritätsdefekte beschrieben, die vor allem durch veränderte Lokalisation von Membranproteinen entstehen (Wilson, P. D., 1997, Wilson, Patricia, 2011).

Ob iRECs mit und ohne *Pkd1*-Knockout ein korrekt polarisiertes Epithel ausbilden, untersuchten wir anhand der Fähigkeit zur Ausbildung von dreidimensionalen Sphäroiden und der Verteilung von apikalen und basalen Markern im Epithel.

Die Sphäroidkultur ist eine *in vitro* Methode, in der einschichtige Epithelzellen hochorganisierte Strukturen mit einer apiko-basalen Polarität und einem zentralen Hohlraum, dem Lumen ausbilden. *In vivo* kleiden Nierenepithelzellen der Nephrone Hohlräume aus und bilden so die Nierentubuli. Die 3D-Zellkultur entspricht den *in vivo* Bedingungen im Organ besser als herkömmliche 2D Systeme (Monolayer) (Pampaloni, Reynaud & Stelzer, 2007).

Durch Kultur im Matrigel konnten Kaminski et al. (2016) bereits zeigen, dass iRECs Sphäroide mit einem zentralen Lumen und einer apiko-basalen Polarität ausbilden.

In den dargestellten Versuchen testeten wir die Fähigkeit von iRECs mit und ohne *Pkd1*-Knockout auf mikrostrukturierten Adhäsionschips Sphäroide auszubilden. Diese mikrostrukturierten Adhäsionschips bieten neben definierten Startbedingungen von ein bis zwei Zellen pro Adhäsionsfläche den Vorteil, dass hochauflösende Aufnahmen zur Analyse der entstandenen Strukturen gemacht werden können. Zudem ermöglicht das gleichmäßige Muster der Adhäsionschips eine systematische Auswertung.

4.4.1 Technische Probleme und Protokolloptimierung

Rodriguez-Fraticelli et al. (2012) konnten zeigen, dass MDCK II Zellen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips Sphäroide ausbilden. Dazu wurden Einzelzellen auf Adhäsionschips ausgesetzt und für 3 Tage im Medium mit 2,5% Matrigel kultiviert.

Für die Sphäroidbildung von iRECs konnten wir das von Rodriguez-Fraticelli et al. (2012) beschriebene Protokoll nicht direkt anwenden und mussten einige Änderungen und Anpassungen durchführen (Rodríguez Fraticelli et al., 2012). Um Sphäroide zu erhalten veränderten wir die Verweildauer der Zellen auf dem Chip (1), unterstützten die Sphäroidbildung durch ein spezifisches Epithelzellmedium (2) und ergänzten den Fixiervorgang durch Einsatz eines chemischen „Crosslinkers“ (DSP) (3).

Diese Anpassungen werden im Folgendem erläutert.

(1) Versuchszeitraum

Nach 3 Tagen in Kultur auf mikrostrukturierten Adhäsionschips, konnten wir bei den iREC-Klonen keine dreidimensionalen Strukturen beobachten. Es entstanden lediglich flache Anhäufungen von weniger als 5 Zellen pro Adhäsionsfläche. Damit eine dreidimensionale, runde Struktur mit einem Lumen entstehen kann, müssen in der Regel mehr als fünf Zellen vorhanden sein. Auf Grund dieser Beobachtungen beschlossen wir, die Inkubationszeit der Zellen auf dem Chip von 3 auf versuchsweise 5 und 7 Tage zu verlängern, um durch weitere Teilungszyklen größere Sphäroide zu erhalten. Die Beobachtung deckte sich zudem mit den Proliferationsraten, die wir im metabolischen Assay ermittelt hatten (siehe 4.2). Trotz der verlängerten Verweildauer entstanden nur wenige Sphäroide und es gelang uns nicht, die entstandenen Strukturen nach 5 bzw. 7 Tagen zu fixieren. Um eine zuverlässigere Epithelbildung zu erreichen mussten wir daher zunächst weitere Parameter zur Unterstützung der Ausbildung von Sphäroiden verändern.

(2) Optimierung der Sphäroidbildung

Proteomanalysen an iRECs ergaben, dass iRECs im Vergleich zu MEFs (*mouse embryo fibroblasts*) ca. 5-mal weniger extrazelluläre Matrix produzieren (Poster DGfN 2017: Dittrich et al., 2017). Daher erhöhten wir den Matrigel-Gehalt des iREC-Mediums von 2,5% auf 10% und 20% um die Sphäroidbildung durch Zugabe von extrazellulärer Matrix zu unterstützen. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen konnten wir im Lichtmikroskop vermehrt dreidimensionale Sphäroide erkennen. Unter diesen Bedingungen war aber keine Fixierung möglich, da bei der Entfernung des Mediums auch die Sphäroide abgenommen wurden. Wir entschieden uns, die ursprüngliche Matrigel-Konzentration des Mediums von 2,5% auf dem Chip beizubehalten.

Diese Beobachtungen zeigten uns, dass unser Ansatz, die Sphäroidbildung durch exogene Stimulation zu unterstützen, prinzipiell richtig war, aber an der Konsistenz des Matrigels scheiterte. Daher versuchten wir anschließend die Sphäroidbildung durch andere Faktoren zu fördern und erhöhten zum Beispiel den FCS-Gehalt des Mediums. Dies führte zu keiner Verbesserung der Sphäroidbildung.

Ferner entschieden wir uns, für die Sphäroidbildung auf ein spezielles Epithelzellmedium (ATCC-Epithelzellmedium) zu wechseln, welches in unserer Arbeitsgruppe auch zur Kultivierung von primären Nierenepithelzellen aus Patientenurin verwendet wird. Dieses Medium enthält zusätzliche Aminosäuren, Hormone und Wachstumsfaktoren. Die Kultivierung im speziellen Epithelzellmedium ermöglichte eine zuverlässigere Ausbildung von Sphäroiden, sodass auf den meisten Adhäsionsflächen des mikrostrukturierten Chips Sphäroide gebildet wurden.

Abbildung 17 b zeigt eine Phasenkontrastaufnahme aus einem Quadranten eines Adhäsionschips vor der Fixierung mit dreidimensionalen Strukturen unterschiedlicher Größe auf dem Großteil der Adhäsionsflächen.

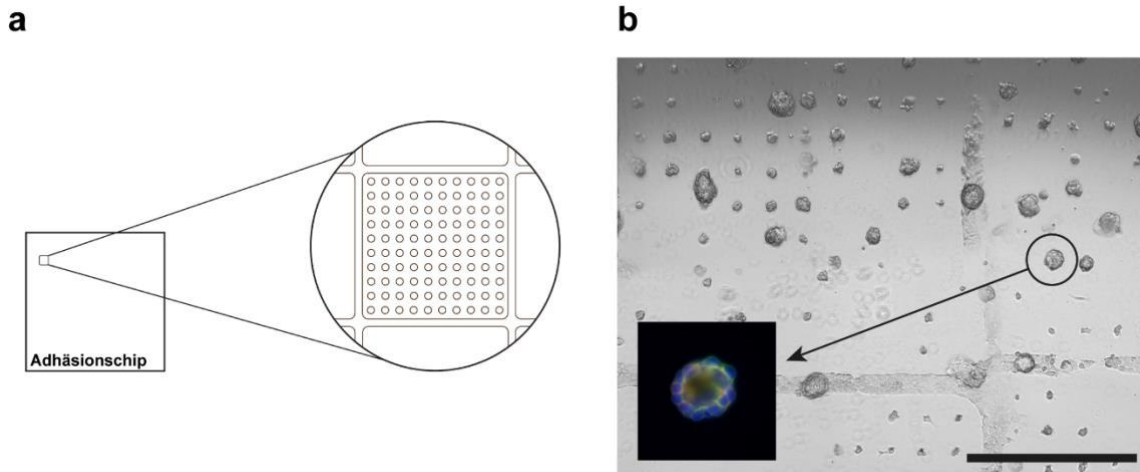


Abbildung 17: Sphäroidbildung auf mikrostrukturierten Adhäsionschip [Klon 7 KO auf 700 μm^2]. Schematischer Aufbau eines mikrostrukturierten Adhäsionschips (a). Auf den kreisförmigen Adhäsionsflächen sitzen dreidimensionale Strukturen oder flache Zellaggregate. Einige Adhäsionsflächen sind nicht besetzt. Phasenkontrastaufnahme. Maßstabsbalken, 500 μm (b).

(3) Fixierung

Nachdem die Ausbildung von Sphäroiden durch ein spezielles Epithelzellmedium verbessert wurde, musste die Fixierung optimiert werden, da es uns trotz Epithelzellmedium nicht gelang, eine ausreichende Anzahl an Sphäroide zu fixieren. Dazu veränderten wir einerseits die Beschichtung der Chips und verwendeten zusätzlich zu Kollagen (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) auch Fibrinogen (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Weiterhin wurde die Fixierung verstärkt, indem wir einen zusätzlichen zehnmütigen Zwischenschritt mit PFA (4%) und dem Cross-Linker DSP einführten. Diese Veränderungen ermöglichten, den Großteil der vorhandenen Strukturen zu fixieren, färben und mittels Fluoreszenzmikroskop aufzunehmen.

Die Änderungen und Anpassungen des Protokolls zur Sphäroidbildung machen deutlich, dass iRECs im Vergleich zu anderen Nierenepithelzelllinien wie zum Beispiel den MDCK II Zellen für die Epithelbildung andere Anforderungen an ihre Umgebung stellen. Trotz dieser Anpassungen und Änderungen des Protokolls lief das System nicht völlig stabil. Es kam wiederholt vor, dass sich nach 2-3 Tagen in einzelnen Quadranten die entstandenen Sphäroide/ drei-dimensionalen Strukturen von den Adhäsionsflächen lösten im Medium „schwammen“ und dementsprechend nicht fixiert werden konnten. Wir vermuteten, dass noch Reste des Crosslinkers DSP oder der Waschlotion (Baktolin) zur Säuberung der Kammern an den Kammern verbleiben und so das System beeinflussen. Auf Grund dieser Vermutung

intensivierten wir das Reinigungsprotokoll für die Kulturkammern. Das Problem der Ablösung von Sphäroiden ließ sich auch durch diese Maßnahme nicht vollständig beheben. Wir haben unsere Aufmerksamkeit zunächst auf eine erste Beschreibung der vorhandenen, fixierbaren Strukturen gerichtet. Dabei fokussierten wir uns auf Klon 7 und Klon WT.

4.4.2 Entstehung und Charakteristik dreidimensionaler Sphäroide auf mikrostrukturierten Adhäsionschips

Nach beschriebener Anpassung und Optimierung des Protokolls konnten wir für Klon WT und Klon 7 (KO und Ctrl.) 120-150 Sphäroid-Strukturen aus drei unabhängigen Versuchen auf 700µm² Adhäsionsfläche erzeugen, färben und mittels Fluoreszenzmikroskop aufnehmen.

Die entstandenen Strukturen waren insgesamt heterogen. Es entstanden runde Sphäroide mit Lumen (Abb.18 a) und Zellaggregate (Abb.18 b), aber auch Strukturen deren Lumen von einem unregelmäßigen Epithel begrenzt wurden. Dieses Epithel war mehrschichtig (Abb.18 c) oder es handelte sich um ein dünnes einschichtiges Epithel, das von Zellen mit einem sehr schmalen Zytoplasma gebildet wurde (Abb. 18 d).

Mehr als die Hälfte der aufgenommenen Strukturen der Klone 7 [KO, Ctrl.] und WT zeigten in dieser ersten Auswertung ein unregelmäßiges Epithel. Dieses war meistens mehrschichtig (Tabelle 4 a). Eine eindeutige Zuordnung zwischen mehrschichtigem Epithel und schmalen Epithel mit Zellen mit dünnem Zytoplasma war teilweise nicht möglich, da es Strukturen gab, die beide Charakteristiken zeigten (Tabelle 4 b).

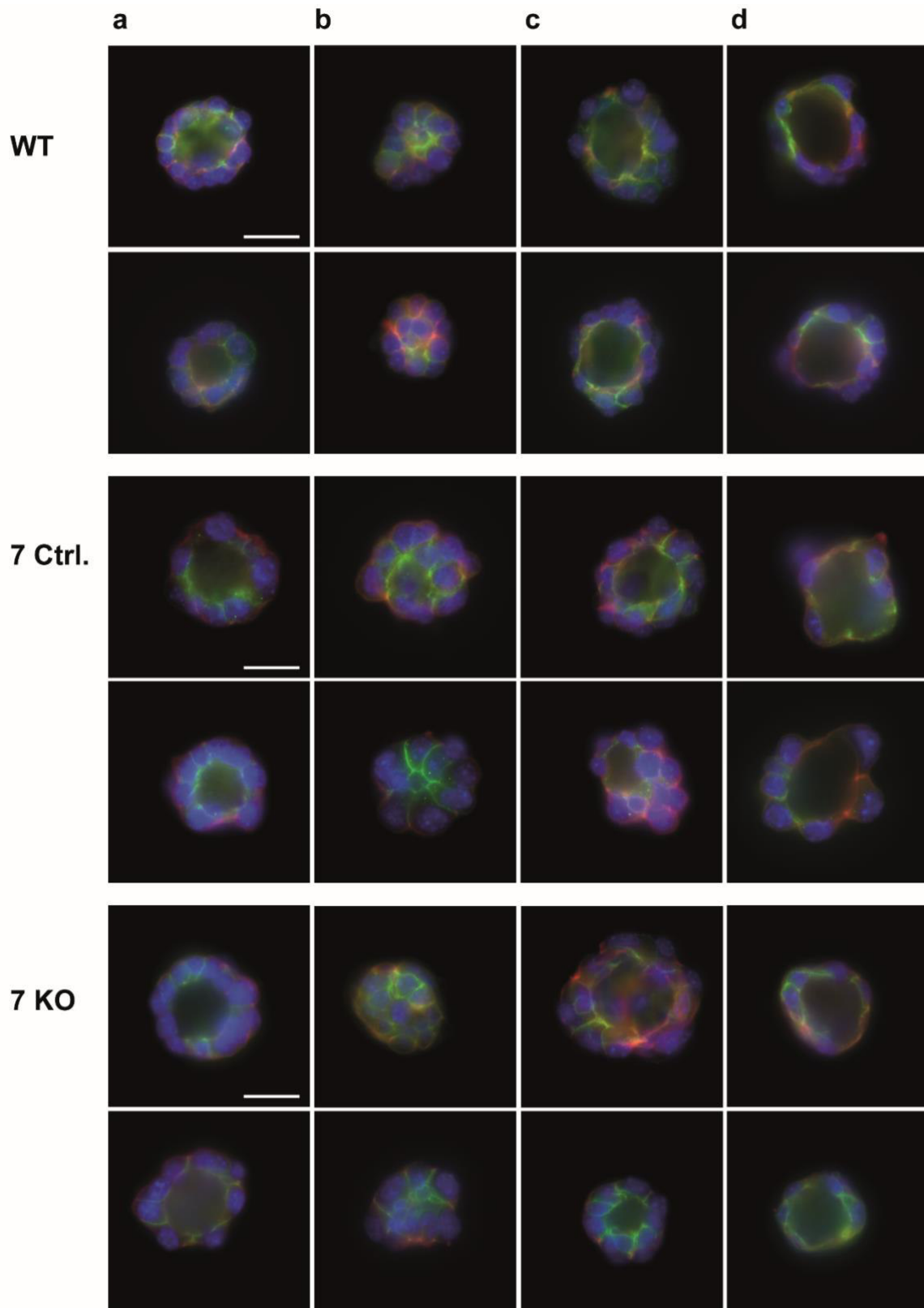


Abbildung 18: Beispiele für Sphäroid-Strukturen und Aggregate unterschiedlicher iREC-Klone auf Adhäsionschips. Dargestellt ist jeweils die Äquatorialebene der 3D-Struktur des iREC-Klons WT und des *Pkd1*-Knockout-Klons 7 [7 KO] mit zugehöriger Kontrolle [7 Ctrl.] nach 5 Tagen auf Adhäsionschips (700 μm^2). Es zeigten sich Sphäroide mit Lumen und polarisiertem Epithel (a), Aggregate ohne Lumen (b) sowie Strukturen mit Lumen aber unregelmäßigem Epithel (c, d). Die Zellkerne sind in blau (DAPI), F-Aktin in rot und E-Cadherin in grün dargestellt. Maßstabsbalken, 20 μm .

a.

Klon	runder Sphäroid mit Lumen (einschichtiges Epithel)	Struktur mit Lumen und unregelmäßigem Epithel	Aggregat
WT	18,8 %	51,0 %	30,2 %
7 Ctrl.	20,0 %	63,5 %	16,5 %
7 KO	32,8 %	54,9 %	12,3 %

b.

Klon	unregelmäßiges Epithel mit Lumen		
	mehrschichtig	dünne Zellschicht (schmales Zytoplasma)	mehrschichtige Anteile sowie Anteile mit dünner Zellschicht
WT	64,5 %	30,3 %	5,3 %
7 Ctrl.	46,6 %	38,4 %	15,1 %
7 KO	70,1 %	26,9 %	3,0 %

Tabelle 4: Einteilung dreidimensionaler Strukturen auf Adhäsionschips. Die Einteilung erfolgte nach Charakteristik des Epithels. Angaben beziehen sich auf 120-150 Sphäroide je Klon aus drei unabhängigen Versuchen aus jeweils einem Quadranten des Chips (Tabelle a) bzw. auf alle ausgewerteten Sphäroide mit mehrschichtigem Epithel (Tabelle b).

In einem ersten Vergleich zwischen Knockout- und Kontroll-Klon bildete Knockout-Klon 7 mehr runde Sphäroide mit Lumen als der Kontroll-Klon und der WT-Kontroll-Klon aus.

Die Unfähigkeit, ein Lumen auszubilden deutet auf einen epithelialen Defekt hin und auch die Ausbildung von mehrschichtigen Sphäroiden ist untypisch für Nierenepithelzellen. Da aber sowohl Knockout- als auch Kontrollzellen mehrschichtige Epithelien und Probleme in der Lumenbildung zeigten, kann hier die Wirkung des *Pkd1*-Knockouts nicht beurteilt werden. Dieses Verhalten kann vielmehr als Hinweis für limitierte epitheliale Eigenschaften der reprogrammierten Epithelzellen interpretiert werden.

Die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid können wir anhand dieser ersten Auswertung nicht beurteilen. Eine apikale Anreicherung von F-Aktin sowie basolaterales E-Cadherin innerhalb des Epithels gibt uns einen Hinweis für eine korrekte Polarität des Epithels im Sphäroid. Eine quantitative Auswertung, wie groß der Anteil inverser Sphäroide der einzelnen Klone im Vergleich zueinander und im Vergleich zu korrekt

polarisierten Sphäroiden ist, wurde in dieser ersten Auswertung nicht durchgeführt. Die Aktin-Färbung war einerseits mit unter von unzureichender Qualität, andererseits handelt es sich bei der Anfärbung von Aktinbündeln um einen Indikator aber um keinen direkten Marker der Polarität.

Eine Aussage über den Einfluss eines *Pkd1*-Knockouts auf die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid lässt sich somit anhand dieser ersten Ergebnisse nicht treffen und bleibt Thema für zukünftige Untersuchungen.

Neben dem beschriebenen ungleichmäßigen Epithel der Sphäroid-Strukturen ist außerdem anzumerken, dass oft sehr flache dreidimensionale Strukturen gebildet wurden. Diese bestanden lediglich aus einer das Lumen begrenzenden Zellschicht in der Äquatorialebene sowie wenigen das Lumen nach oben und unten begrenzenden Zellen. Teilweise handelte es sich auch nur um eine flache Anhäufung von Zellen. Auch die Größe der Zellen im Sphäroid war sehr variabel, was der Beobachtung der Zellgrößen in der Einzelzelladhäsion entspricht, in der eine variable Zellgröße ermittelt wurde (Vgl. 4.3.1).

Zusammenfassend stand in dieser Austestung die Reproduzierbarkeit der Ausbildung von Sphäroiden durch iRECs im Vordergrund. Dies konnte durch zahlreiche Anpassungen und Optimierungen des Protokolls erreicht werden. Wir konnten zeigen, dass iRECs unter streng definierten Bedingungen in der Lage sind Sphäroidstrukturen auszubilden. iRECs haben aber erhöhte Anforderungen an ihre Umgebung und bilden im Vergleich zu MDCK II Zellen oder primären Nierenepithelzellen untypische, heterogene Sphäroidstrukturen aus.

5 Diskussion

Polyzystische Nierenerkrankungen gehören zu den häufigsten Nierenerkrankungen im Menschen und führen oft zu terminaler Niereninsuffizienz.

Induzierte renale Epithelzellen (iRECs) wurden als neues, alternatives Zellmodell zur Erforschung genetisch verursachter Nierenerkrankungen vorgeschlagen und geben die Möglichkeit gezielt epitheliale Funktionen *in vitro* zu untersuchen (Kaminski et al., 2016).

In dieser Arbeit wurden erstmals iREC-Klone mit selektivem *Pkd1*-Verlust als Modell für die polyzystische Nierenerkrankung ADPKD getestet und im Vergleich zu korrespondierenden iREC-Kontrollklonen anhand ihrer Zellcharakteristik und Epithel Eigenschaften analysiert.

Eine Charakterisierung der Epithelzelleigenschaften und deren Störung durch den selektiven Verlust des *Pkd1*-Gens anhand einer vergleichenden Analyse von Proliferationsverhalten, Zell-Matrix-Adhäsion und der Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid sollte uns eine Einschätzung liefern, inwiefern iRECs sich zur Untersuchung genetisch verursachter Epithelzelldefekte eignen.

Wir erwarteten, dass iREC-Klone mit einem selektiven *Pkd1*-Knockout im Vergleich zu den Kontrollklonen funktionale Defekte aufweisen, wie sie an bisherigen ADPKD-Modellen beobachtet wurden (Vgl. 1.1.7).

5.1 *Pkd1*-defiziente iRECs als Modell für Epithelzelldefekte bei ADPKD

Die verwendete *Pkd1*-Knockout iRECs sind durch einen homozygoten *Pkd1*-Verlust gekennzeichnet. Dieser *Pkd1*-Knockout wurde für die verwendeten Knockout-Klone in der PCR mittels spezifischer *Pkd1*-Primer bestätigt (Vgl. 4.1). In den korrespondierenden Kontrollklonen wurde zudem das gefloxtete *Pkd1*-Allel nachgewiesen (Vgl. 4.1), sodass Fehler in der Behandlung mit Cre- bzw. Flippase-Viren bei der Entstehung von Knockout- und Kontrollklonen nicht anzunehmen sind.

Im Menschen ist auf Grund der autosomal dominanten Vererbung eine heterozygote *PKD*-Mutation ausreichend um die Erkrankung auszulösen. Es wird hier aber neben einer Haploinsuffizienz auch ein Second-Hit-Mechanismus wie z.B. eine zusätzliche somatische Mutation des zweiten *PKD1*- oder des *PKD2*-Allels sowie ein kompletter Verlust der Heterozygotie diskutiert, unter anderem da zwar alle Nierenepithelzellen die Keimbahnmutation tragen, aber nur ein geringer Anteil davon zystisch wird (Watnick et al., 2000, Pei, Y. et al., 1999, Qian et al., 1996, Harris, 2010).

In kultivierten Epithelzellen von ADPKD-Patienten wurde das *PKD1*-Genprodukt Polycystin andererseits teilweise sogar in erhöhte Mengen nachgewiesen (Geng et al., 1996, Ward et al., 1996, Wilson, P. D. et al., 1999). Der Polycystin-Nachweis in Patientenzellen steht im Kontrast zum Modell eines kompletten Verlusts der Heterozygotie durch somatische Inaktivierung und unterscheidet diese ADPKD-Epithelzellen von den in dieser Arbeit als Modell für ADPKD verwendeten *Pkd1*-Knockout-Zellen, in denen keine Polycystin I Expression stattfindet. Eine

mögliche Ursache für den erhöhten Nachweis von Polycystin in Patientenzellen könnte darin bestehen, dass es sich dabei um mutierte Proteine handelt, welche keine ausreichenden Funktionen zeigen (Lu et al., 2001).

Da Polycystin nicht in allen Zysten detektiert werden konnte (Ibraghimov Beskrovnaya et al., 1997) und auch ein Verlust der Heterozygotie nur in einem geringen Anteil der Zysten nachgewiesen wurde (Brasier, Henske, 1997), bleibt der Auslöser für die Entwicklung von Nierenzysten weiterhin Gegenstand von Diskussion und Forschung.

Unabhängig davon ob eine Haploinsuffizienz ausreichend ist, um die Zystenbildung zu initiieren, wird vermutet, dass eine Mutation im zweiten Allel den Phänotyp der Erkrankung modifiziert und zudem das Wachstum und Überleben der Zysten begünstigt (Harris, 2010). Das verbreitete Gene-Dosage-Modell geht davon aus, dass die Menge an funktionalem Polycystin den Phänotyp der Erkrankung direkt beeinflusst (Ong, Harris, 2015).

Im Mausmodell führen die Überexpression, die Reduktion wie auch die Inaktivierung von *Pkd1* zu ADPKD ähnlichen Phänotypen, was den Schluss nahelegt, dass jede Form der *Pkd1*-Dysregulation in der Ausbildung von Zysten resultieren kann (Lantinga-van Leeuwen et al., 2004, Thivierge et al., 2006, Lantinga-van Leeuwen et al., 2007).

Für die Validität des in dieser Arbeit verwendeten *Pkd1*-Knockoutmodells als Modell für Epithelzelleigenschaften in ADPKD sollten daher Ausprägung und Phänotyp der Erkrankung betrachtet werden. Mäuse mit einer heterozygoten *Pkd1*-Mutation entwickeln wenige Zysten im späten Lebensalter (Lu et al., 1999). Im Gegensatz dazu führen homozygote *Pkd1*-Mutationen in Mäusen zu einer hohen perinatalen Letalität mit massiv vergrößerten, zystischen Nieren (Lu et al., 1997). Die verwendeten iRECs entstammen Mäusen mit einem geflochtenen *Pkd1*-Allel, welches von Piontek et al. 2004 erstmals beschrieben wurde. Piontek et al. (2004) konnten zeigen, dass die somatische Expression einer Cre-Rekombinase in Mäusen mit dem geflochtenen *Pkd1*-Allel in einem Nullallel und in der Ausbildung von Nierenzysten resultiert. Dies berechtigt zu der Annahme, dass iRECs mit *Pkd1*-Knockout sich wie Nierenepithelzellen der *Pkd1*-Knockout-Mäusen verhalten und ebenfalls zur Zystenbildung neigen.

5.2 Proliferationsverhalten von iREC-Klonen mit und ohne *Pkd1*-Knockout unter Zellkulturbedingungen

Da die ADPKD zu den proliferativen Erkrankungen gehört, die mit einer exponentiellen Zunahme des Nierenvolumens durch die Bildung und Expansion von Zysten einhergeht (Grantham, Jared et al., 2006), wird für die Entstehung dieser Zysten und die Zunahme des Nierenvolumens eine Hyperproliferation des Epithels verantwortlich gemacht. In Gegensatz zu einer erhöhten Proliferation, die in kultivierten zystischen Nierenepithelzellen aus Patienten nachgewiesen wurde (Wilson, P. D. et al., 1985, Wilson, P. D. et al., 1986, Wilson, P. D., Hreniuk & Gabow, 1992, Nadasdy et al., 1995), konnte wir anhand von zwei unabhängigen Messverfahren keinen signifikanten Unterschied der Populationsverdopplungszeiten zwischen

Pkd1-Knockoutklonen und Kontrollklonen beobachten. Mit Ausnahme eines Klons [Klon 5 KO] zeigten die iREC-Knockout-Klone sogar tendenziell geringere Populationsverdopplungszeiten. Knockout-Klon 5 hingegen zeigte eine im Vergleich zum zugehörigen Kontrollklon [Klon 5 Ctrl.] tendenziell kürzere Populationsverdopplungszeit.

Die anhand der Zunahme der metabolischen Aktivität ermittelten Populationsverdopplungszeiten von iRECs waren deutlich länger als dies aufgrund der Passagenzeiten in der Zellkultur (zweimal wöchentlich, 1:4) zu erwarten war, sodass wir diese in einem weiteren Messverfahren mittels Impedanz-Messungen überprüften. Die Bestimmung der Populationsverdopplungszeiten über Messungen der metabolischen Aktivität und der Impedanz ergab stark differente absolute Populationsverdopplungszeiten. Dies ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass Zustand und Dichte der Zellen einen erheblichen Einfluss auf das Proliferationsverhalten haben. Gestützt wird diese Vermutung durch die Ergebnisse der Zellzahlaustestung für Impedanz-Messungen. Hier zeigten weniger dicht ausgesäte Zellen (3500 Zellen pro Vertiefung) eine deutlich geringere Proliferation. Im metabolischem Assay, der zu längeren Populationsverdopplungszeiten führte, wurde zudem eine geringere Startzellzahl verwendet als in den Impedanz-Messungen (Vgl. 4.2.2).

Trotz differierender Absolut-Werte zeigten beide verwendeten Messverfahren keinen Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf das Proliferationsverhalten der iREC-Klone und kommen im Vergleich zwischen Knockout- und Kontrollklonen insgesamt zum gleichen Ergebnis: Unter den gewählten definierten Zellkulturbedingungen erzeugt die reine Genetik der *Pkd1*-Knockoutklone keinen Proliferationsvorteil gegenüber korrespondierenden Kontrollklonen.

Dieses Ergebnis stimmt mit Studien überein, die im Gegensatz zu Nadasdy et al. (1995) und Wilson et al. (1985,1986,1992) in kultivierten Nierenepithelien aus polyzystischen Nieren von betroffenen Patienten oder PKD-Mäusen im Vergleich zur gesunden Kontrollen ebenfalls keine Unterschiede der Proliferationsraten ermittelt haben (Carone et al., 1989, Taub et al., 1990, Rankin et al., 1996). Rankin et al. (1996) erklärten die normalen Wachstumsraten von PKD-Epithelien unter konventionellen Zellkulturbedingungen unter anderem dadurch, dass die *in vivo* beschriebene epitheliale Hyperplasie möglicherweise eine sekundäre und keine intrinsische Eigenschaft von PKD-Epithelzellen ist, die verloren geht, wenn Zellen kultiviert werden, da z.B. *in vivo* vorhandene mitogene Stimuli fehlen (Rankin et al., 1996). Diese Einschätzung beruht auf der Annahme, dass die Bestimmung von Proliferationsraten *in vitro* nicht oder nur eingeschränkt geeignet ist, im Organ vorkommende Proliferationsdefekte zu identifizieren, da die Zellkultur die Umgebung der Zellen im Organ nicht ausreichend gut wiedergibt (Rankin et al., 1996). IRECs haben zudem die Besonderheit, dass es sich um reprogrammierte Fibroblasten handelt, die nie Bestandteil einer Niere waren. Somit kann auch nur postuliert werden, dass diese im Nierenepithel als intrinsische Folge der Genetik Zysten ausbilden würden.

Auch wenn unter den gewählten Zellkulturbedingungen kein Proliferationsvorteil der *Pkd1*-Knockoutklone beobachtet wurde, wäre es denkbar, dass einzelne *Pkd1*-Knockoutklone im richtigen Kontext eine erhöhte Proliferation zeigen können. Ein Weiterführen der Zellen in höhere Passagen führte unter Erhalt der epithelialen Charakteristik zu Unterschieden im Proliferationsverhalten zwischen Knockout- und Kontrollzellen (persönliche Kommunikation mit Dr. rer. nat. Wolfgang Ziegler). Der Polycystin I Verlust zeigt somit möglicherweise erst nach mehreren Zellteilungen Wirkung. Hier könnten ein epigenetischer Drift ursächlich sein, der dazu führt, dass sich mit zunehmend höherer Passagenzahl die Genexpression der iRECs und damit auch das Verhalten der iREC-Klone verändert. Die ADPKD im Menschen ist ebenfalls eine Erkrankung, die durch eine Keimbahn-Mutation verursacht wird, sich häufig jedoch erst im Erwachsenenalter manifestiert.

Andererseits wäre es auch möglich, dass zusätzliche Gen-Mutationen in *Pkd1*-Knockout-iRECs für die zunehmenden Proliferationsunterschiede verantwortlich sind. Auch im Menschen wird vermutet, dass zusätzliche Mutationen im gesunden *Pkd1*- und *Pkd2*-Allel das Wachstum und Überleben der Zellen begünstigen können (Harris, 2010). Ferner beeinflussen Varianten in anderen PKD-Genen wie zum Beispiel *HNF1 β* die Zystenbildung (Bergmann et al., 2011)

Im Hinblick auf die Klinik betroffener Patienten spielt neben der Proliferation auch die Apoptose von gesunden Nierenzellen eine wichtige Rolle, da der progressive Verlust des gesunden Nierenparenchyms mit einer Abnahme der Nierenfunktion einhergeht. Es wird diskutiert, dass die Kombination aus Apoptose und kompensatorischer Proliferation von zentraler Bedeutung für die Entstehung von Zysten und der damit verbundenen Abnahme der Nierenfunktion sein könnte (Wilson, Patricia, 2004, Edelstein, 2005, Goilav, 2011). Woo et al. (1995) haben bereits erhöhte Mengen apoptotischer DNA-Fragmente in Gewebe aus polyzystischen Nieren nachgewiesen (Woo, D., 1995). Die Bestimmung der Apoptoseraten von iRECs mit und ohne *Pkd1*-Knockout sollte in nachfolgenden Arbeiten berücksichtigt werden.

5.3. Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die Kontrolle der Zell-Matrix-Interaktion

Zur Untersuchung der Zellgrößen sowie der Zell-Matrix-Adhäsion verwendeten wir Kollagenbeschichtete, mikrostrukturierte Adhäsionschips mit unterschiedlich großen runden Adhäsionsflächen (700 und 1600 μm^2). Die Ausbildung von Adhäsionsstellen wurde im Ein-Zell-Stadium durch Fluoreszenzfärbung des Strukturproteins Vinculin visualisiert und mittels ImageJ ausgewertet. Dies ermöglichte uns, eine große Anzahl an Zellen (durchschnittlich 250 Zellen pro Klon und Größe der Adhäsionsfläche) zu untersuchen. Das Adhäsionsverhalten von iREC-Zellen stellt eine wichtige Vorstufe für die Fähigkeit zur Sphäroidbildung dar. Die Wahrnehmung einer räumliche Begrenzung und die entsprechenden Verarbeitung der Adhäsionssignale sind essentielle Eigenschaften der Zellen für die Ausbildung eines polarisierten, dreidimensionalen Epithels mit Lumen (Rodríguez Fraticelli et al., 2012). Ferner geben uns die Ein-Zell-Stadien Auskunft über die Homogenität der iRECs in der Zellpopulation.

Mit Ausnahme von Klon WT und Knockout-Klon 4 waren die verwendeten iREC-Klone auf 1600 μm^2 signifikant größer als auf 700 μm^2 (Vgl. 4.3.1). Dies deckte sich mit Beobachtungen, die Rodriguez-Fraticelli et al. (2012) an MDCK II Zellen machten und bestätigt, dass auf einer Adhäsionsfläche von 700 μm^2 die laterale Zellausbreitung von iRECs eingeschränkt ist (Rodríguez Fraticelli et al., 2012). Die Zellmatrix-Adhäsion von iRECs auf 700 μm^2 entsprach eher den Bedingungen von Zellen im Epithelzellverband der Niere, in der die Zellausbreitung durch das Mikroumfeld, extrazelluläre Matrix und benachbarte Zellen limitiert ist (Théry, 2010). Zudem ist eine räumliche Begrenzung der Zellen eine wichtige Voraussetzung für die Sphäroidbildung. Rodriguez-Fraticelli et al. (2012) haben für MDCKII Zellen nachgewiesen, dass Zellen auf größeren, nicht die Ausbreitung begrenzenden Adhäsionsflächen mit Kollagenbeschichtung vermehrt inverse Sphäroide und Sphäroide ohne Lumen ausbilden (Rodríguez Fraticelli et al., 2012). Dieser Versuch zeigte uns daher, dass die Adhäsionsfläche von 700 μm^2 für iRECs prinzipiell eine geeignete Größe für die Ausbildung von Sphäroiden hat.

Eine genauere Betrachtung der Zellgrößen und Morphologie zeigte uns auch, dass es sich bei iRECs um eine eher heterogene Zellpopulation handelt, da die Zellgrößen sowohl auf 700 μm^2 als auch auf 1600 μm^2 Adhäsionsfläche stark variierten. Zudem fiel ein Anteil von ca. 15% sehr kleiner Zellen auf, die nur wenig größer als der Zellkern waren und damit nur eine minimale Ausbreitung zeigten (Vgl. 4.3.1). Der *Pkd1*-Knockout kann als Ursache für das Auftreten sehr kleiner Zellen ausgeschlossen werden, da dieses Phänomen in Knockout- und Kontrollklonen gleichermaßen beobachtet wurde. Möglicherweise sind die kleinen Zellen durch eine asymmetrische Zellteilung mit viel bzw. wenig Zytoplasma entstanden. Bei der Beurteilung der Zell-Matrix-Adhäsion wurden diese Zellen nicht berücksichtigt. Für die Bewertung der Ergebnisse der Proliferation und Sphäroidbildung muss jedoch beachtet werden, dass die

verwendete Zellpopulation einen Anteil sehr kleiner, eventuell nicht geeigneter Zellen enthielt. Ein Verlust dieser Zellen nach Subklonierung könnte zu einem geänderten Verhalten der Zellpopulation geführt haben.

Ein systematischer Einfluss des *Pkd1*-Knockouts auf die zelluläre Kontrolle der Zell-Matrix-Adhäsion wie es in ADPKD-Epithelien in den Publikationen von Patricia Wilson (Wilson et al., 1992, 1999) beschrieben wurde, konnten wir unter den verwendeten Bedingungen anhand der auf Vinculin angefärbten Kontakte nicht nachweisen. Lediglich Knockout-Klon 21 zeigte im Vergleich zu Kontroll-Klon 21 signifikant geringere absolute Adhäsionsflächen (auf 700 μm^2 und auf 1600 μm^2). Auch die Analyse der relativen Adhäsionsflächen auf 700 μm^2 Adhäsionsflächen zeigte keine systematischen Unterschiede zwischen *Pkd1*-Knockout-Klonen und korrespondierenden Kontrollen. Auf 1600 μm^2 waren die relativen Adhäsionsflächen in Knockout-Klon 4 und 21 erhöht, Knockout-Klon 7 wies aber eine tendenzielle geringere Adhäsionsfläche als die Kontrolle auf, sodass kein gleichmäßiger Trend zu erkennen war. Klon 7 hatte auch insgesamt eine deutlich größere relative Adhäsionsfläche als die anderen Klone, sodass eine weitere Erhöhung der Adhäsion eventuell gar nicht möglich war.

Da wir erwarten, dass eine gesunde iREC Zelle in der Lage ist, sich über eine Fläche von 700 μm^2 auszubreiten, führten wir eine zweite korrigierte Bestimmung der relativen Adhäsion durch, um zu überprüfen ob Zellen mit einer Zellfläche kleiner als 450 μm^2 das Ergebnis verfälschen. Der Ausschluss kleiner Zellen (kleiner als 450 μm^2) führte auf 700 μm^2 zu keinen Unterschieden in der Bewertung der relativen Adhäsion von Knockout- und korrespondierenden Kontrollklonen. Auf 1600 μm^2 zeigten sich die gleichen Tendenzen wie in der Gesamtauswertung, sodass auch kleine Zellen (< 450 μm^2) das Gesamtergebnis nicht wesentlich beeinflussen.

Diese Ergebnisse zur Zelladhäsion stehen im Widerspruch zu verschiedenen Arbeiten von Patricia Wilson (1986, 1992, 1999, 2004), in denen Veränderungen der Zell-Matrix-Interaktion in PKD-Epithelzellen dokumentiert wurden. Wilson et al. (1999) haben beobachtet, dass Nierenepithelzellen aus ADPKD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen eine erhöhte Adhäsion zur Kollagen Typ I zeigen. Außerdem wurde in ADPKD-Epithelzellen eine Verdopplung der Proteinmengen von Vinculin- und Paxillin ermittelt (Wilson, P. D. et al., 1999). Hier sollte berücksichtigt werden, dass Wilson et al. im Gegensatz zu dieser Arbeit die initiale Adhäsion der Zellen testeten, indem sie den Anteil der adhären Zellen auf Kollagen nach einer definierten Zeit ermittelten (Wilson, P. D. et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit hingegen testen wir, inwiefern die Flächen der Zell-Matrix-Adhäsionen einzelner Zellen verändert sind. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist daher nicht möglich.

Im Hinblick auf die Sphäroidbildung als nachfolgend anstehende Untersuchung können unsere Ergebnisse der Zell-Matrix-Adhäsion mit Arbeiten unserer Arbeitsgruppe an MDCK II Zellen

mit *Pkhd1*-Knockdown, als Modell für die polyzystische Nierenerkrankung ARPKD, verglichen werden (Ziegler et al., 2020). Ziegler et al. beobachteten, dass MDCK II Zellen mit *Pkhd1*-Knockdown im Vergleich zu Kontrollen nach 3 Tagen auf mikrostrukturierten Adhäsionschips überwiegend Sphäroide mit einer inversen Polarität oder Zellaggregate ausbilden. Um zu prüfen, ob diese Störung mit einer veränderten Kontrolle der Zell-Matrix-Adhäsion einhergeht, wurde die Kontaktbildung in Ein-Zell-Stadien ebenfalls auf Basis Vinculin-gefärbter Kontaktflächen ermittelt (Ziegler et al., 2020).

Für diesen Vergleich sollte berücksichtigt werden, dass eine andere Ausgangsbeobachtung besteht. Während MDCK II Zellen auf 700 μm^2 meist die gesamte Adhäsionsfläche ausfüllen (Median 722 μm^2 (Ziegler et al., 2020)), ist dies bei iRECs nicht gegeben. iRECs sind – mit Ausnahme von Klon WT – auf 700 μm^2 meist kleiner als die verfügbare Adhäsionsfläche (Median 497 μm^2 [Klon 4 Ctrl.], 583 μm^2 [Klon 7 Ctrl.] und 579 μm^2 [Klon 21 Ctrl.], Vgl. Abb. 13). Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass iRECs auf die Begrenzung reagieren, da auf 1600 μm^2 Adhäsionsfläche signifikant größere Zellflächen ausgebildet werden (Vgl. 4.3.1). *Pkhd1*-defiziente MDCK II Zellen sind auf 700 μm^2 signifikant kleiner und bilden signifikant weniger Kontakte pro Zelle als Kontroll-Zellen. Zudem beeinflusst die *Pkhd1*-Defizienz das Ausbreitungsverhalten der Zellen. Während *Pkhd1*-defiziente Zellen auf runder Adhäsionsfläche längliche Zellformen ausbilden, sind Kontrollzellen häufig rund (Ziegler et al., 2020).

Im iREC-Modell zeigte Knockout-Klon 21 ebenfalls eine signifikant geringere Zellgröße und hatte eine signifikant geringere Kontaktfläche auf 700 μm^2 . Die Klone 4 und 7 zeigten auf 700 μm^2 jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Zellgröße und der Kontaktfläche.

Ursächlich hierfür könnten die vergleichsweise kleineren Zellgrößen der iRECs sein: *Pkd1*-Knockout iRECs und Kontrollzellen sind insgesamt kleiner als MDCK II Zellen, sodass ein Effekt des *Pkd1*-Knockouts auf die Größe der Kontaktfläche möglicherweise gering ist und hier lediglich in Klon 21 sichtbar wird. Dies könnte anhand einer kleineren Begrenzungsfläche (z.B. 600 μm^2) getestet werden.

Eine veränderte Kontrolle der Zell-Matrix-Adhäsion durch den *Pkd1*-Knockout wurde dennoch in der Analyse des Ausbreitungsverhaltens, welches mittels dem Aspect Ratio (AR) ermittelt wurde, deutlich. Ein Vergleich des Aspect Ratio anhand der Knockout- und Kontroll-Klonen ergab die gleiche Tendenz für alle Klone. Alle *Pkd1*-Knockoutklone bildeten relativ zu den Kontrollklonen auf 700 und 1600 μm^2 eine tendenziell ovalere Form aus. Für Knockoutklon 7 und 21 war der AR auch signifikant größer als der korrespondierenden Kontrollklon (Vgl. 4.3.3). Nigro et al. (2019) zeigten, dass das *Pkd1*-Genprodukt Polycystin I über die Phosphorylierung von Myosin an der Regulation der Zellkontraktibilität beteiligt ist. Es wurde nachgewiesen, dass *Pkd1*-defiziente MEFs (*mouse embryo fibroblasts*) und *Pkd1*-defiziente IMCD-Zellen im Vergleich zu korrespondierenden Kontrollzellen eine erhöhte Kontraktionskapazität aufweisen,

während MDCK II Zellen mit einer Polycystin I-Überexpression eine geringere Kontraktionskapazität als zugehörige Kontrollen zeigen (Nigro et al., 2019).

Dies steht im Einklang mit unseren Beobachtungen, da die Unterschiede im Ausbreitungsverhalten von *Pkd1*-defizienten iREC-Klonen und korrespondierenden Kontrollen eine erhöhte Kontraktilität der *Pkd1*-Knockoutklone nahelegen, die vermutlich durch den Polycystinverlust verursacht wurde.

Zudem ähnelt das Verhalten *Pkd1*-defizienter iRECs dem von *Pkhd1*-defizienter MDCK II Zellen auf kreisförmigen Adhäsionsflächen (Ziegler et al., 2020). Diese bilden auf 700 μm^2 und 1600 μm^2 Adhäsionsflächen auch länglichere Zellformen aus, während Kontrollzellen meistens rund sind. Ziegler et al. (2020) gehen ebenfalls von einer erhöhten Aktomyosin-Kontraktilität Fibrozystin-defizienter MDCK II Zellen aus, da diese neben der länglicheren Zellform signifikant kleinere Zellflächen ausbilden. Nach Behandlung der Zellen mit einem Myosin-Inhibitor (Blebbistatin) sind die Unterschiede in der Zellfläche ausgeglichen (Ziegler et al., 2020). Knockout-Klon 21 zeigt ebenfalls signifikant geringere Zellflächen, sodass ein ähnlicher Zusammenhang zu vermuten ist.

Zusammenfassend beobachteten wir anhand der Adhäsionsanalyse, dass iRECs die räumliche Begrenzung trotz ihrer vergleichsweise kleinen Zellgröße durch eine Adhäsionsfläche von 700 μm^2 wahrnehmen. Um drastischer Effekte zu beobachten, könnte in zukünftigen Arbeiten eine Adhäsionsfläche von 600 μm^2 getestet werden um die laterale Ausbreitung der iRECs noch stärker zu begrenzen. Die Kontrolle der Zell-Matrix-Adhäsion ist in iRECs durch den *Pkd1*-Knockout verändert: *Pkd1*-Knockout-iRECs zeigen im Vergleich zu korrespondierenden Kontrollen eine länglichere Zellform. Zusätzlich deutet der Adhäsionsversuch darauf hin, dass iRECs trotz klonaler Selektion heterogen geblieben sind, was an der variablen Morphologie der Einzelzellen besonders deutlich wird (Vgl. 4.3.1).

5.4. Ausbildung von Sphäroiden durch iRECs

Die Fähigkeit zur Ausbildung von polarisierten Epithelien ist eine charakteristische Eigenschaft der Nierenepithelzellen. Diese Fähigkeit sollte anhand von dreidimensionalen Sphäroiden und der Verteilung von apikalen und basalen Marken an verschiedenen iREC-Klonen untersucht werden. Im Fokus dieser Untersuchung stand die Frage, ob Unterschiede in der Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid zwischen Knockout- und Kontrollklonen beobachtet werden können. Auf Grund der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Erzeugung von Sphäroiden (Vgl. 3.4.1.), können wir diese Frage nicht abschließend beantworten und somit keine belastbaren Aussagen treffen, inwiefern der *Pkd1*-Knockout die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid beeinflusst. Die Parameter, die wir für die Entwicklung eines Protokolls zur reproduzierbareren Ausbildung von dreidimensionalen Sphäroiden verändert haben und die bisher entstandenen Sphäroid-Strukturen geben uns aber einige Hinweise auf die Epithelzeleigenschaften von iRECs.

Auf Grundlage des Protokolls für MDCK II Zellen von Rodriguez-Fraticelli et al. (2012) etablierten wir ein an iRECs angepasstes Protokoll zur Erzeugung von Sphäroiden (Rodríguez Fraticelli et al., 2012). Dieses System lief trotz verschiedener Anpassungen und Modifikationen des Protokolls bis zuletzt nicht zufriedenstellend. Es zeigte sich, dass die Sphäroidbildung durch exogene Stimulation zusätzlich unterstützt werden kann. Diese Beobachtung machten wir sowohl nach erhöhter Zugabe von Matrigel (extrazellulärer Matrix) als auch nach Verwendung eines speziellen renalen Epithelzellmedium, welches unter anderem zusätzliche Hormone und Wachstumsfaktoren enthält. Zudem musste der Fixiervorgang modifiziert werden, da sich die gebildeten Sphäroide von den Adhäsionsflächen lösten und somit keine Färbung und Auswertung möglich war. Fixierungsprobleme dieser Art wurden in unserer Arbeitsgruppe bisher weder bei primären, aus dem Urin isolierten Nierenzellen, noch bei MDCK II Zellen beobachtet. Im Vergleich zu ausdifferenzierten Nierenepithelzellen waren die durch iRECs (Klon 7 und Klon WT) gebildeten Sphäroid-Strukturen außerdem ungewöhnlich. Die Strukturen waren häufig flach und mehr als 50% der gebildeten Strukturen zeigten ein unregelmäßiges Epithel, welches häufig mehrschichtig war oder aus Zellen mit einem sehr schmalen Zytoplasma bestand. Zudem entstanden viele Zellaggregate (Vgl. 3.4.2). Die Unfähigkeit der iRECs ein Lumen auszubilden (Zellaggregate), kann als epithelialer Defekt interpretiert werden. Allerdings scheint dieser unabhängig vom *Pkd1*-Knockout zu sein, da Aggregate in Knockout- und Kontrollklonen gleichermaßen beobachtet wurden.

Die Bemühungen zur Optimierung und Anpassung des Protokolls zeigten uns, dass iRECs unter streng definierten Bedingungen in der 3D-Zellkultur auf mikrostrukturierten Adhäsionschips Sphäroide ausbilden können. Die notwendige Unterstützung zur Sphäroidbildung durch exogene Faktoren sowie die Entstehung von untypischen Sphäroidformen kann jedoch als Hinweis für möglicherweise unzureichende epitheliale Eigenschaften von iRECs, wie z.B. die Expression von Adhäsionsrezeptoren, E-Cadherin, Claudine und auch Polaritätskomplexen, sowie extrazellulärer Matrix, interpretiert werden. Dieser Mangel könnte eine Konsequenz der direkten Reprogrammierung sein und andeuten, dass iRECs Eigenschaften der Ursprungszelle (Fibroblast) beibehalten.

Die Ergebnisse der Sphäroidbildung auf mikrostrukturierten Adhäsionsflächen stehen im Kontrast zu Beobachtungen der Arbeitsgruppe Lienkamp an Wildtyp iRECs (Klon WT) im Matrigel. Der Klon WT bildet in deren Versuchen Sphäroide mit zentralem Lumen und einer apiko-basalen Polarität aus (Kaminski et al., 2016). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Sphäroidbildung durch exogene Faktoren, wie z.B. durch eine Einbettung in Matrigel (extrazelluläre Matrix) unterstützt werden muss, da iRECs vermutlich weniger extrazelluläre Matrix als herkömmliche Nierenepithelzellen produzieren oder vorhanden extrazelluläre Matrix schlechter bearbeiten können. Im Vergleich zu einer kompletten Einbettung der Sphäroide in Matrigel bietet die Verwendung von mikrostrukturierten Oberflächen aber mehrere Vorteile:

Neben definierten Startbedingungen (ein bis zwei Zellen pro Adhäsionsfläche) und einer definierten Zellmatrix (Kollagen) ermöglichen mikrostrukturierte Adhäsionschips hochauflösende Aufnahmen und eine systematische Auswertung (durch das gleichmäßige Muster der Chips).

Mögliche Polaritätsdefekte des Epithels durch den *Pkd1*-Verlust, die in ADPKD-Epithelien beschrieben wurden (Wilson, Patricia, 2011, Wilson, P. D., 1997), konnten in unserem Sphäroid-Modell an iRECs bisher nicht analysiert werden, da zunächst die Reproduzierbarkeit der Ausbildung von Sphäroiden durch iRECs im Fokus stand. Wie bereits erwähnt bildeten *Pkhd1*-defiziente MDCK II Zellen in vorausgegangenen Sphäroidversuchen vermehrt inverse Sphäroide aus, was eine Störung der Verarbeitung von Adhäsionsignalen, durch eine reduzierte Fibrozytin-Expression andeutet (Ziegler et al., 2020). Das *Pkd1*-Genprodukt Polycystin I ist direkt an der Regulation der zellulären Aktomyosin-Kontraktilität beteiligt (Nigro et al., 2019). Wir erwarteten daher, dass eine fehlende Polycystin I Funktion durch den *Pkd1*-Knockout ebenfalls die epitheliale Morphogenese von iRECs in 3D-Zellkultur beeinflusst. Diese Annahme können wir anhand der bisher erzielten Ergebnisse nicht bestätigen, aber auch nicht widerlegen.

In dieser Untersuchung der Sphäroidbildung ist die Fähigkeit zur Ausbildung dreidimensionaler Sphäroide mit Lumen im verwendeten *Pkd1*-Knockoutklon verglichen mit dem korrespondierenden Kontrollklon erhöht. Dies steht im Gegensatz zu unserer Erwartung, allerdings müssen hier auch Limitationen der Bewertung der Sphäroide berücksichtigt werden. Die wenigen vorhandenen Sphäroide wurden nur von einer Person kategorisiert. Zudem konnten auch nur Quadranten des Chips ausgewertet werden, auf denen nach Fixierung noch ausreichend Strukturen vorhanden waren. Inwiefern Aggregate im Vergleich zu Sphäroiden mit großem Lumen besser fixiert werden können, bleibt unbeantwortet und könnte das Ergebnis maßgeblich beeinflusst haben. Zudem berücksichtigt diese Auswertung nicht, inwiefern es sich um Sphäroide mit einer apikobasaler Polarität handelt. Als weitere Limitation dieser ersten Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass sich in der iREC Population auch ca. 15% sehr kleine Zellen befinden (Vgl. 4.3.1). Diese Zellen könnten ebenfalls das Verhalten der Zellpopulation beeinflussen oder zum Beispiel für die vermehrte Bildung von sehr flachen Sphäroiden oder Zellaggregaten verantwortlich sein.

In künftigen Untersuchungen der Sphäroidbildung durch iRECs sollte die Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Fokus stehen. Dabei wäre ein Antikörper zur Detektion der Natrium-/Kalium-ATPase sinnvoll, für welche eine geänderte Lokalisation in PKD-Epithelzellen beschrieben wurde (Wilson, P. D. et al., 1991). Die Fehllokalisierung dieses Kanals ist von besonderer Bedeutung, da dieser vermutlich eine abnormale Sekretion von Natrium-Ionen ins Lumen der Zysten bewirkt und der Kanal daher an der Ausbildung von flüssigkeitsgefüllten Zysten beteiligt sein kann (Wilson, P. D. et al., 1991). Zudem sollte

ausgetestet werden, wodurch die Bildung mehrschichtige Epithelien im Sphäroid unterdrückt werden kann, da an diesen Sphäroiden keine Polaritätsanalyse möglich ist.

Hinsichtlich der Fähigkeit zur Ausbildung eines polarisierten Epithels im Sphäroid können die Ergebnisse dieser Arbeit als Vorarbeiten zur Evaluation der Zelleigenschaften gewertet werden. Da das System auch nach gezielter Optimierung des Protokolls nicht reproduzierbar stabil lief, sollte zudem in Frage gestellt werden, inwiefern iRECs zur Ausbildung von Sphäroiden auf mikrostrukturierter Oberfläche geeignet sind, zumal die Ausbeute an geeigneten Sphäroiden sehr gering blieb.

5.5. Fazit und Ausblick

Im Vergleich zu primären Zellen bieten iRECs durch eine schnelle Verfügbarkeit großer Zellmengen, eine definierte Genetik und durch ihre große Ähnlichkeit zu natürlichen Nierenepithelzellen viele geeignete Charakteristiken, die zur Erforschung von genetisch verursachten Nierenerkrankungen nützlich sind. Einschränkend muss berücksichtigt werden, dass es sich bei iRECs nicht um herkömmliche Nierenepithelzellen handelt, sondern um reprogrammierte Fibroblasten. Sie ähneln Nierenepithelzellen zwar in den zahlreichen Zellcharakteristiken und zeigen sogar ein vergleichbares Stoffwechselprofil, trotzdem sind sie nicht uneingeschränkt gleichzusetzen (Kaminski et al., 2016, Lagies et al., 2018). Beispielsweise besitzen iRECs Eigenschaften von multiple Tubulussegmenten und entsprechen somit einem Zelltyp, der *in vivo* nicht existiert (Kaminski et al., 2016).

Die verwendeten iRECs sind durch direkte Reprogrammierung über kombinierte Expression der vier nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren *Emx2*, *Hnf1b*, *Hnf4a*, *Pax8* entstanden (Kaminski et al., 2016). Bei *Hnf1b* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in der Entwicklung der Nieren eine essenzielle Rolle spielt. *Hnf1b*-assoziierte Erkrankungen (z.B. durch Mutationen) können aber auch mit Zysten in den Nieren einhergehen (Ferre, Igarashi, 2019).

Als Transkriptionsfaktor reguliert *Hnf1b* unter anderem die Expression des *Pkhd1*-Gens und des *Pkd2*-Gens. *Hnf1b*-Mutationen können somit eine verminderte Expression der Proteine Fibrozystin und Polycystin II auslösen, was in der Ausbildung von Nierenzysten resultieren kann (Gresh et al., 2004, Hiesberger et al., 2004). Für die verwendeten iRECs könnte es daher sinnvoll sein, zu überprüfen, in welchem Umfang *Pkd1*-Knockout- und Kontroll-iRECs diese Proteine exprimieren, um auszuschließen, dass eine veränderte Expression anderer PKD-Gene das Verhalten der iREC-Klone beeinflusst.

Nach diesen ersten Untersuchungen der Epithelzeleigenschaften an drei *Pkd1*-Knockout-Klonen sowie den spezifischen Kontrollen muss das Konzept einer Verwendung von iRECs als Zellmodell zur Erforschung genetisch verursachter Epithelzelldefekte bei ADPKD weiter kritisch geprüft werden. Insbesondere, da die iREC-Klone doch eher begrenzte epitheliale Eigenschaften anzeigen. Weiterhin zeigt die Analyse der Klone, dass die Zellpopulationen trotz

klonaler Selektion heterogen geblieben sind. Dies wird einerseits an der Morphologie und Größenverteilung der Einzelzellen, aber auch am Zellverhalten der iRECs in 3D-Zellkultur deutlich.

Die Untersuchungen von drei Klonpaaren sind möglicherweise nicht ausreichend, um eine abschließende Beurteilung zu erlauben. Vor allem die Prüfung der Ausbildung polarisierter dreidimensionaler Epithelstrukturen, welche zur Untersuchung von Epithelzeleigenschaften am besten geeignet wäre, ist auf Grund von diversen Schwierigkeiten bei der Generierung von Sphäroiden ausstehend. Die verfügbaren Ergebnisse können somit lediglich erste Anhaltspunkte liefern. Das hier erarbeitete Protokoll zur Generierung von Sphäroiden erlaubt trotz verschiedener Optimierungen noch keine reproduzierbare Ausbildung von Sphäroiden. Ob weitere Anpassungen des Protokolls dieses verbessern, oder ob die epithelialen Eigenschaften von iRECs insgesamt nicht ausreichend sind, um auf mikrostrukturierten Oberflächen eine Analyse der Ausbildung polarisierter Epithelien zu erlauben, ist Gegenstand weiterer Forschung.

Zudem handelt es sich bei iRECs um Zellen, die Tubuluszellen in der Mausniere ähneln. Die Reprogrammierung von humanen Fibroblasten wurde ebenfalls getestet und führte in ersten Analysen zu Zellen mit einer vergleichbaren epithelialen Morphologie wie murine iRECs. Durch die Reprogrammierung von Fibroblasten betroffener Patienten könnte in Zukunft ein humanes *in-vitro*-Zellmodell mit Patienten spezifischen genetischen Hintergrund etabliert werden, welche die Perspektive eröffnen würde, charakteristische epitheliale Veränderungen im Patienten besser zu verstehen und spezifische Medikamente an diesem zu testen (Kaminski et al., 2016).

6 Zusammenfassung

Die autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) ist eine genetische Nierenerkrankung des Menschen, die meistens durch Mutationen im *PKD1*-Gen verursacht wird und durch eine starke Vergrößerung der Nieren mit Ausbildung flüssigkeitsgefüllter Zysten gekennzeichnet ist. Sie geht mit einem progressiven Verlust der Nierenfunktion einher und kann zu terminaler Niereninsuffizienz führen.

Zur Erforschung genetisch verursachter Nierenerkrankungen wie der ADPKD sollen induzierte renale Epithelzellen (iRECs) einen neuen experimentellen Zugang ermöglichen. In dieser Arbeit wurden erstmals murine iRECs mit selektivem Verlust des *Pkd1*-Gens, als Modell für die polyzystische Nierenerkrankung ADPKD, getestet.

iRECs werden direkt aus embryonalen Fibroblasten durch Expression von vier nierenspezifischen Transkriptionsfaktoren erzeugt. Aus Fibroblasten transgener Mäuse mit gefloxtem *Pkd1*-Allel entstehen durch Behandlung mit Cre- (Knockout) bzw. Flipase-Viren (Kontrolle) iREC-Klone mit und ohne *Pkd1*-Gendefekt. Alle verwendeten iREC-Klone wurden von Dr. Roman Pichler aus Freiburg (Universitätsklinik Freiburg) erstellt und uns zur Testung zur Verfügung gestellt.

Anhand des direkten Vergleiches von identischen iREC-Zellklonen mit und ohne *Pkd1*-Knockout wurde die Fähigkeit zur Ausbildung funktionaler Epithelstrukturen sowie deren Störung durch einen selektiven Verlust des *Pkd1*-Gens untersucht. Die Ergebnisse ermöglichen eine erste Einschätzung, inwiefern iRECs als Zellmodell zur *in vitro* Untersuchung von genetisch verursachten, zellautonomen Nierenepitheldefekten geeignet sein können.

Als Maß für die epithelialen Eigenschaften von iRECs wurden die Proliferation, die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten und das Verhalten in 3D-Kultur untersucht. Die Populationsverdopplungszeiten in wachsender Kultur wurden in einem metabolischen Test ermittelt und über Impedanz-basierte Messungen kontrolliert. *Pkd1*-defiziente iRECs zeigten in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Proliferationsunterschiede zu korrespondierenden Kontrollzellen. Die Zellmatrix-Interaktion von Einzelzellen wurde über eine Fluoreszenzfärbung des Strukturproteins Vinculin auf mikrostrukturierten Adhäsionschips analysiert. In dieser Ein-Zell-Adhäsion wurde deutlich, dass die Morphologie der Zellen trotz klonaler Selektion und extrem kontrollierten Bedingungen insgesamt sehr heterogen ist. Anhand des Ausbreitungsverhalten der Zellen auf kreisförmiger Adhäsionsfläche wurde nachgewiesen, dass die Kontrolle der Zell-Matrix-Adhäsion durch den *Pkd1*-Knockout beeinflusst wird. Im Vergleich zu korrespondierenden Kontrollen bilden *Pkd1*-defiziente iRECs auf kreisförmiger Adhäsionsfläche eine eher langgestreckte Zellform aus, was eine veränderte Kontrolle der Zelladhäsion und -ausbreitung der Knockout-Zellen nahelegt.

Die Fähigkeit der iRECs ein korrekt polarisiertes Epithel auszubilden, kann in der 3D-Zellkultur besonders gut anhand von Sphäroiden beurteilt werden. Für die 3D-Zellkultur musste

zunächst ein Protokoll zur reproduzierbaren Ausbildung dreidimensionaler Strukturen etabliert werden. Dieses System lief - trotz unterschiedlicher Strategien zur Optimierung - bis zuletzt nicht wirklich zufriedenstellend. Unter streng definierten Bedingungen bilden iRECs nach 5 Tagen auf mikrostrukturierten Oberflächen Sphäroid-Strukturen aus. Diese waren im Vergleich zu Sphäroiden ausdifferenzierter Nierenepithelzellen häufiger strukturell auffällig. Wiederholt entstanden Aggregate und Strukturen, die ein unregelmäßiges, häufig mehrschichtiges Epithel aufwiesen. Die Unterstützung der Sphäroidbildung durch exogene Faktoren und die Entstehung untypischer Sphäroid-Strukturen weisen auf möglicherweise limitierte epitheliale Eigenschaften der iRECs hin.

Insgesamt liefert die Testung der *Pkd1*-defizienten iREC-Klonen und korrespondierenden Kontrollen eine erste Einschätzung der Zellcharakteristik und Epithel Eigenschaften von murinen iRECs. Die Ergebnisse liefern Hinweise, dass das Zellmodell der iRECs zur Untersuchung genetisch verursachter, zellautonomer Epithelzelldefekte nur eingeschränkt geeignet sein könnte. Dies sollte weiter kritisch geprüft werden, da die bisher durchgeführten Untersuchungen es nicht erlauben, eine abschließende Beurteilung vorzunehmen. Insbesondere steht die Beurteilung der Fähigkeit zur Ausbildung von polarisierten dreidimensionalen Epithelstrukturen durch murine iRECs aus. Eine Aussage über die möglicherweise gestörte Polarität der gebildeten Epithelien war bisher nicht möglich und sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Die erzielten Ergebnisse dienen als wichtige Grundlage für zukünftige Prüfungen des Zellmodells der iRECs.

7 Literaturverzeichnis

- ACEA Biosciences Inc., *xCELLigence RTCA DP; Technology Overview, Cellular Impedance Explained*. Available: <https://www.aceabio.com/products/rtca-dp/> [2019, October].
- Aihara, M., Fujiki, H., Mizuguchi, H., Hattori, K., Ohmoto, K., Ishikawa, M., Nagano, K. & Yamamura, Y. 2014, "Tolvaptan delays the onset of end-stage renal disease in a polycystic kidney disease model by suppressing increases in kidney volume and renal injury.", *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 349, no. 2, pp. 258-267.
- Bae, K., Zhu, F., Chapman, A., Torres, V., Grantham, J., Guay Woodford, L., Baumgarten, D., King, B., Wetzel, L., Kenney, P., Brummer, M., Bennett, W., Klahr, S., Meyers, C., Zhang, X., Thompson, P. & Miller, J.P. 2006, "Magnetic resonance imaging evaluation of hepatic cysts in early autosomal-dominant polycystic kidney disease: the Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease cohort.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 1, no. 1, pp. 64-69.
- Bajwa, Z., Sial, K., Malik, A. & Steinman, T. 2004, "Pain patterns in patients with polycystic kidney disease.", *Kidney international*, vol. 66, no. 4, pp. 1561-1569.
- Belibi, F., Reif, G., Wallace, D., Yamaguchi, T., Olsen, L., Li, H., Helmkamp, G. & Grantham, J. 2004, "Cyclic AMP promotes growth and secretion in human polycystic kidney epithelial cells.", *Kidney international*, vol. 66, no. 3, pp. 964-973.
- Bergmann, C. 2019, "Early and Severe Polycystic Kidney Disease and Related Ciliopathies: An Emerging Field of Interest", *Nephron*, vol. 141, no. 1, pp. 50-60.
- Bergmann, C., von Bothmer, J., Ortiz Bröchle, N., Venghaus, A., Frank, V., Fehrenbach, H., Hampel, T., Pape, L., Buske, A., Jonsson, J., Sarioglu, N., Santos, A., Ferreira, J., Becker, J., Cremer, R., Hoefele, J., Benz, M., Weber, L., Buettner, R. & Zerres, K. 2011, "Mutations in multiple PKD genes may explain early and severe polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 22, no. 11, pp. 2047-2056.
- Bergmann, C. 2015, "ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies.", *Pediatric Nephrology*, vol. 30, no. 1, pp. 15-30.
- Boertien, W., Meijer, E., Zittema, D., van Dijk, M., Rabelink, T., Breuning, M., Struck, J., Bakker, S.J.L., Peters, D.J.M., de Jong, P. & Gansevoort, R. 2012, "Copeptin, a surrogate marker for vasopressin, is associated with kidney function decline in subjects with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Nephrology, dialysis, transplantation*, vol. 27, no. 11, pp. 4131-4137.
- Brasier, J.L. & Henske, E.P. 1997, "Loss of the polycystic kidney disease (PKD1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis.", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 2, pp. 194-199.
- Burn, T.C., Connors, T.D., Dackowski, W.R., Petry, L.R., Van Raay, T.J., Millholland, J.M., Venet, M., Miller, G., Hakim, R.M. & Landes, G.M. 1995, "Analysis of the genomic sequence for the autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) gene predicts the presence of a leucine-rich repeat. The American PKD1 Consortium (APKD1 Consortium).", *Human molecular genetics*, vol. 4, no. 4, pp. 575-582.

- Cadnapaphornchai, M., Masoumi, A., Strain, J., McFann, K. & Schrier, R. 2011, "Magnetic resonance imaging of kidney and cyst volume in children with ADPKD.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 6, no. 2, pp. 369-376.
- Cadnapaphornchai, M., McFann, K., Strain, J., Masoumi, A. & Schrier, R. 2008, "Increased left ventricular mass in children with autosomal dominant polycystic kidney disease and borderline hypertension.", *Kidney international*, vol. 74, no. 9, pp. 1192-1196.
- Cagnazzo, F., Gambacciani, C., Morganti, R. & Perrini, P. 2017, "Intracranial aneurysms in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: prevalence, risk of rupture, and management. A systematic review.", *Acta neurochirurgica : the European journal of neurosurgery*, vol. 159, no. 5, pp. 811-821.
- Cai, Y., Maeda, Y., Cedzich, A., Torres, V.E., Wu, G., Hayashi, T., Mochizuki, T., Park, J.H., Witzgall, R. & Somlo, S. 1999, "Identification and characterization of polycystin-2, the PKD2 gene product.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 40, pp. 28557-28565.
- Candiano, G., Gusmano, R., Altieri, P., Bertelli, R., Ginevri, F., Coviello, D.A., Sessa, A., Caridi, G. & Ghiggeri, G.M. 1992, "Extracellular matrix formation by epithelial cells from human polycystic kidney cysts in culture.", *Virchows Archiv.B.Cell pathology*, vol. 63, no. 1, pp. 1-9.
- Carone, F.A., Nakamura, S., Schumacher, B.S., Punyarit, P. & Bauer, K.D. 1989, "Cyst-derived cells do not exhibit accelerated growth or features of transformed cells in vitro.", *Kidney international*, vol. 35, no. 6, pp. 1351-1357.
- Chabardès, D., Imbert Teboul, M. & Elalouf, J.M. 1999, "Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content.", *Cellular signalling*, vol. 11, no. 9, pp. 651-663.
- Chapman, A., Guay Woodford, L., Grantham, J., Torres, V., Bae, K., Baumgarten, D., Kenney, P., King, B., Glockner, J., Wetzel, L., Brummer, M., O'Neill, W.C., Robbin, M., Bennett, W., Klahr, S., Hirschman, G., Kimmel, P., Thompson, P. & Miller, J.P. 2003, "Renal structure in early autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD): The Consortium for Radiologic Imaging Studies of Polycystic Kidney Disease (CRISP) cohort.", *Kidney international*, vol. 64, no. 3, pp. 1035-1045.
- Chapman, A.B., Johnson, A.M., Ranguet, S., Hossack, K., Gabow, P. & Schrier, R.W. 1997, "Left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease", *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, vol. 8, no. 8, pp. 1292-1297.
- Cornec-Le Gall, E., Audrézet, M., Chen, J., Hourmant, M., Morin, M., Perrichot, R., Charasse, C., Whebe, B., Renaudineau, E., Jousset, P., Guillodo, M., Grall Jezequel, A., Saliou, P., Férec, C. & Le Meur, Y. 2013, "Type of PKD1 mutation influences renal outcome in ADPKD.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 24, no. 6, pp. 1006-1013.
- Cuppige, F.E., Huseman, R.A., Chapman, A. & Grantham, J.J. 1980, "Ultrastructure and function of cysts from human adult polycystic kidneys.", *Kidney international*, vol. 17, no. 3, pp. 372-381.
- Dalgaard, O. 1957, "Bilateral polycystic disease of the kidneys: a follow-up of two hundred and eighty-four patients and their families.", *Acta medica Scandinavica.Supplementum*, vol. 328, pp. 1-255.

- Davidow, C.J., Maser, R.L., Rome, L.A., Calvet, J.P. & Grantham, J.J. 1996, "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mediates transepithelial fluid secretion by human autosomal dominant polycystic kidney disease epithelium in vitro.", *Kidney international*, vol. 50, no. 1, pp. 208-218.
- Davies, F., Coles, G.A., Harper, P.S., Williams, A.J., Evans, C. & Cochlin, D. 1991, "Polycystic kidney disease re-evaluated: a population-based study.", *Quarterly journal of medicine*, vol. 79, no. 290, pp. 477-485.
- De Rechter, S., Breyssem, L. & Mekahli, D. 2017, "Is Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Becoming a Pediatric Disorder?", *Frontiers in Pediatrics*, vol. 5, pp. 272-272.
- Delling, M., Indzhykulian, A.A., Liu, X., Li, Y., Xie, T., Corey, D.P. & Clapham, D.E. 2016, "Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors.", *Nature*, vol. 531, no. 7596, pp. 656-660.
- Devuyst, O. & Torres, V. 2013, "Osmoregulation, vasopressin, and cAMP signaling in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Current opinion in nephrology and hypertension*, vol. 22, no. 4, pp. 459-470.
- Dittrich, S., Kaminski, M., Lienkamp, S., Benzing, T., Höhne, M., Scherner, B. & Rinschen, M.M. 2017, *Quantitative Proteomanalyse von induzierten renalen tubulären Epithelialzellen (Poster)*, 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Mannheim.
- Du, J. & Wilson, P.D. 1995, "Abnormal polarization of EGF receptors and autocrine stimulation of cyst epithelial growth in human ADPKD.", *American Journal of Physiology*, vol. 269, no. 2, pp. C487-C495.
- Edelstein, C. 2005, "What is the role of tubular epithelial cell apoptosis in polycystic kidney disease (PKD)?", *Cell cycle*, vol. 4, no. 11, pp. 1550-1554.
- European Medicines Agency 2018, *Jinarc (tolvaptan), An overview of Jinarc and why it is authorised in the EU*. Available: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/jinarc-epar-medicine-overview_en.pdf [2019, October].
- Evan, A.P., Gardner, K.D. & Bernstein, J. 1979, "Polypoid and papillary epithelial hyperplasia: a potential cause of ductal obstruction in adult polycystic disease.", *Kidney international*, vol. 16, no. 6, pp. 743-750.
- Ferre, S. & Igarashi, P. 2019, "New insights into the role of HNF-1beta in kidney (patho)physiology", *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, vol. 34, no. 8, pp. 1325-1335.
- Fick Brosnahan, G.M., Tran, Z.V., Johnson, A.M., Strain, J.D. & Gabow, P.A. 2001, "Progression of autosomal-dominant polycystic kidney disease in children.", *Kidney international*, vol. 59, no. 5, pp. 1654-1662.
- Fick Brosnahan, G., Belz, M., McFann, K., Johnson, A. & Schrier, R. 2002, "Relationship between renal volume growth and renal function in autosomal dominant polycystic kidney disease: a longitudinal study.", *American journal of kidney diseases*, vol. 39, no. 6, pp. 1127-1134.

- Fick, G.M., Johnson, A.M., Hammond, W.S. & Gabow, P.A. 1995, "Causes of death in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 12, pp. 2048-2056.
- Fick, G.M., Johnson, A.M., Strain, J.D., Kimberling, W.J., Kumar, S., Manco Johnson, M.L., Duley, I.T. & Gabow, P.A. 1993, "Characteristics of very early onset autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 12, pp. 1863-1870.
- Gabow, P.A., Johnson, A.M., Kaehny, W.D., Kimberling, W.J., Lezotte, D.C., Duley, I.T. & Jones, R.H. 1992, "Factors affecting the progression of renal disease in autosomal-dominant polycystic kidney disease.", *Kidney international*, vol. 41, no. 5, pp. 1311-1319.
- Gabow, P.A., Johnson, A.M., Kaehny, W.D., Manco Johnson, M.L., Duley, I.T. & Everson, G.T. 1990, "Risk factors for the development of hepatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 11, no. 6, pp. 1033-1037.
- Gabow, P.A., Kaehny, W.D., Johnson, A.M., Duley, I.T., Manco Johnson, M., Lezotte, D.C. & Schrier, R.W. 1989, "The clinical utility of renal concentrating capacity in polycystic kidney disease.", *Kidney international*, vol. 35, no. 2, pp. 675-680.
- Gattone, V., Wang, X., Harris, P. & Torres, V. 2003, "Inhibition of renal cystic disease development and progression by a vasopressin V2 receptor antagonist.", *Nature medicine*, vol. 9, no. 10, pp. 1323-1326.
- Geng, L., Segal, Y., Peissel, B., Deng, N., Pei, Y., Carone, F., Rennke, H.G., Glücksmann Kuis, A.M., Schneider, M.C., Ericsson, M., Reeders, S.T. & Zhou, J. 1996, "Identification and localization of polycystin, the PKD1 gene product.", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, no. 12, pp. 2674-2682.
- Goilav, B. 2011, "Apoptosis in polycystic kidney disease.", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1812, no. 10, pp. 1272-1280.
- González Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A.E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P.C., Reisin, I.L., Arnaout, M.A. & Cantiello, H.F. 2001, "Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 3, pp. 1182-1187.
- Grantham, J.J., Geiser, J.L. & Evan, A.P. 1987, "Cyst formation and growth in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Kidney international*, vol. 31, no. 5, pp. 1145-1152.
- Grantham, J.J., Ye, M., Gattone, V.H. & Sullivan, L.P. 1995, "In vitro fluid secretion by epithelium from polycystic kidneys.", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 95, no. 1, pp. 195-202.
- Grantham, J., Cook, L., Wetzel, L., Cadnapaphornchai, M. & Bae, K. 2010, "Evidence of extraordinary growth in the progressive enlargement of renal cysts.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 5, pp. 889-896.
- Grantham, J., Torres, V., Chapman, A., Guay Woodford, L., Bae, K., King, B., Wetzel, L., Baumgarten, D., Kenney, P., Harris, P., Klahr, S., Bennett, W., Hirschman, G., Meyers, C., Zhang, X., Zhu, F. & Miller, J. 2006, "Volume progression in polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 354, no. 20, pp. 2122-2130.

- Grantham, J. 2015, "Rationale for early treatment of polycystic kidney disease.", *Pediatric nephrology*, vol. 30, no. 7, pp. 1053-1062.
- Gresh, L., Fischer, E., Reimann, A., Tanguy, M., Garbay, S., Shao, X., Hiesberger, T., Fiette, L., Igarashi, P., Yaniv, M. & Pontoglio, M. 2004, "A transcriptional network in polycystic kidney disease", *The EMBO journal*, vol. 23, no. 7, pp. 1657-1668.
- Guay Woodford, L. 2003, "Murine models of polycystic kidney disease: molecular and therapeutic insights.", *American journal of physiology. Renal physiology*, vol. 285, no. 6, pp. F1034-F1049.
- Hanaoka, K., Devuyst, O., Schwiebert, E.M., Wilson, P.D. & Guggino, W.B. 1996, "A role for CFTR in human autosomal dominant polycystic kidney disease.", *American Journal of Physiology*, vol. 270, no. 1, pp. C389-C399.
- Hanaoka, K. & Guggino, W.B. 2000, "cAMP regulates cell proliferation and cyst formation in autosomal polycystic kidney disease cells.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 11, no. 7, pp. 1179-1187.
- Happé, H. & Peters, D.J.M. 2014, "Translational research in ADPKD: lessons from animal models.", *Nature Reviews Nephrology*, vol. 10, no. 10, pp. 587-601.
- Harris, P., Bae, K., Rossetti, S., Torres, V., Grantham, J., Chapman, A., Guay Woodford, L., King, B., Wetzel, L., Baumgarten, D., Kenney, P., Consugar, M., Klahr, S., Bennett, W., Meyers, C., Zhang, Q., Thompson, P., Zhu, F. & Miller, J.P. 2006, "Cyst number but not the rate of cystic growth is associated with the mutated gene in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 11, pp. 3013-3019.
- Harris, P. 2010, "What is the role of somatic mutation in autosomal dominant polycystic kidney disease?", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 7, pp. 1073-1076.
- Hartz, P.A. & Wilson, P.D. 1997, "Functional defects in lysosomal enzymes in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD): abnormalities in synthesis, molecular processing, polarity, and secretion.", *Biochemical and molecular medicine*, vol. 60, no. 1, pp. 8-26.
- Hayashi, T., Mochizuki, T., Reynolds, D.M., Wu, G., Cai, Y. & Somlo, S. 1997, "Characterization of the exon structure of the polycystic kidney disease 2 gene (PKD2).", *Genomics*, vol. 44, no. 1, pp. 131-136.
- Héliès Toussaint, C., Aarab, L., Gasc, J.M., Verbavatz, J.M. & Chabardès, D. 2000, "Cellular localization of type 5 and type 6 ACs in collecting duct and regulation of cAMP synthesis.", *AJP-Renal Physiology*, vol. 279, no. 1, pp. F185-F194.
- Hiesberger, T., Bai, Y., Shao, X., McNally, B.T., Sinclair, A.M., Tian, X., Somlo, S. & Igarashi, P. 2004, "Mutation of hepatocyte nuclear factor-1beta inhibits Pkhd1 gene expression and produces renal cysts in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 113, no. 6, pp. 814-825.
- Higashihara, E., Nutahara, K., Kojima, M., Tamakoshi, A., Yoshiyuki, O., Sakai, H. & Kurokawa, K. 1998, "Prevalence and renal prognosis of diagnosed autosomal dominant polycystic kidney disease in Japan.", *The Nephron journals*, vol. 80, no. 4, pp. 421-427.

- Hildebrandt, F., Benzing, T. & Katsanis, N. 2011, "Ciliopathies.", *The New England journal of medicine*, vol. 364, no. 16, pp. 1533-1543.
- Hoffmeister, H., Gallagher, A., Rascle, A. & Witzgall, R. 2011, "The human polycystin-2 protein represents an integral membrane protein with six membrane-spanning domains and intracellular N- and C-termini.", *Biochemical Journal (1984)*, vol. 433, no. 2, pp. 285-294.
- Hopp, K., Hommerding, C., Wang, X., Ye, H., Harris, P. & Torres, V. 2015, "Tolvaptan plus pasireotide shows enhanced efficacy in a PKD1 model.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 26, no. 1, pp. 39-47.
- Hopp, K., Ward, C., Hommerding, C., Nasr, S., Tuan, H., Gainullin, V., Rossetti, S., Torres, V. & Harris, P. 2012, "Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity.", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 11, pp. 4257-4273.
- Hossack, K.F., Leddy, C.L., Johnson, A.M., Schrier, R.W. & Gabow, P.A. 1988, "Echocardiographic findings in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 319, no. 14, pp. 907-912.
- Huan, Y. & van Adelsberg, J. 1999, "Polycystin-1, the PKD1 gene product, is in a complex containing E-cadherin and the catenins.", *Journal of Clinical Investigation*, vol. 104, no. 10, pp. 1459-1468.
- Hughes, J., Ward, C.J., Peral, B., Aspinwall, R., Clark, K., San Millán, J.L., Gamble, V. & Harris, P.C. 1995, "The polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene encodes a novel protein with multiple cell recognition domains.", *Nature genetics*, vol. 10, no. 2, pp. 151-160.
- Ibraghimov Beskrovnaya, O., Dackowski, W.R., Foggensteiner, L., Coleman, N., Thiru, S., Petry, L.R., Burn, T.C., Connors, T.D., Van Raay, T., Bradley, J., Qian, F., Onuchic, L.F., Watnick, T.J., Piontek, K., Hakim, R.M., Landes, G.M., Germino, G.G., Sandford, R. & Klinger, K.W. 1997, "Polycystin: in vitro synthesis, in vivo tissue expression, and subcellular localization identifies a large membrane-associated protein.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 12, pp. 6397-6402.
- Iglesias, C.G., Torres, V.E., Offord, K.P., Holley, K.E., Beard, C.M. & Kurland, L.T. 1983, "Epidemiology of adult polycystic kidney disease, Olmsted County, Minnesota: 1935-1980.", *American journal of kidney diseases*, vol. 2, no. 6, pp. 630-639.
- Iliuta, I., Kalatharan, V., Wang, K., Cornec-Le Gall, E., Conklin, J., Pourafkari, M., Ting, R., Chen, C., Borgo, A., He, N., Song, X., Heyer, C., Senum, S., Hwang, Y., Paterson, A., Harris, P., Khalili, K. & Pei, Y. 2017, "Polycystic Kidney Disease without an Apparent Family History.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 28, no. 9, pp. 2768-2776.
- Ivy, D.D., Shaffer, E.M., Johnson, A.M., Kimberling, W.J., Dobin, A. & Gabow, P.A. 1995, "Cardiovascular abnormalities in children with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 12, pp. 2032-2036.
- Joly, D., Morel, V., Hummel, A., Ruello, A., Nusbaum, P., Patey, N., Noël, L., Rousselle, P. & Knebelmann, B. 2003, "Beta4 integrin and laminin 5 are aberrantly expressed in polycystic kidney disease: role in increased cell adhesion and migration.", *The American journal of pathology*, vol. 163, no. 5, pp. 1791-1800.

- Kaminski, M., Tomic, J., Kresbach, C., Engel, H., Klockenbusch, J., Müller, A., Pichler, R., Grahammer, F., Kretz, O., Huber, T., Walz, G., Arnold, S. & Lienkamp, S. 2016, "Direct reprogramming of fibroblasts into renal tubular epithelial cells by defined transcription factors.", *Nature cell biology*, vol. 18, no. 12, pp. 1269-1280.
- Katz, S.K., Hakki, A., Miller, A.S. & Finkelstein, S.D. 1989, "Ultrastructural tubular basement membrane lesions in adult polycystic kidney disease.", *Annals of clinical & laboratory science*, vol. 19, no. 5, pp. 352-359.
- Kelley, K.A., Agarwal, N., Reeders, S. & Herrup, K. 1991, "Renal cyst formation and multifocal neoplasia in transgenic mice carrying the simian virus 40 early region.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 2, no. 1, pp. 84-97.
- Kim, J., Blumenfeld, J., Chhabra, S., Dutruel, S., Thimmappa, N., Bobb, W., Donahue, S., Rennert, H., Tan, A., Giambone, A. & Prince, M. 2016, "Pancreatic Cysts in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease: Prevalence and Association with PKD2 Gene Mutations.", *Radiology*, vol. 280, no. 3, pp. 762-770.
- Kimberling, W.J., Fain, P.R., Kenyon, J.B., Goldgar, D., Sujansky, E. & Gabow, P.A. 1988, "Linkage heterogeneity of autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 319, no. 14, pp. 913-918.
- Kimberling, W.J., Kumar, S., Gabow, P.A., Kenyon, J.B., Connolly, C.J. & Somlo, S. 1993, "Autosomal dominant polycystic kidney disease: localization of the second gene to chromosome 4q13-q23.", *Genomics*, vol. 18, no. 3, pp. 467-472.
- Koulen, P., Cai, Y., Geng, L., Maeda, Y., Nishimura, S., Witzgall, R., Ehrlich, B. & Somlo, S. 2002, "Polycystin-2 is an intracellular calcium release channel.", *Nature cell biology*, vol. 4, no. 3, pp. 191-197.
- Kusano, E., Murayama, N., Werness, J.L., Christensen, S., Homma, S., Yusufi, A.N. & Dousa, T.P. 1985, "Effects of calcium on the vasopressin-sensitive cAMP metabolism in medullary tubules.", *American Journal of Physiology*, vol. 249, no. 6, pp. F956-F966.
- Lagies, S., Pichler, R., Kaminski, M., Schlimpert, M., Walz, G., Lienkamp, S. & Kammerer, B. 2018, "Metabolic characterization of directly reprogrammed renal tubular epithelial cells (iRECs).", *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, pp. 3878-3878.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Dauwerse, J., Baelde, H., Leonhard, W., van de Wal, A., Ward, C., Verbeek, S., Deruiter, M., Breuning, M., de Heer, E. & Peters, D.J.M. 2004, "Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease.", *Human molecular genetics*, vol. 13, no. 24, pp. 3069-3077.
- Lantinga-van Leeuwen, I.S., Leonhard, W., van der Wal, A., Breuning, M., de Heer, E. & Peters, D.J.M. 2007, "Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice.", *Human molecular genetics*, vol. 16, no. 24, pp. 3188-3196.
- Lederman, E.D., McCoy, G., Conti, D.J. & Lee, E.C. 2000, "Diverticulitis and polycystic kidney disease.", *The American Surgeon*, vol. 66, no. 2, pp. 200-203.
- Liebau, M. & Haffner, D. 2015, "Zystennieren im Kindesalter.", *Monatsschrift Kinderheilkunde*, vol. 163, pp. 343-351.

- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A., Goldstein, L.S.B., Somlo, S. & Igarashi, P. 2003, "Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 9, pp. 5286-5291.
- Lo, S.H., Yu, Q.C., Degenstein, L., Chen, L.B. & Fuchs, E. 1997, "Progressive kidney degeneration in mice lacking tensin.", *The Journal of cell biology*, vol. 136, no. 6, pp. 1349-1361.
- Lu, W., Fan, X., Basora, N., Babakhanlou, H., Law, T., Rifai, N., Harris, P.C., Perez Atayde, A.R., Rennke, H.G. & Zhou, J. 1999, "Late onset of renal and hepatic cysts in Pkd1-targeted heterozygotes.", *Nature genetics*, vol. 21, no. 2, pp. 160-161.
- Lu, W., Peissel, B., Babakhanlou, H., Pavlova, A., Geng, L., Fan, X., Larson, C., Brent, G. & Zhou, J. 1997, "Perinatal lethality with kidney and pancreas defects in mice with a targeted Pkd1 mutation.", *Nature genetics*, vol. 17, no. 2, pp. 179-181.
- Lu, W., Shen, X., Pavlova, A., Lakkis, M., Ward, C.J., Pritchard, L., Harris, P.C., Genest, D.R., Perez Atayde, A.R. & Zhou, J. 2001, "Comparison of Pkd1-targeted mutants reveals that loss of polycystin-1 causes cystogenesis and bone defects.", *Human molecular genetics*, vol. 10, no. 21, pp. 2385-2396.
- Lumiaho, A., Ikäheimo, R., Miettinen, R., Niemitukia, L., Laitinen, T., Rantala, A., Lampainen, E., Laakso, M. & Hartikainen, J. 2001, "Mitral valve prolapse and mitral regurgitation are common in patients with polycystic kidney disease type 1.", *American journal of kidney diseases*, vol. 38, no. 6, pp. 1208-1216.
- MacDermot, K.D., Saggat Malik, A.K., Economides, D.L. & Jeffery, S. 1998, "Prenatal diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease (PKD1) presenting in utero and prognosis for very early onset disease.", *Journal of medical genetics (Print)*, vol. 35, no. 1, pp. 13-16.
- Marg, S., Winkler, U., Sestu, M., Himmel, M., Schönherr, M., Bär, J., Mann, A., Moser, M., Mierke, C., Rottner, K., Blessing, M., Hirrlinger, J. & Ziegler, W. 2010, "The vinculin-DeltaIn20/21 mouse: characteristics of a constitutive, actin-binding deficient splice variant of vinculin.", *PLoS ONE*, vol. 5, no. 7, pp. e11530-e11530.
- Marlais, M., Cuthell, O., Langan, D., Dudley, J., Sinha, M. & Winyard, P.J.D. 2016, "Hypertension in autosomal dominant polycystic kidney disease: a meta-analysis.", *Archives of Disease in Childhood*, vol. 101, no. 12, pp. 1142-1147.
- Massella, L., Mekahli, D., Paripovic, D., Prikhodina, L., Godefroid, N., Niemirska, A., Agbas, A., Kalicka, K., Jankauskiene, A., Mizerska Wasiak, M., Afonso, A., Salomon, R., Deschênes, G., Ariceta, G., Özçakar, Z.B., Teixeira, A., Duzova, A., Harambat, J., Seeman, T., Hrcková, G., Lungu, A., Papizh, S., Peco Antic, A., De Rechter, S., Giordano, U., Kirchner, M., Lutz, T., Schaefer, F., Devuyst, O., Wühl, E. & Emma, F. 2018, "Prevalence of Hypertension in Children with Early-Stage ADPKD.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 13, no. 6, pp. 874-883.
- Meijer, E., Gansevoort, R.T., de Jong, P.E., van der Wal, A M, Leonhard, W.N., de Krey, S.R., van den Born, J., Mulder, G.M., van Goor, H., Struck, J., de Heer, E. & Peters, D.J.M. 2011, "Therapeutic potential of vasopressin V2 receptor antagonist in a mouse model for autosomal dominant polycystic kidney disease: optimal timing and dosing of the drug.", *Nephrology, dialysis, transplantation*, vol. 26, no. 8, pp. 2445-2453.

- Menezes, L. & Germino, G. 2013, "Murine Models of Polycystic Kidney Disease.", *Drug discovery today.Disease mechanisms*, vol. 10, no. 3-4, pp. e153-e158.
- Michaud, J., Russo, P., Grignon, A., Dallaire, L., Bichet, D., Rosenblatt, D., Lamothe, E. & Lambert, M. 1994, "Autosomal dominant polycystic kidney disease in the fetus.", *American Journal of Medical Genetics*, vol. 51, no. 3, pp. 240-246.
- Milutinovic, J., Fialkow, P.J., Rudd, T.G., Agodoa, L.Y., Phillips, L.A. & Bryant, J.I. 1980, "Liver cysts in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The American Journal of Medicine*, vol. 68, no. 5, pp. 741-744.
- Mochizuki, T., Wu, G., Hayashi, T., Xenophontos, S.L., Veldhuisen, B., Saris, J.J., Reynolds, D.M., Cai, Y., Gabow, P.A., Pierides, A., Kimberling, W.J., Breuning, M.H., Deltas, C.C., Peters, D.J. & Somlo, S. 1996, "PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein.", *Science*, vol. 272, no. 5266, pp. 1339-1342.
- Morgenthaler, N., Struck, J., Alonso, C. & Bergmann, A. 2006, "Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin.", *Clinical chemistry*, vol. 52, no. 1, pp. 112-119.
- Nadasdy, T., Laszik, Z., Lajoie, G., Blick, K.E., Wheeler, D.E. & Silva, F.G. 1995, "Proliferative activity of cyst epithelium in human renal cystic diseases.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 5, no. 7, pp. 1462-1468.
- Nagao, S., Kugita, M., Yoshihara, D. & Yamaguchi, T. 2012, "Animal models for human polycystic kidney disease.", *Experimental Animals*, vol. 61, no. 5, pp. 477-488.
- Nauli, S., Alenghat, F., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A.E.H., Lu, W., Brown, E., Quinn, S., Ingber, D. & Zhou, J. 2003, "Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells.", *Nature genetics*, vol. 33, no. 2, pp. 129-137.
- Nauli, S., Rossetti, S., Kolb, R., Alenghat, F., Consugar, M., Harris, P., Ingber, D., Loghman Adham, M. & Zhou, J. 2006, "Loss of polycystin-1 in human cyst-lining epithelia leads to ciliary dysfunction.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 4, pp. 1015-1025.
- Nigro, E.A., Distefano, G., Chiaravalli, M., Matafora, V., Castelli, M., Pesenti Gritti, A., Bachi, A. & Boletta, A. 2019, "Polycystin-1 Regulates Actomyosin Contraction and the Cellular Response to Extracellular Stiffness", *Scientific reports*, vol. 9, no. 1, pp. 16640-019-53061-0.
- Nowak, K., Cadnapaphornchai, M., Chonchol, M., Schrier, R. & Gitomer, B. 2016, "Long-Term Outcomes in Patients with Very-Early Onset Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease.", *American Journal of Nephrology*, vol. 44, no. 3, pp. 171-178.
- Ong, A.C.M. & Harris, P. 2015, "A polycystin-centric view of cyst formation and disease: the polycystins revisited.", *Kidney international*, vol. 88, no. 4, pp. 699-710.
- Pampaloni, F., Reynaud, E. & Stelzer, E.H.K. 2007, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue.", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 10, pp. 839-845.
- Pazour, G., San Agustin, J., Follit, J., Rosenbaum, J. & Witman, G. 2002, "Polycystin-2 localizes to kidney cilia and the ciliary level is elevated in orpk mice with polycystic kidney disease.", *Current biology*, vol. 12, no. 11, pp. R378-R380.

- Pazour, G. 2004, "Intraflagellar transport and cilia-dependent renal disease: the ciliary hypothesis of polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 10, pp. 2528-2536.
- Pei, Y., Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Germino, G. & St George-Hyslop, P. 1999, "Somatic PKD2 mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 10, no. 7, pp. 1524-1529.
- Pei, Y., Obaji, J., Dupuis, A., Paterson, A., Magistroni, R., Dicks, E., Parfrey, P., Cramer, B., Coto, E., Torra, R., San Millan, J., Gibson, R., Breuning, M., Peters, D. & Ravine, D. 2009, "Unified criteria for ultrasonographic diagnosis of ADPKD.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 20, no. 1, pp. 205-212.
- Peters, D.J., Spruit, L., Saris, J.J., Ravine, D., Sandkuijl, L.A., Fossdal, R., Boersma, J., van Eijk, R., Nørby, S. & Constantinou Deltas, C.D. 1993, "Chromosome 4 localization of a second gene for autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Nature genetics*, vol. 5, no. 4, pp. 359-362.
- Piontek, K., Huso, D., Grinberg, A., Liu, L., Bedja, D., Zhao, H., Gabrielson, K., Qian, F., Mei, C., Westphal, H. & Germino, G. 2004, "A functional floxed allele of Pkd1 that can be conditionally inactivated in vivo.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 15, no. 12, pp. 3035-3043.
- Pritchard, L., Sloane Stanley, J.A., Sharpe, J.A., Aspinwall, R., Lu, W., Buckle, V., Strmecki, L., Walker, D., Ward, C.J., Alpers, C.E., Zhou, J., Wood, W.G. & Harris, P.C. 2000, "A human PKD1 transgene generates functional polycystin-1 in mice and is associated with a cystic phenotype.", *Human molecular genetics*, vol. 9, no. 18, pp. 2617-2627.
- Qian, F., Watnick, T.J., Onuchic, L.F. & Germino, G.G. 1996, "The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I.", *Cell (Cambridge)*, vol. 87, no. 6, pp. 979-987.
- Rahman, E., Niaz, F.A., Al-Suwaida, A., Nahrir, S., Bashir, M., Rahman, H. & Hammad, D. 2009, "Analysis of causes of mortality in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: a single center study", *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, vol. 20, no. 5, pp. 806-810.
- Rankin, C.A., Ziemer, D.M., Maser, R.L., Foo, I. & Calvet, J.P. 1996, "Growth characteristics of cells cultured from two murine models of polycystic kidney disease.", *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, vol. 32, no. 2, pp. 100-106.
- Reed, B., McFann, K., Kimberling, W., Pei, Y., Gabow, P., Christopher, K., Petersen, E., Kelleher, C., Fain, P., Johnson, A. & Schrier, R. 2008, "Presence of de novo mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease patients without family history.", *American journal of kidney diseases*, vol. 52, no. 6, pp. 1042-1050.
- Reeders, S.T., Breuning, M.H., Davies, K.E., Nicholls, R.D., Jarman, A.P., Higgs, D.R., Pearson, P.L. & Weatherall, D.J. 1985, "A highly polymorphic DNA marker linked to adult polycystic kidney disease on chromosome 16.", *Nature*, vol. 317, no. 6037, pp. 542-544.
- Rodríguez Fraticelli, A., Auzan, M., Alonso, M., Bornens, M. & Martín Belmonte, F. 2012, "Cell confinement controls centrosome positioning and lumen initiation during epithelial morphogenesis.", *The Journal of cell biology*, vol. 198, no. 6, pp. 1011-1023.

- Rossetti, S., Burton, S., Strmecki, L., Pond, G., San Millán, J., Zerres, K., Barratt, T.M., Ozen, S., Torres, V., Bergstralh, E., Winearls, C. & Harris, P. 2002, "The position of the polycystic kidney disease 1 (PKD1) gene mutation correlates with the severity of renal disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 13, no. 5, pp. 1230-1237.
- Rossetti, S., Consugar, M., Chapman, A., Torres, V., Guay Woodford, L., Grantham, J., Bennett, W., Meyers, C., Walker, D., Bae, K., Zhang, Q., Thompson, P., Miller, J.P. & Harris, P. 2007, "Comprehensive molecular diagnostics in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 18, no. 7, pp. 2143-2160.
- Ruggenti, P., Gentile, G., Perico, N., Perna, A., Barcella, L., Trillini, M., Cortinovis, M., Ferrer Siles, C., Reyes Loaeza, J., Aparicio, M., Fasolini, G., Gaspari, F., Martinetti, D., Carrara, F., Rubis, N., Prandini, S., Caroli, A., Sharma, K., Antiga, L., Remuzzi, A. & Remuzzi, G. 2016, "Effect of Sirolimus on Disease Progression in Patients with Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease and CKD Stages 3b-4.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 11, no. 5, pp. 785-794.
- Sánchez, I. & Dynlacht, B. 2016, "Cilium assembly and disassembly.", *Nature cell biology*, vol. 18, no. 7, pp. 711-717.
- Satir, P., Pedersen, L. & Christensen, S. 2010, "The primary cilium at a glance.", *Journal of cell science*, vol. 123, no. 4, pp. 499-503.
- Schaffner, D.L., Barrios, R., Massey, C., Bañez, E.I., Ou, C.N., Rajagopalan, S., Aguilar Cordova, E., Lebovitz, R.M., Overbeek, P.A. & Lieberman, M.W. 1993, "Targeting of the rasT24 oncogene to the proximal convoluted tubules in transgenic mice results in hyperplasia and polycystic kidneys.", *The American journal of pathology*, vol. 142, no. 4, pp. 1051-1060.
- Scheff, R.T., Zuckerman, G., Harter, H., Delmez, J. & Koehler, R. 1980, "Diverticular disease in patients with chronic renal failure due to polycystic kidney disease.", *Annals of Internal Medicine*, vol. 92, no. 2, pp. 202-204.
- Scheffers, M.S., van der Bent, P., Prins, F., Spruit, L., Breuning, M.H., Litvinov, S.V., de Heer, E. & Peters, D.J. 2000, "Polycystin-1, the product of the polycystic kidney disease 1 gene, co-localizes with desmosomes in MDCK cells.", *Human molecular genetics*, vol. 9, no. 18, pp. 2743-2750.
- Scheffers, M., Le, H., van der Bent, P., Leonhard, W., Prins, F., Spruit, L., Breuning, M., de Heer, E. & Peters, D.J.M. 2002, "Distinct subcellular expression of endogenous polycystin-2 in the plasma membrane and Golgi apparatus of MDCK cells.", *Human molecular genetics*, vol. 11, no. 1, pp. 59-67.
- Schievink, W.I., Huston, J., Torres, V.E. & Marsh, W.R. 1995, "Intracranial cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Journal of neurosurgery*, vol. 83, no. 6, pp. 1004-1007.
- Schindelin, J., Arganda Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. 2012, "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis.", *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 676-682.

- Schindelin, J., Rueden, C., Hiner, M. & Eliceiri, K. 2015, "The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis.", *Molecular reproduction and development*, vol. 82, no. 7-8, pp. 518-529.
- Seeman, T., Dusek, J., Vondrichová, H., Kyncl, M., John, U., Misselwitz, J. & Janda, J. 2003, "Ambulatory blood pressure correlates with renal volume and number of renal cysts in children with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Blood pressure monitoring*, vol. 8, no. 3, pp. 107-110.
- Serra, A., Poster, D., Kistler, A., Krauer, F., Raina, S., Young, J., Rentsch, K., Spanaus, K., Senn, O., Kristanto, P., Scheffel, H., Weishaupt, D. & Wüthrich, R. 2010, "Sirolimus and kidney growth in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 363, no. 9, pp. 820-829.
- Shannon, M.B., Patton, B., Harvey, S. & Miner, J. 2006, "A hypomorphic mutation in the mouse laminin alpha5 gene causes polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 7, pp. 1913-1922.
- Shillingford, J., Piontek, K., Germino, G. & Weimbs, T. 2010, "Rapamycin ameliorates PKD resulting from conditional inactivation of Pkd1.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 21, no. 3, pp. 489-497.
- Silberberg, M., Charron, A., Bacallao, R. & Wandering Ness, A. 2005, "Mispolarization of desmosomal proteins and altered intercellular adhesion in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *AJP-Renal Physiology*, vol. 288, no. 6, pp. F1153-F1163.
- Silbernagl, S. 2018, "Kapitel 10, Die Funktion der Nieren" in *Physiologie*, eds. H.P. Pape, A. Kurtz & S. Silbernagl, 8., unveränderte Auflage edn, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 380-438.
- Simon, P., Le Goff, J.Y., Ang, K.S., Charasse, C., Le Cacheux, P. & Cam, G. 1996, "[Epidemiologic data, clinical and prognostic features of autosomal dominant polycystic kidney disease in a French region].", *Néphrologie*, vol. 17, no. 2, pp. 123-130.
- Smith, L., Bukanov, N., Husson, H., Russo, R., Barry, T., Taylor, A., Beier, D. & Ibraghimov Beskrovnaya, O. 2006, "Development of polycystic kidney disease in juvenile cystic kidney mice: insights into pathogenesis, ciliary abnormalities, and common features with human disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 10, pp. 2821-2831.
- Spithoven, E., Kramer, A., Meijer, E., Orskov, B., Wanner, C., Abad, J., Aresté, N., de la Torre, Ramón Alonso, Caskey, F., Couchoud, C., Finne, P., Heaf, J., Hoitsma, A., de Meester, J., Pascual, J., Postorino, M., Ravani, P., Zurriaga, O., Jager, K. & Gansevoort, R. 2014, "Renal replacement therapy for autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) in Europe: prevalence and survival--an analysis of data from the ERA-EDTA Registry.", *Nephrology, dialysis, transplantation*, vol. 29 Suppl 4, pp. iv15-iv25.
- Starremans, P.G., Li, X., Finnerty, P.E., Guo, L., Takakura, A., Neilson, E.G. & Zhou, J. 2008, "A mouse model for polycystic kidney disease through a somatic in-frame deletion in the 5' end of Pkd1.", *Kidney international*, vol. 73, no. 12, pp. 1394-1405.
- Su, Q., Hu, F., Ge, X., Lei, J., Yu, S., Wang, T., Zhou, Q., Mei, C. & Shi, Y. 2018, "Structure of the human PKD1-PKD2 complex.", *Science*, vol. 361, no. 6406.

- Taub, M., Laurie, G.W., Martin, G.R. & Kleinman, H.K. 1990, "Altered basement membrane protein biosynthesis by primary cultures of cpk/cpk mouse kidney.", *Kidney international*, vol. 37, no. 4, pp. 1090-1097.
- The European Polycystic Kidney Disease Consortium 1994, "The polycystic kidney disease 1 gene encodes a 14 kb transcript and lies within a duplicated region on chromosome 16.", *Cell*, vol. 78, no. 4, pp. 725-725.
- The International Polycystic Kidney Disease Consortium 1995, "Polycystic kidney disease: the complete structure of the PKD1 gene and its protein.", *Cell*, vol. 81, no. 2, pp. 289-298.
- Théry, M. 2010, "Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions.", *Journal of cell science*, vol. 123, no. 24, pp. 4201-4213.
- Théry, M. & Piel, M. 2009, "Adhesive micropatterns for cells: a microcontact printing protocol.", *Cold Spring Harbour Protocols*, vol. 2009, no. 7, pp. pdb.prot5255.
- Thivierge, C., Kurbegovic, A., Couillard, M., Guillaume, R., Coté, O. & Trudel, M. 2006, "Overexpression of PKD1 causes polycystic kidney disease.", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 4, pp. 1538-1548.
- Torra, R., Badenas, C., Darnell, A., Nicolau, C., Volpini, V., Revert, L. & Estivill, X. 1996, "Linkage, clinical features, and prognosis of autosomal dominant polycystic kidney disease types 1 and 2.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 7, no. 10, pp. 2142-2151.
- Torra, R., Nicolau, C., Badenas, C., Navarro, S., Pérez, L., Estivill, X. & Darnell, A. 1997, "Ultrasonographic study of pancreatic cysts in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Clinical nephrology*, vol. 47, no. 1, pp. 19-22.
- Torra, R., Sarquella, J., Calabia, J., Martí, J., Ars, E., Fernández Llama, P. & Ballarin, J. 2008, "Prevalence of cysts in seminal tract and abnormal semen parameters in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. 3, pp. 790-793.
- Torres, V., Chapman, A., Devuyst, O., Gansevoort, R., Grantham, J., Higashihara, E., Perrone, R., Krasa, H., Ouyang, J. & Czerwiec, F. 2012, "Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 367, no. 25, pp. 2407-2418.
- Torres, V., Chapman, A., Devuyst, O., Gansevoort, R., Perrone, R., Dandurand, A., Ouyang, J., Czerwiec, F. & Blais, J. 2017, "Multicenter, open-label, extension trial to evaluate the long-term efficacy and safety of early versus delayed treatment with tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease: the TEMPO 4:4 Trial.", *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, vol. 32, no. 7, pp. 1262-1262.
- Torres, V., Harris, P. & Pirson, Y. 2007, "Autosomal dominant polycystic kidney disease.", *The Lancet*, vol. 369, no. 9569, pp. 1287-1301.
- Torres, V., Wang, X., Qian, Q., Somlo, S., Harris, P. & Gattone, V. 2004, "Effective treatment of an orthologous model of autosomal dominant polycystic kidney disease.", *Nature medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 363-364.
- Torres, V. 2004, "Cyclic AMP, at the hub of the cystic cycle.", *Kidney international*, vol. 66, no. 3, pp. 1283-1285.

- Trudel, M., D'Agati, V. & Costantini, F. 1991, "C-myc as an inducer of polycystic kidney disease in transgenic mice.", *Kidney international*, vol. 39, no. 4, pp. 665-671.
- Vassilev, P.M., Guo, L., Chen, X.Z., Segal, Y., Peng, J.B., Basora, N., Babakhanlou, H., Cruger, G., Kanazirska, M., Ye Cp, E.M., Brown, M.A., Hediger, J. & Zhou 2001, "Polycystin-2 is a novel cation channel implicated in defective intracellular Ca(2+) homeostasis in polycystic kidney disease.", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 282, no. 1, pp. 341-350.
- Weis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R. & Korsmeyer, S.J. 1993, "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair.", *Cell*, vol. 75, no. 2, pp. 229-240.
- Wahl, P., Serra, A., Le Hir, M., Molle, K., Hall, M. & Wüthrich, R. 2006, "Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in Han:SPRD rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD).", *Nephrology, dialysis, transplantation*, vol. 21, no. 3, pp. 598-604.
- Wallace, D.P., Grantham, J.J. & Sullivan, L.P. 1996, "Chloride and fluid secretion by cultured human polycystic kidney cells.", *Kidney international*, vol. 50, no. 4, pp. 1327-1336.
- Wallace, D. 2011, "Cyclic AMP-mediated cyst expansion.", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1812, no. 10, pp. 1291-1300.
- Wang, X., Gattone, V., Harris, P. & Torres, V. 2005, "Effectiveness of vasopressin V2 receptor antagonists OPC-31260 and OPC-41061 on polycystic kidney disease development in the PCK rat.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 16, no. 4, pp. 846-851.
- Wang, X., Ward, C., Harris, P. & Torres, V. 2010, "Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease.", *Kidney international*, vol. 77, no. 2, pp. 129-140.
- Wang, X., Wu, Y., Ward, C., Harris, P. & Torres, V. 2008, "Vasopressin directly regulates cyst growth in polycystic kidney disease.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 19, no. 1, pp. 102-108.
- Ward, C.J., Turley, H., Ong, A.C., Comley, M., Biddolph, S., Chetty, R., Ratcliffe, P.J., Gattner, K. & Harris, P.C. 1996, "Polycystin, the polycystic kidney disease 1 protein, is expressed by epithelial cells in fetal, adult, and polycystic kidney.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 4, pp. 1524-1528.
- Watnick, T., He, N., Wang, K., Liang, Y., Parfrey, P., Hefferton, D., St George-Hyslop, P., Germino, G. & Pei, Y. 2000, "Mutations of PKD1 in ADPKD2 cysts suggest a pathogenic effect of trans-heterozygous mutations.", *Nature Genetics*, vol. 25, pp. 143-144.
- Wilson, P.D., Dillingham, M.A., Breckon, R. & Anderson, R.J. 1985, "Defined human renal tubular epithelia in culture: growth, characterization, and hormonal response.", *American Journal of Physiology*, vol. 248, no. 3, pp. F436-F443.
- Wilson, P.D., Du, J. & Norman, J.T. 1993, "Autocrine, endocrine and paracrine regulation of growth abnormalities in autosomal dominant polycystic kidney disease.", *European journal of cell biology*, vol. 61, no. 1, pp. 131-138.
- Wilson, P.D., Geng, L., Li, X. & Burrow, C.R. 1999, "The PKD1 gene product, "polycystin-1," is a tyrosine-phosphorylated protein that colocalizes with alpha2beta1-integrin in focal

- clusters in adherent renal epithelia.", *Laboratory Investigation*, vol. 79, no. 10, pp. 1311-1323.
- Wilson, P.D., Hreniuk, D. & Gabow, P.A. 1992, "Abnormal extracellular matrix and excessive growth of human adult polycystic kidney disease epithelia.", *Journal of cellular physiology*, vol. 150, no. 2, pp. 360-369.
- Wilson, P.D., Schrier, R.W., Breckon, R.D. & Gabow, P.A. 1986, "A new method for studying human polycystic kidney disease epithelia in culture.", *Kidney international*, vol. 30, no. 3, pp. 371-378.
- Wilson, P.D., Sherwood, A.C., Palla, K., Du, J., Watson, R. & Norman, J.T. 1991, "Reversed polarity of Na(+)-K(+)-ATPase: mislocation to apical plasma membranes in polycystic kidney disease epithelia.", *American Journal of Physiology*, vol. 260, no. 3, pp. F420-F430.
- Wilson, P.D. 1997, "Epithelial cell polarity and disease.", *American Journal of Physiology*, vol. 272, no. 4, pp. F434-F442.
- Wilson, P. 2011, "Apico-basal polarity in polycystic kidney disease epithelia.", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1812, no. 10, pp. 1239-1248.
- Wilson, P. 2004, "Polycystic kidney disease.", *The New England journal of medicine*, vol. 350, no. 2, pp. 151-164.
- Woo, Y., Ko, J. & Lee, E. 2016, "Validation of Effective Therapeutic Targets for ADPKD Using Animal Models.", *Adv Exp Med Biol*, vol. 933, pp. 71-84.
- Woo, D. 1995, "Apoptosis and loss of renal tissue in polycystic kidney diseases.", *The New England journal of medicine*, vol. 333, no. 1, pp. 18-25.
- Wu, G., D'Agati, V., Cai, Y., Markowitz, G., Park, J.H., Reynolds, D.M., Maeda, Y., Le, T.C., Hou, H., Kucherlapati, R., Edelmann, W. & Somlo, S. 1998, "Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease.", *Cell*, vol. 93, no. 2, pp. 177-188.
- Yamaguchi, T., Nagao, S., Kasahara, M., Takahashi, H. & Grantham, J.J. 1997, "Renal accumulation and excretion of cyclic adenosine monophosphate in a murine model of slowly progressive polycystic kidney disease.", *American journal of kidney diseases*, vol. 30, no. 5, pp. 703-709.
- Yamaguchi, T., Pelling, J.C., Ramaswamy, N.T., Eppler, J.W., Wallace, D.P., Nagao, S., Rome, L.A., Sullivan, L.P. & Grantham, J.J. 2000, "cAMP stimulates the in vitro proliferation of renal cyst epithelial cells by activating the extracellular signal-regulated kinase pathway.", *Kidney international*, vol. 57, no. 4, pp. 1460-1471.
- Yamaguchi, T., Hempson, S., Reif, G., Hedge, A. & Wallace, D. 2006, "Calcium restores a normal proliferation phenotype in human polycystic kidney disease epithelial cells.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 17, no. 1, pp. 178-187.
- Yasuda, G. & Jeffries, W.B. 1998, "Regulation of cAMP production in initial and terminal inner medullary collecting ducts.", *Kidney international*, vol. 54, no. 1, pp. 80-86.

Yoder, B., Hou, X. & Guay Woodford, L. 2002, "The polycystic kidney disease proteins, polycystin-1, polycystin-2, polaris, and cystin, are co-localized in renal cilia.", *Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 13, no. 10, pp. 2508-2516.

Ziegler, W.H., Soetje, B., Marten, L.P., Wiese, J., Burute, M. & Haffner, D. 2020, "Fibrocystin Is Essential to Cellular Control of Adhesion and Epithelial Morphogenesis", *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 14, pp. 10.3390/ijms21145140.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dieter Haffner für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojektes und die Förderung durch regelmäßige Treffen und Fachdiskussionen.

Herrn Dr. rer. nat. Ziegler danke ich besonders für die intensive Betreuung und für seine ständige Diskussion- und Hilfsbereitschaft während der zehnmonatigen experimentellen Phase dieser Arbeit und darüber hinaus. Vielen Dank für zahlreiche Treffen, hilfreiche Anregungen und konstruktive Kritik.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten Team der AG Dr. Ziegler/ Prof. Haffner bedanken. Insbesondere danke ich Frau Dr. Birga Soetje für ihre Geduld und Unterstützung bei Erlernen und Durchführung der Methoden, sowie beim Bewältigen von jeglichen Problemen im Labor.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Soeren Lienkamp und Herrn Dr. med. Roman Pichler der Universitätsklinik Freiburg bedanken. Die Kooperation und insbesondere die Bereitstellung der iRECs-Zellklone hat diese Arbeit erst ermöglicht.

Recht herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. med. Mario Schiffer für die Förderung und Unterstützung als Co-Betreuer meiner Arbeit.

Auch meinen Freunden, insbesondere meiner Mit-Doktorandin Sarah Lüdiger, die mir während der experimentellen Phase immer, auch in frustrierenden Phasen, motiviert zur Seite gestanden hat, danke ich sehr.

Besonders danke ich zudem meiner Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat.

10 Erklärung zur Dissertation nach §2 Abs. 2 Nr. 7 + 8

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Einfluss eines *Pkd1*-Knockout auf die Ausbildung funktionaler Epithelstrukturen in induzierten murinen renalen Epithelzellen (iRECs)

in der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Dieter Haffner und Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Ziegler mit der Unterstützung durch Frau Dr. rer. nat. Birga Soetje und in Kooperation mit Herrn PD Dr. med. Lienkamp und Herrn Dr. med. Roman Pichler aus Freiburg sowie der Unterstützung durch das Stipendium der HBRS im Rahmen der strukturierten Doktorandenausbildung ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Hannover, den