

**Xbp1-Aktivierung im murinen Pkd1-Missense-Modell  
der humanen autosomal dominanten polyzystischen  
Nierenerkrankung verlangsamt das Zystenwachstum  
und die Abnahme der Nierenfunktion**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Till Amadeus Hollmann**

Geb. in Bielefeld

2023

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Dr. Philipp Lutz
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Ellinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.08.2023

Aus der Klinik und Poliklinik I  
Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Strassburg

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 POLYZYSTISCHE NIERENERKRANKUNGEN .....	8
1.2 DIE AUTOSOMAL-DOMINANTE POLYZYSTISCHE NIERENERKRANKUNG (ADPKD) .....	8
1.2.1 GENETIK BEI ADPKD - PKD1 UND PC1.....	9
1.2.2 GENETIK BEI ADPKD - PKD2 UND PC2.....	11
1.2.3 MOLEKULARE GRUNDLAGEN DER ZYSTENENTSTEHUNG.....	12
1.2.4 DIE PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> , PKHD1-CRE-MUTANTE ALS VERSUCHSMODEL.....	14
1.3 DIE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) .....	15
1.3.1 DIE UPR BEI ADPLD .....	18
1.3.2 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	20
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1 MÄUSESTÄMME .....	21
2.2 ENTWICKLUNG DES PKD1 <sup>R2216W</sup> ALLELS IN DER MAUS.....	21
2.3 GENOTYPISIERUNG .....	22
2.3.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	22
2.3.2 AGAROSEGEL-ELEKTROPHORESE .....	24
2.4 BESTIMMUNG DES CYSTIC INDEX .....	25
2.5 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG.....	26
2.5.1 KI67-FÄRBUNG .....	26
2.5.2 DURCHFÜHRUNG DES TUNEL-ASSAYS.....	27
2.5.3 IMMUNFLUORESCENZ DARSTELLUNG VON XBP1S .....	28
2.6 WESTERN BLOT.....	30
2.6.1 PROTEINEXTRAKTION .....	30
2.6.2 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD.....	30
2.6.3 VORBEREITUNG DER PROBEN FÜR DEN WESTERN BLOT .....	31
2.6.4 SDS-PAGE GELELEKTROPHORESE .....	31
2.6.5 DAS BLOTVERFAHREN UND DER IMMUNOBLOT .....	31
2.7 ERMITTLUNG DER BUN-WERTE .....	34

2.8	STATISTIK .....	34
2.9	CHEMIKALIEN .....	34
2.10	PUFFER UND LÖSUNGEN .....	37
2.11	GERÄTE UND SOFTWARE.....	38
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>39</b>
3.1	NACHWEIS DER GEWÜNSCHTEN VERSUCHSTIERE DURCH GENOTYPISIERUNG .....	39
3.1.1	NACHWEIS DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> , PKHD1-CRE MAUSMODELS.....	39
3.1.2	NACHWEIS DES ROSA26-XBP1S ALLELS IM PKD1-MISSENSE MUTATIONSMODEL.....	40
3.2	UNTERSUCHUNG DER XBP1S-ÜBEREXPRESSION IN NIERENLYSATEN DURCH WESTERN BLOT .....	40
3.3	HISTOLOGISCHE UND PHYSIOLOGISCHE PARAMETER DER NIEREN .....	43
3.3.1	HISTOLOGIE .....	43
3.3.2	AUSWIRKUNGEN DER XBP1S-HOCHREGULIERUNG AUF DIE NIERENFUNKTION.....	46
3.4	IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG.....	48
3.4.1	NACHWEIS VON XBP1S IN SAMMELROHRZELLEN .....	48
3.4.2	UNTERSUCHUNG DES PROLIFERATIONSVERHALTEN VON SAMMELROHRZELLEN BEI ERHÖHTER XBP1S-EXPRESSION.....	49
3.4.3	UNTERSUCHUNG DES APOPTOSEVERHALTENS VON SAMMELROHRZELLEN BEI ERHÖHTER XBP1S-EXPRESSION .....	51
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>55</b>
4.1	AUSWIRKUNG DER XBP1S EXPRESSION AUF DIE MORPHOLOGIE DER NIERE DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> MUTATIONSMODELS.....	57
4.2	AUSWIRKUNG DER XBP1S EXPRESSION AUF DIE „KIDNEY WEIGHT TO BODY WEIGHT RATIO“ UND DEN CYSTIC INDEX DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> MUTATIONSMODELS.....	58
4.3	AUSWIRKUNG DER XBP1S EXPRESSION AUF DIE NIERENFUNKTION DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> MUTATIONSMODELS.....	59
4.4	AUSWIRKUNG DER XBP1S EXPRESSION AUF DIE PROLIFERATIONSRATE DER ZYSTENZELLEN DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> MUTATIONSMODELS .....	60
4.5	AUSWIRKUNG DER XBP1S EXPRESSION AUF DIE APOPTOSERATE DER ZYSTENZELLEN DES PKD1 <sup>R2216W/FLOX</sup> MUTATIONSMODELS.....	61

4.6	SCHLUSSFOLGERUNG .....	62
5.	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
6.	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>65</b>
7.	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
8.	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>
9.	<b>Danksagung.....</b>	<b>78</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzym
ADPKD	Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease
ADPLD	Autosomal Dominant Polycystic Liver Disease
ALG8	Alpha-1,3-Glucosyltransferase
ARPKD	Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease
ASK1	Apoptosis Signal-regulating Kinase-1
AT <sub>1</sub>	Angiotensin 1
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
BUN	Blood Urea Nitrogen
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas9	Caspase 9
C/EBT	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CI	Cystic Index
Cre	Cyclization recombination
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DBA	Dolichos Biflorus Agglutinin
DNA	Desoxyribonucleic Acid
ECL	Elektrochemolumineszens
ER	Endoplasmatisches Retikulum
eIF2	Eukaryotic Initiation Factor 2
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein
GAIN	GPCR autoproteolytic-inducing
GANAB	Glucosidase II Alpha Subunit
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GPS	GPCR Proteolytic Site
IRE1 $\alpha$	Inositol-Requiring Enzyme 1
ICR	Institute of Cancer Research

IDT	Integrated DNA Technologies
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	Knock-Out
LOH	Loss-Of-Heterocycosity
LTL	Lotus Tetragonolobus Lectin
MAP	Mitogen-Activated Protein
NEB	New England Biolabs
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PC1	Polycystin 1
PC2	Polycystin 2
PCR	Polymerase Chain Reaction
PERK	Protein Kinase R-like ER Kinase
PFA	Paraformaldehyd
Pkhd1	Polycystic kidney and hepatic disease 1
PPT1	Proteinphosphatase 1
PRKCSH	Protein Kinase C Substrate 80K-H
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
REJ	Receptor Egg Jelly
RIDD	Regulated IRE1 $\alpha$ -Dependent Decay
(m)RNA	(messenger) Ribonucleic Acid
RPM	Rotations Per Minute
SDS	Sodium Lauryl Sulfate
sgRNA	single guide Ribonucleic Acid
ssODN	single-stranded Oligodeoxynucleotidedonor
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween20
TMS	Thermo Fischer Scientific
TRAF2	TNF Receptor-Associated Factor-2
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
UPR	Unfolded Protein Response
XBP1(s)	(spliced) X-Box Binding Protein 1

## 1. Einleitung

### 1.1 Polyzystische Nierenerkrankungen

Die polyzystischen Nierenerkrankungen zeichnen sich durch die Ausbildung von zahlreichen Zysten in den Nieren mit potentieller Einschränkung der Organfunktion im Verlauf der Zeit aus. Auch andere Organe können betroffen sein. Die Entstehung der Zysten beruht auf genetischer Prädisposition, sekundären Ereignissen und teils unbekanntem Faktoren. Zudem können auch Neumutationen auftreten. Eingeteilt werden die polyzystischen Nierenerkrankungen nach Potter und der WHO. Nach Potter werden die Erkrankungen anhand morphologischer bzw. anatomischer Gegebenheiten ohne Berücksichtigung der genetischen Grundlagen oder der klinischen Ausprägung der jeweiligen Erkrankung unterschieden, weshalb die WHO die Einteilung angepasst hat. Zu den polyzystischen Nierenerkrankungen gehören die Autosomal-Rezessive Polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD), Potter I entsprechend, die multizystische Nierendysplasie, mit Vergrößerung der Niere, Potter IIa, bzw. mit Verkleinerung der Niere, Potter IIb, die Autosomal-Dominante Polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD), Potter III entsprechend und die Zystische Nierendysplasie bei fetaler Obstruktion des unteren Harntrakts, Potter IV entsprechend (Fischer, 2020). Fokus dieser Arbeit ist die ADPKD.

### 1.2 Die Autosomal-Dominante Polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD)

Die Autosomal-Dominante Polyzystische Nierenerkrankung stellt mit einer Häufigkeit von 1:500 bis 1:1000 eine der häufigsten Erbkrankheiten der Niere dar (LaRiviere et al., 2015). Charakteristisch ist das Auftreten von multiplen Zysten in beiden Nieren. Die Zysten nehmen im Laufe der Zeit an Anzahl und Größe zu und verdrängen das gesunde Nierenparenchym. Die Folge ist ein schleichender Funktionsverlust der Niere, was im Endstadium der Erkrankung mit einem terminalen Nierenversagen einhergeht. Bei ca. 50 % der Patienten entsteht eine Dialyse- bzw. Transplantationsindikation zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr (Qian et al., 1996). Neben dem zunehmenden Funktionsverlust der Nieren können auch andere Organe durch die ADPKD betroffen sein. Es zeigen sich neben Nierenzysten auch Leberzysten, Pankreaszysten, Hirnarterienaneurysmen, Mitralklappenprolaps und Bauchfellhernien (Torres et al., 2007). Die Ausprägung der Schädigungen kann stark variieren und zeigt sich von asymptomatischen bis letalen Verläufen in einem

weiten Spektrum klinischer Manifestationen. Da bisher weder eine kausale Therapie der Erkrankung noch eine kurative Therapie bestehen, beruht der aktuelle Therapieansatz auf einer Behandlung der Symptome und Folgeerkrankungen der ADPKD bzw. auf einer Nierentransplantation. Die arterielle Hypertonie stellt eine der häufigsten Folgen und Risiken für den ADPKD Patienten dar. Die arterielle Hypertonie tritt bei ca. 60-80 % der ADPKD Patienten auf (Ecker und Schrier, 2001; Ratnam und Nauli, 2010). Grund für die arterielle Hypertonie ist nach Tkachenko et al. (2013) die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Diese Theorie stützt den aktuellen symptomatischen Therapieansatz der arteriellen Hypertonie bei ADPKD mit RAAS-Inhibitoren wie ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Helal, 2015). Mit Hilfe des Vasopressin-Rezeptor2-Antagonisten Tolvaptan ist seit 2015 ein weiterer Therapieansatz hinzugekommen. Studien konnten zeigen, dass unter Tolvaptan die Größenzunahme des Nierengesamtgewichtes und das Absinken der GFR gebremst werden konnten. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Verlangsamung des Krankheitsprogresses eine Verschiebung der Dialysepflichtigkeit um bis zu 6,5 Jahre nach hinten ermöglicht werden kann (Erickson et al., 2014; Torres et al., 2012). Dies stellt leider noch keinen kurativen Ansatz dar, weshalb die Forschungen in eine kúriative Richtung weitergehen.

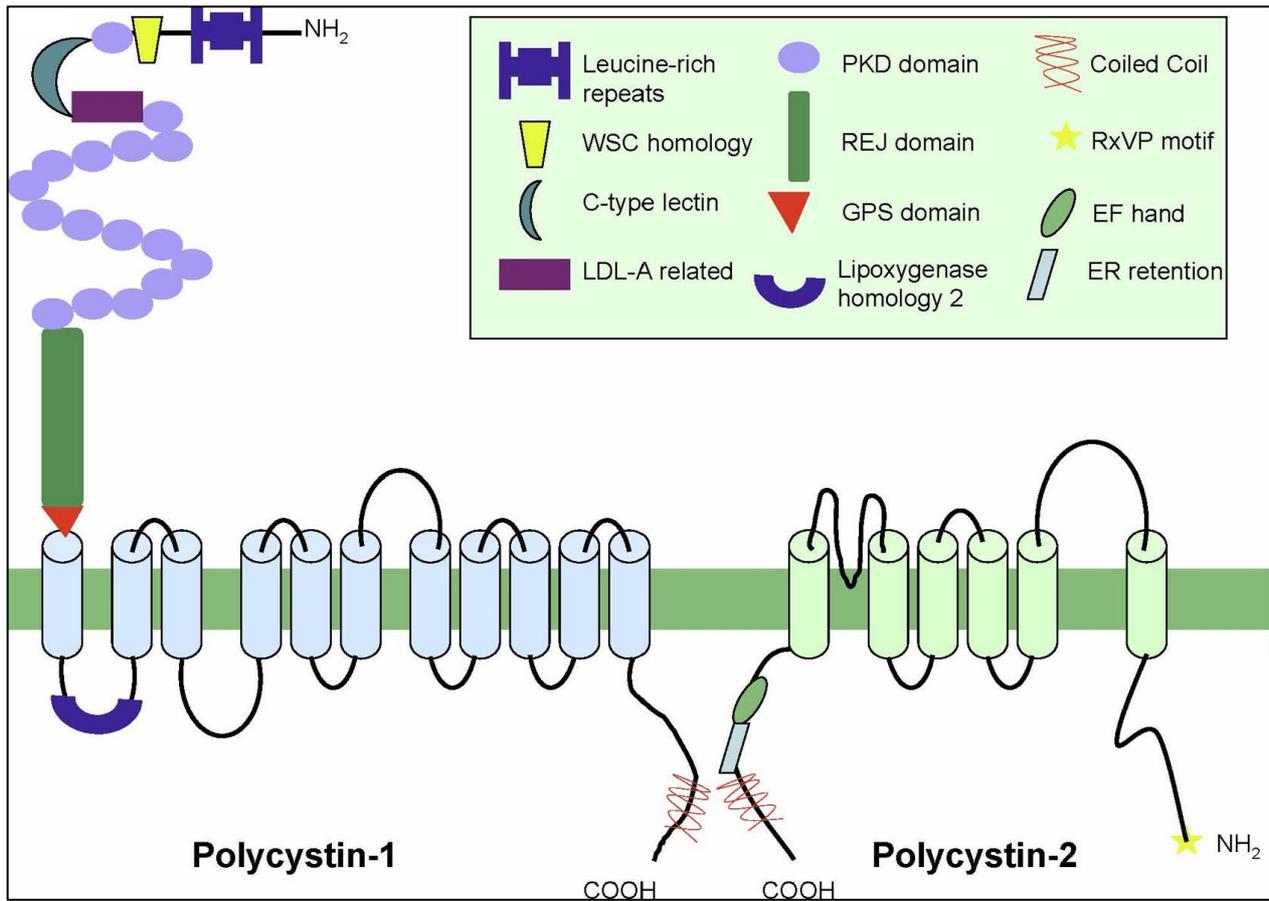
### 1.2.1 Genetik bei ADPKD - Pkd1 und PC1

Die Entstehung der ADPKD basiert auf Punktmutationen in den Genen Pkd1 auf Lokus 16p13.3 und Pkd2 auf Lokus 4q21. Pkd1 kodiert für das Protein Polycystin 1 (PC1) und Pkd2 für das Protein Polycystin 2 (PC2). In ca. 78 % der Fälle liegt eine Mutation in Pkd1 und nur in 22 % der Fälle eine Mutation in Pkd2 vor (Cornec-Le Gall et al., 2013). Liegt die Mutation in der 5' Region des Pkd1 Allels, so zeigen sich bei den Patienten aggressivere Verläufe mit einem früher einsetzenden terminalen Nierenversagen (Ravine et al., 1992; Rossetti et al., 2002). Darüber hinaus wurde in Studien beschrieben, dass intrafamiliäre und interfamiliäre Unterschiede in der Ausprägung des Krankheitsbildes darauf hindeuten, dass nicht nur die Keimbahnmutation von Pkd1 und Pkd2, sondern auch weitere, bisher unbekannte Faktoren für das Fortschreiten der Erkrankung und ihre Ausprägung verantwortlich sind (Hateboer et al., 1999; Milutinovic et al., 1992; Persu et al., 2004). Kommt es im seltenen Fall zu einer Mutation sowohl in Pkd1, als auch in Pkd2, zeigt sich ein aggressiverer Verlauf (Pei et al., 2001). Polycystin 1 (PC1) kommt u.a. in der Zellmembran des primären Ciliums von Tubuluszellen der Niere vor. Das primäre

Cilium ist eine Ausstülpung der Zellmembran in das Tubuluslumen. PC1 könnte hier als mechanischer Sensor für extrazelluläre Signale wie Urinfluss oder Elektrolytkonzentrationen dienen und diese Signale dann auf intrazellulärer Ebene weitergeben. Darüber hinaus wird angenommen, dass PC1 eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation spielt und damit eine bedeutende Rolle bei der Organisation des Tubulusepithels einnimmt (Deane und Ricardo, 2012; Venkatesh, 2017). PC1 besteht aus 11 Transmembrandomänen, einem extrazellulären NH<sub>2</sub>-Terminus und einem intrazellulären COOH-Terminus (Abb.1). PC1 besitzt eine Gesamtmolekülmasse von 460 kDa. Der extrazelluläre Anteil beinhaltet einen selbstschneidenden G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) mit proteolytischer Funktion (GPS) (Kim und Park, 2016). Ebenfalls zum extrazellulären Anteil gehörend ist eine Receptor Egg Jelly (REJ)-Domäne, die bei der proteolytischen Spaltung ebenfalls notwendig ist. Studien legen nahe, dass die REJ-Domäne zur Freilegung der GPS benötigt wird, damit der autoproteolytische Vorgang des Proteins ablaufen kann (Qian et al., 2022; Xu et al., 2013). Kommt es zur Spaltung, trennt sich das N-terminale Fragment ab und das C-terminale Fragment bleibt erhalten. Dieser Prozess könnte als wichtiger Schritt zur Erhaltung einer intakten Zell-Zell-Kommunikation und damit zur Vorbeugung der Zystenentstehung beitragen (Yu et al., 2007). Es wird davon ausgegangen, dass 25 % der Mutationen in Pkd1 Punktmutationen sind, von denen sich ca. 30 % in der REJ/GAIN (GPCR autoproteolytic-inducing) Region von PC1 befinden. Damit könnte die GAIN-Domäne mit der in ihr beinhalteten GPS die für den Spaltungsprozess verantwortliche Region von PC1 sein. Dieser Zusammenhang ist Inhalt weiterer Studien. Da sich die GAIN-Domäne in sowohl einfachen Organismen als auch fortgeschrittenen Säugetieren wie dem Menschen wiederfindet, also evolutionär stark konserviert ist, und dort in den Adhesion-GPCRs und Polycystinen vorkommt, wird angenommen, dass PC1 ein bedeutendes Membran-Glykoprotein ist, das maßgeblich für die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion verantwortlich ist (Qian et al., 1996).

### 1.2.2 Genetik bei ADPKD - Pkd2 und PC2

Pkd2 befindet sich auf dem Genlocus 4q21 und kodiert für das Protein Polycystin 2 (PC2). PC2 ist Teil der TRPP-(transient receptor potential polycystic)-Familie, die zu den TRP-Kationenkanälen (transient receptor potential cation channels) zählen. Es wird davon ausgegangen, dass PC2 ein nicht-selektiver  $K^+$  und  $Ca^{2+}$ -durchlässiger Kationenkanal ist. PC2 findet sich in direkter Nähe zu PC1 im Bereich des Ciliums, im Bereich des endoplasmatischen Retikulums (ER) und besteht aus 6 Transmembrandomänen (Abb.1). Die Domänen S5 und S6 bilden die Porenregion des Kationenkanals (Cai et al., 1999; Li et al., 2003). Es gilt als erwiesen, dass PC1 und PC2 einen Rezeptor-Kanal-Komplex auf dem primären Cilium bilden und funktionell interagieren (Su et al., 2018; Ta et al., 2020). Der intrazelluläre  $NH_2$ -Terminus mit einem RVxP-Motiv dient dem gezielten Transport von PC2 aus dem ER zur Membran des primären Ciliums (Geng et al., 2006). PC2 besitzt nahe dem ebenfalls intrazellulär gelegenen COOH-Terminus ein EF-Hand Motiv, das  $Ca^{2+}$ -Ionen binden kann. Ebenfalls nahe dem COOH-Terminus liegt eine Coiled-Coil-Domäne, die für die Interaktion mit dem COOH-Terminus von PC1 verantwortlich ist (Yu et al., 2009).



**Abb. 1:** Strukturen von Polycystin 1 und Polycystin 2, nicht maßstabsgetreu. Fokus liegt hier auf der Darstellung von PC1 und PC2 als Transmembranproteine mit intra- und extrazellulären Domänen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nicht auf alle abgebildeten Strukturen im Text eingegangen (Gallagher et al., 2010).

### 1.2.3 Molekulare Grundlagen der Zystenentstehung

Obwohl ADPKD einem autosomal dominanten Erbgang folgt, kommt es bei dieser Erkrankung erst nach einem so genannten „second hit“ im gesunden Allel zu einer ausgeprägten Zystenbildung. Mit „second hit“ wird ein genetischer Pathomechanismus beschrieben: Zu einer heterozygoten Mutation oder definierten Ausprägung auf einem bestimmten Allel addiert sich im Laufe des Lebens eine zufällige Mutation auf dem zweiten Allel, wodurch eine genetische Homozygotie entsteht. Durch den „second hit“ liegt bei ADPKD dann das mutierte Pkd1 oder Pkd2 homozygot vor und es kommt zur Ausbildung des pathologischen Phänotyps (Brasier und Henske, 1997; Pei et al., 1999; Qian et al., 1996; Torra, 1999; Wu et al., 1998). Liegt nur ein mutiertes Allel vor, zeigen sich die Zysten als fokale Läsionen innerhalb eines noch funktionstüchtigen Nierentubulus. Kommt es zum „second hit“ und damit zu einer Inaktivierung des zuvor funktionstüchtigen Pkd1 oder Pkd2, wird

die Zystenentstehung initiiert. Man kann also davon ausgehen, dass ADPKD einem dominanten Erbgang folgt, sich jedoch auf zellulärer Ebene rezessiv verhält. Auf zellulärer Ebene konnte diese sog. Loss-of-heterozygosity (LOH) nachgewiesen werden (Pei et al., 1999). Der Verlust des noch gesunden Gens im Verlauf des Lebens ereignet sich rein zufällig, weshalb die Initiierung der Zystenbildung in jedem Alter beginnen kann. Für die Schwere des Verlaufes spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Dazu gehören der Zeitpunkt der Geninaktivierung (Piontek et al., 2007), das Ausmaß der Entzündungsreaktion (Karihaloo et al., 2011; Swenson-Fields et al., 2013) und ein milderer Verlauf im Falle von hypomorphen Punktmutationen im Vergleich zu einer Loss-of-Function-Mutation (Cai et al., 2014; Jiang et al., 2006, Latinga-van et al., 2007; Rosetti et al., 2009).

Als hypomorphe Mutation wird in der Genetik eine Mutation beschrieben, die nur zu einem geringen bzw. partiellen Verlust der Proteinfunktion führt. Diese Punktmutationen, die ca. 25 % der krankheitsauslösenden Mutationen hervorrufen, führen zu einem weniger funktionstüchtigen PC1 Protein, was, verglichen mit einer totalen Inaktivierung, mit einem milderen Verlauf einhergeht (Hopp et al., 2012). Der Grund für den milderen Verlauf kann darin bestehen, dass ein vollständiges PC1 synthetisiert wird, welches durch seine veränderte Tertiärstruktur jedoch funktionelle Defizite trägt. Defizite können eine fehlerhafte Spaltung an der GPS oder ein fehlerhafter Transport in das primäre Cilium sein (Fedeles et al., 2011). Darüber hinaus spielt die vorhandene Menge an funktionstüchtigem PC1 ebenfalls eine entscheidende Rolle. Sinkt die PC1-Konzentration unter eine kritische Schwelle (ca. 20 %), können Zysten auftreten (Latinga-van Leeuwen et al., 2004; Rosetti et al., 2009; Fedeles et al., 2011). Selbst der Durchmesser der Nierentubuli ist von der PC1-Konzentration abhängig (Krappitz et al., 2016). Eine Reduktion der PC1-Konzentration führt also zu einem vermehrten Zystenwachstum, wohin gegen eine Steigerung der PC1-Konzentration zu einer Reduktion des Zystenwachstums führen kann (Hopp et al., 2012; Rosetti et al., 2009). Neben diesen molekularen Mechanismen ist auch die betroffene Region innerhalb der Niere für die Ausprägung der Zysten relevant. So zeigen Epithelzellen des Sammelrohrs ein schnelleres und ausgeprägteres Zystenwachstum als andere Nephronabschnitte (Fedeles et al., 2011).

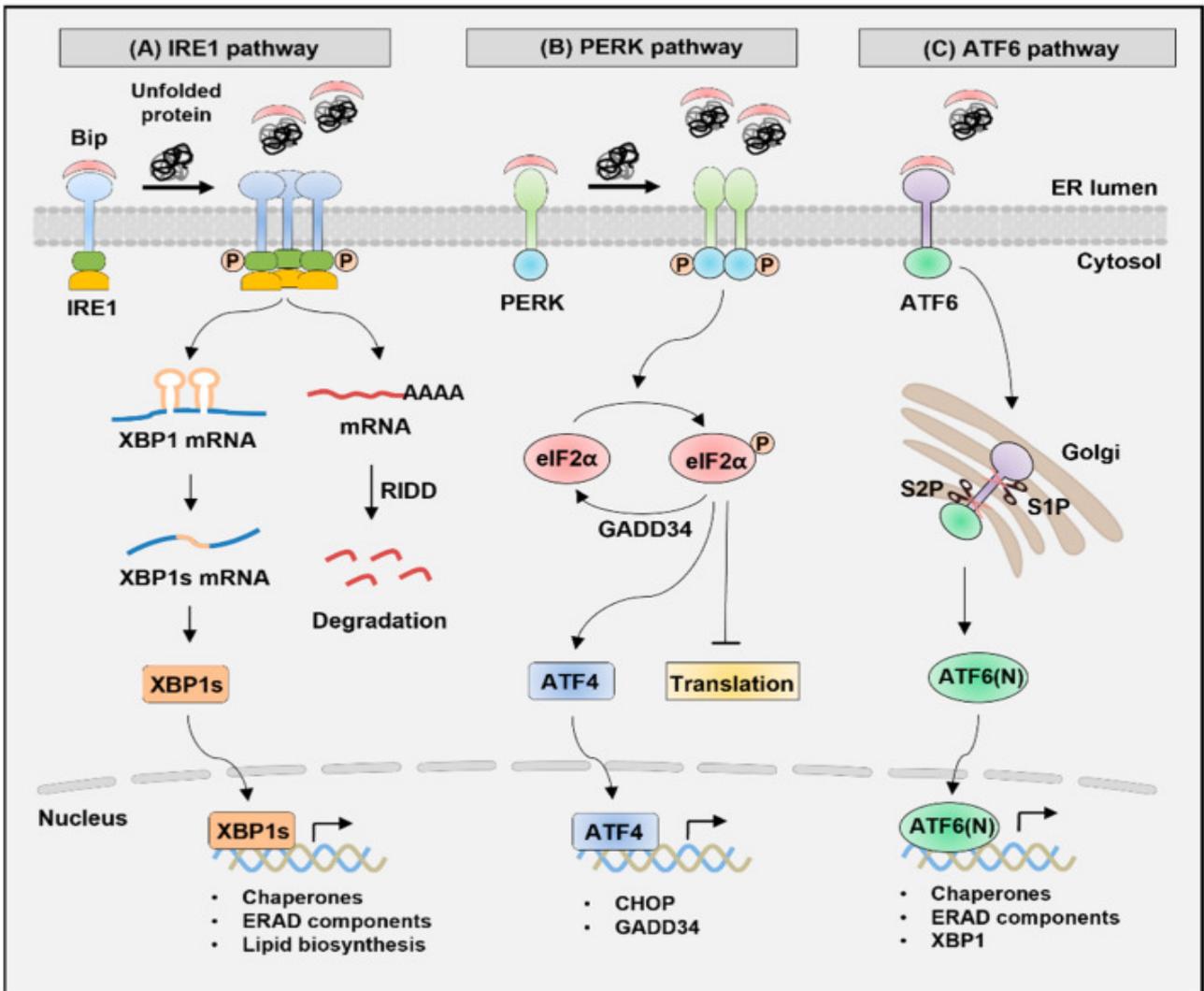
#### 1.2.4 Die Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>, Pkhd1-Cre-Mutante als Versuchsmodell

Das Pkd1<sup>R2216W</sup>-Mausmodell imitiert die humane Pkd1<sup>R2220W</sup> Mutation im Menschen. Diese Mutation stellt eine Punktmutation oder auch Missense-Mutation in der REJ-Domäne von PC1 dar. 2216 stellt hierbei die Position dar, an der die Aminosäure Arginin (R) durch die Aminosäure Tryptophan (W) ausgetauscht wurde. Beim Menschen befindet sich dieser Austausch an Position 2220 ebenfalls in der REJ-Domäne. Die Untersuchung dieser Mutation wurde ausgewählt, da davon ausgegangen wird, dass 25 % der Mutationen in Pkd1 Punktmutationen sind, von denen sich ca. 30 % in der REJ/GAIN (GPCR autoproteolytic-inducing) Region von PC1 befinden. Durch dieses Mausmodell ist es gelungen, ein repräsentatives Modell einer spezifischen „Missense-Mutation“ zu erzeugen, mit dessen Hilfe der Pathomechanismus und potentielle Therapieansätze für den Menschen untersucht werden können. Um das mutierte PC1 Protein detektieren zu können, wurde dieses mit einem V5-Epitop-Tag bestehend aus 14 Aminosäuren ausgestattet.

Die stärkste Ausprägung der ADPKD ergibt sich aus einem vollständigen loss-of-function. Bei Missense-Mutationen mit Austausch von Aminosäuren kommt es lediglich zu einer Beeinträchtigung der Tertiärstruktur, in Folge mit einer gestörten Proteinfunktion (Hopp et al., 2012). Der oben beschriebene Defekt in der REJ-Domäne führt zu einer fehlerhaften Spaltung von PC1, damit zu einem nur partiell seine Funktion erfüllenden Protein und letztlich auch zu einer Ausbildung von Zysten. Im Gegensatz zum vollständigen Verlust von PC1 führt die eingeschränkte Proteinfunktion zu einem längeren Überleben. Grund dafür ist die Tatsache, dass bei den Knock-out Mäusen eine sehr frühe Initiierung des Zystenwachstums beginnt und die Tiere meistens pränatal versterben. Die embryonale Letalität von Pkd1<sup>R2216W/R2216W</sup>-Tieren beträgt 80 %. Die übrigen 20 % entwickeln sehr früh ausgeprägte Zystennieren. Um den im Menschen vorkommenden „second hit“ zu imitieren, wurde das Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>, Pkhd1-Cre Modell entwickelt (Polycystic Kidney and Hepatic Disease 1). Pkhd1-Cre wird postnatal ausschließlich in der Niere und im Pankreas exprimiert (Ward et al., 2003). Durch die Kopplung der Cre-Rekombinase an das Pkhd1 wird das zweite Pkd1 Allel ausschließlich in der Niere und im Pankreas ausgeschaltet. Das verzögerte Ausschalten im Sinne des „second hit“ gelingt dadurch, dass Pkhd1 erst postnatal exprimiert wird. Der verzögerte Verlust des intakten Allels und die höhere PC1-Konzentration durch das zuvor intakte Protein sorgen für einen milderen Verlauf und ein längeres Überleben dieser Mauslinie.

### 1.3 Die Unfolded Protein Response (UPR)

Die meisten Proteine durchlaufen im Rahmen ihrer Translation aus der mRNA das endoplasmatische Retikulum (ER). Hier erhalten sie ihre korrekte Faltung. Ist der Faltungsprozess fehlerfrei abgeschlossen, werden die Proteine vom ER an das Zellplasma abgegeben. Hier verbleiben sie entweder im Zellplasma oder werden zur Weitergabe Richtung Zelloberfläche transportiert. Sind durch den Einbau falscher Aminosäuren Fehler in der Primärstruktur des Proteins aufgetreten, können durch Interaktionen der Aminosäuren Fehler in der Proteinfaltung auftreten. Häufen sich solche Fehler und kann das ER diese nicht einfach beheben, entsteht der sogenannte Faltungsstress innerhalb des ER-Lumens (ER-Stress). Dieser Stress löst eine Reaktionskaskade aus, die als Unfolded Protein Response (UPS) bezeichnet wird (Abb.2). Die UPR ist ein Mechanismus, um die Zelle vor weiterer Schädigung zu schützen. Dazu gehört die Einleitung der Transkription von verschiedenen Genen, die für ER-Chaperone und andere Signalwege kodieren. Chaperone haben die Aufgabe, die korrekte Faltung anderer Proteine zu unterstützen. Dies reduziert den ER-Stress und stabilisiert dessen Funktion bei der Proteinfaltung. Darüber hinaus wird der korrekte Transport von Proteinen zur Zelloberfläche unterstützt. Gelingt es durch diese Mechanismen nicht, den Faltungsstress zu reduzieren, wird als nächster Schritt der Reaktionskaskade die Einleitung der Apoptose der Zelle eingeleitet. Die UPR wird über 3 Transmembranproteine des ER initiiert, die auch als Sensoren für den ER-Stress agieren. IRE1 $\alpha$ , ATF6a und PERK (Todd et al., 2008; Walter und Ron, 2011).



**Abb. 2:** Signalkaskade der UPR mit ihren 3 nachgeschalteten Signalwegen von IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6. Nicht maßstabsgetreu (Park et al., 2021).

Für diese Arbeit liegt der Fokus auf dem Produkt der Signalkaskade von IRE1 $\alpha$ , dem Transkriptionsfaktor Xbp1s.

Die IRE1 $\alpha$ -Signalkaskade ist ein in vielen Spezies untersuchter und evolutionär hoch konservierter Signalweg. Kommt es durch falsch gefaltete Proteine zum ER-Stress, wird IRE1 $\alpha$  durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung aktiviert. Als primärer Schritt wird zunächst die Endoribonukleaseaktivität von IRE1 $\alpha$  aktiviert. Bei ausbleibender Reduktion des Faltungsstresses wird dann konsekutiv die Serin/Threonin-Kinase der zytosolischen Domäne aktiviert, was in einen apoptotischen Phänotyp mündet. Das aktivierte IRE1 $\alpha$  erkennt die Basenpaarung in der Haarnadelschleife (stem-loop structure) der einzelsträngigen Xbp1-mRNA und beginnt mit dem Spleißen der mRNA, indem es 26

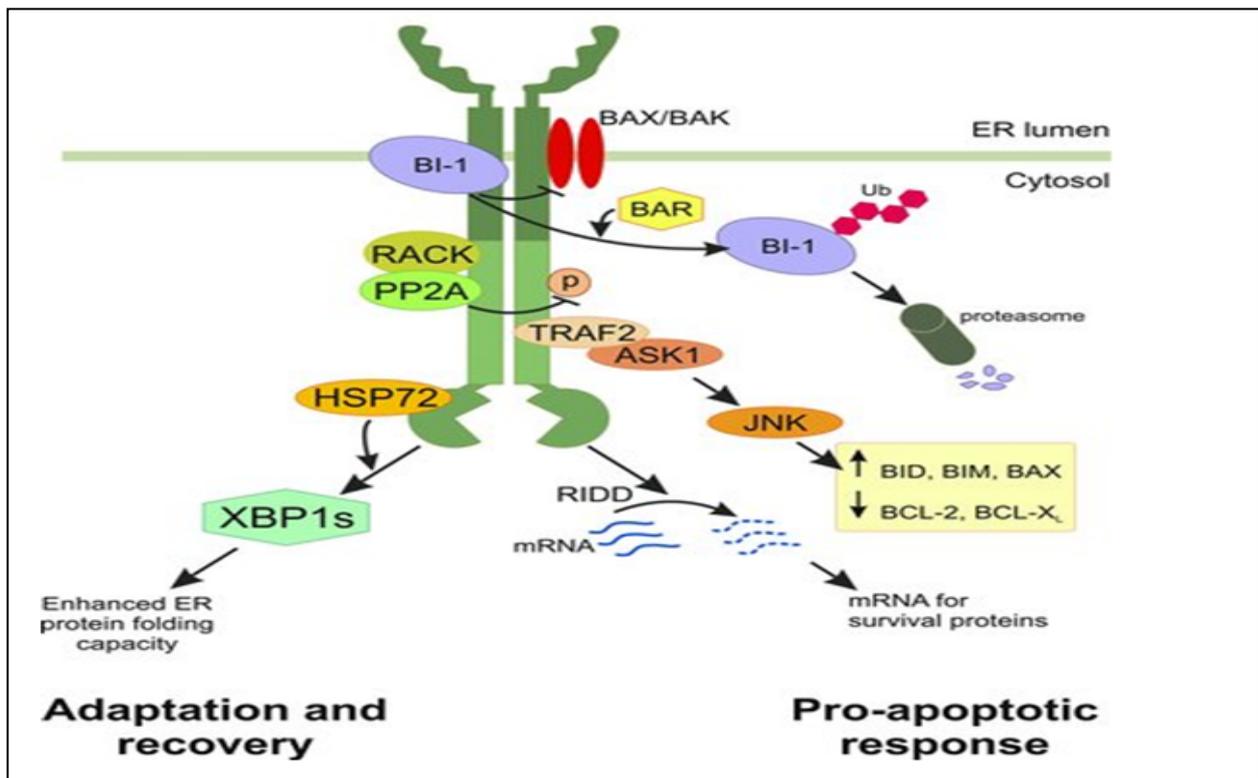
Intronnukleotide herausschneidet. Diese gespleißte mRNA wird nun im Zytosol nach üblichem Muster translatiert und es entsteht der Transkriptionsfaktor Xbp1s. Xbp1s migriert in den Zellkern und initiiert die Transkription seiner Zielgene wie unter anderem von Chaperonen. Nur die gespleißte Form Xbp1 ist als Transkriptionsfaktor aktiv (Yoshida et al., 2001).

Eine weitere Aufgabe von IRE1 $\alpha$  ist die regulierte IRE1 $\alpha$ -dependent decay (RIDD). Bei diesem Prozess wird die mRNA anderer Zielproteine vor dem Erreichen des ER im Zytosol abgebaut, um den ER-Stress zu reduzieren. Dadurch wird die Überladung des ER mit weiteren potentiell falsch gefalteten Proteinen verhindert (Park et al., 2021). IRE1 $\alpha$  verfügt über eine dritte Funktion, die den Organismus vor einer fehlregulierten Proteinfunktion der Zelle schützen soll: Die Initiierung der Zellapoptose. Konnte der ER-Stress durch die oben genannten Wege nicht ausreichend reduziert werden, wird über IRE1 $\alpha$  die Apoptose eingeleitet (Bernales et al., 2012; Jager et al., 2012; Sano und Reed, 2013). Die zytosolische Kinase von IRE1 $\alpha$  initiiert die Apoptose durch die Bindung von TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2) (Abb. 3). An TRAF2 bindet nun ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) und dadurch wird c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert. JNK kann als MAP-Kinase über die Aktivierung von Caspase 12 die Apoptose einleiten (Dhanasekaran und Reddy, 2008; Nishitoh et al., 2002; Todd et al., 2008; Urano et al., 2000).

Neben IRE1 $\alpha$  gibt es in Säugetieren zwei weitere Signalwege: PERK und ATF6. PERK wird ebenfalls durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung seiner im Zytosol gelegenen Serin/Threonin-Kinase bei ER-Stress aktiviert. Durch die Kinase wird eIF2 $\alpha$  an dessen Serin an Stelle 51 phosphoryliert. Die Folge ist eine Reduktion des ER-Stresses durch eine Verringerung der Translationsrate von Proteinen (Harding et al., 1999; Park et al., 2021; Shi et al., 1998). Als zweiter Signalweg fördert eIF2 $\alpha$  selektiv die Translation von ATF4. ATF4 wiederum aktiviert die Transkription von CHOP und GADD34. Dieser Schritt ist wichtig, damit nach erfolgreicher Reduktion von ER-Stress die Proteintranslation wieder weiterlaufen kann. GADD34 und PP1 katalysieren die Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und hemmen so mittels negativer Rückkopplung die weitere Depression der Translation durch eIF2 $\alpha$  (Park et al., 2021).

Bei ER-Stress migriert ATF6 vom ER in den Golgi-Apparat und wird dort durch die Proteasen S1P und S2P gespalten. Diese Spaltung erzeugt den N-Terminus von ATF6(N).

ATF6(N) fungiert als Transkriptionsfaktor und induziert die Transkription von anti-ER-Stress Proteinen wie Chaperonen, ERAD-Proteinen und XBP1, dessen mRNA wiederum durch die RNase von IRE1 $\alpha$  gespleißt wird, um den Transkriptionsfaktor Xbp1s zu generieren (Haze et al., 1999; Park et al., 2021).



**Abb. 3:** IRE1 $\alpha$ -Signalkaskaden mit adaptiv-protectivem und apoptotischem Signalweg. Nicht maßstabsgetreu (Jäger et al., 2012).

### 1.3.1 Die UPR bei ADPLD

Untersuchungen der molekularen Grundlagen der ADPLD (autosomal dominant polycystic liver disease) haben gezeigt, dass die Krankheit u.a. auf einer Synthesestörung von PC1 und PC2 beruht und dass eine Hochregulierung von Xbp1s einen positiven Einfluss auf das Überleben der Zellen hat. Eine verminderte PC1-Funktion kann durch die Hochregulierung von Xbp1s abgepuffert werden, indem eine verbesserte Spaltung an der GPS oder ein Schutz vor frühzeitiger Apoptose erreicht werden (Fedele et al., 2014).

Wie bei der ADPKD kommt es auch bei der ADPLD durch einen „second hit“ eines noch gesunden Allels, bei zeitgleich schon bestehendem kranken Allel zur Ausbildung von Leberzysten. Die beiden führenden Gene, die bei der ADPLD betroffen sind, sind die Gene

Prkcsh und Sec63 (Davilla et al., 2004; Li et al., 2003; Watnick et al., 1998). Aufgabe von Prkcsh und Sec63 ist die Qualitätskontrolle der Faltung von Transmembranproteinen, die das ER durchwandern und von dort aus an ihren Zielort migrieren. Die Ausbildung der Zysten setzt jedoch erst dann ein, wenn neben den erkrankten Allelen eine Synthesestörung von PC1 oder PC2 vorliegt. Dies tritt durch die ausbleibende Qualitätskontrolle durch die geschädigten Genprodukte von Prkcsh und Sec63 ein. Insbesondere eine zu geringe Konzentration von funktionstüchtigem PC1 führt dann zu einer Ausbildung der Zysten (Fedeles et al., 2011, 2014).

Die Parallelen in den zugrundeliegenden Pathomechanismen von ADPKD und ADPLD konnte nach organspezifischer Inaktivierung der entscheidenden Gene dargestellt werden (Fedeles et al., 2011). In einem Mausmodell mit dem Hintergrund einer ADPLD, konnte durch Inaktivierung von Prkcsh der Zusammenhang zwischen der UPR mit Aktivierung des IRE1 $\alpha$ -Xbp1s-Signalweges und der PC1-Konzentration nachgewiesen werden. Eine Hochregulation von Xbp1s führt bei einer PC1-Funktionsstörung zu Dosissteigerung und einer Verbesserung der Proteinfunktion von PC1 (Fedeles et al., 2015).

**Tab. 1:** Verantwortliche Gene und Pathomechanismen bei ADPKD und ADPLD

Krankheit	Gen	Proteinprodukt	Merkmale	Pathomechanismus
ADPKD	Pkd1	PC1 - ziliärer Mechano-/chemorezeptor	Nierenzysten Gallengangszysten	„Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPKD	Pkd2	PC2 - ziliäres und ER-Membranprotein; nicht-sel. Kationen-Kanal	Nierenzysten Gallengangszysten	Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPLD	PRKCSH	GII-beta/luminales ER-Protein; Proteinfaltung	Gallengangszysten	„Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPLD	SEC63	Sec63/ER- Membranprotein	Gallengangszysten	Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPLD	ALG8	Asparagin-linked glycosylation 8/ER Membranprotein	Gallengangszysten	Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPLD	GANAB	GII $\alpha$ /luminales ER-Protein; Proteinfaltung	Gallengangszysten	Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung
ADPLD	SEC61b	Sec61/ER- Membranprotein	Gallengangszysten	Two-hit“-Modell PC1-Dosis abhängige Zystenentstehung

### 1.3.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Einflusses einer Hochregulierung von Xbp1s auf die ADPKD in einem murinen Pkd1 Missense Mutationsmodell. Ich habe eine Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>, Pkd1-Cre, ROSA26-Xbp1s Mauslinie mit hochregulierter Xbp1s Expression mit einer Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>, Pkd1-Cre Mauslinie verglichen, die den zystischen Phänotyp in den Nieren aufweist. Dazu wurden die Nierenmorphologie, die Nierenfunktionsparameter, das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Tubuluszellen beider Mauslinien vergleichend analysiert. Ziel war es zu erkennen, ob durch den Einfluss von Xbp1s das Zystenwachstum verlangsamt und die Nierenfunktion länger erhalten wird, um so potentielle therapeutische Ansätze für den Menschen zu identifizieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Mäusestämme

Alle Versuche, die zur Erkenntnisgewinnung und Datenerhebung durchgeführt wurden, erfolgten an Mäusen und den aus ihnen entnommenen Proben wie Blut und Nierengewebe. Die Genehmigung unserer Versuche durch das Yale University Institutional Animal Care and Use Comitee war die Voraussetzung für unsere Experimente. Die verwendeten Mauslinien wurden von uns im Somlolarlabor des Yale Institutes für Nephrologie durch entsprechende Kreuzung generiert. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Die Tiere wurden unter einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus und unter 22 °C Raumtemperatur gehalten. Die Euthanasierung der Tiere erfolgte je nach Untersuchung und Genotyp an (p=Tag post-natal) p11, p16, p24 und nach 48 Wochen postnatal, um einen Vergleich im Progress der Zystenentstehung zwischen den verschiedenen Genotypen, u.a. nach Abschalten von Pkd1 und Aktivierung von Xbp1s, darstellen zu können. Die Euthanasierung erfolgte durch eine intraperitoneale Ketamin-Xylin-Injektion. Zuerst erfolgte eine Blutentnahme aus dem Herzen. Dann wurde der Organismus durch eine PBS Injektion in die linke Herzkammer perfundiert und anschließend eine Niere entnommen und schockgefroren. Im nächsten Schritt erfolgte die Injektion einer 4 % Paraformaldehyd (PFA) Lösung in die linke Herzhälfte zur Fixierung der zweiten Niere, diese wurde anschließend entnommen.

Für die Messung der BUN-Konzentration (Blood Urea Nitrogen) wurde Blut entnommen. BUN stellt den im Harnstoff gebundenen Stickstoff dar ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ), der als Parameter für den Proteinabbau und die Nierenfunktion bestimmt werden kann. Die entnommenen Nieren wurden histologisch, immunhistochemisch und mittels Western Blot analysiert.

### 2.2 Entwicklung des Pkd1<sup>R2216W</sup> Allels in der Maus

Die Pkd1<sup>R2216W</sup> Punktmutation wurde mittels CRISP/CAS9 Methode erzeugt. Mit Hilfe dieser Methode wurde zudem ein V5 Epitop-Marker eingesetzt, mit dessen Hilfe das veränderte Protein immunhistochemisch identifiziert werden konnte. Das Editieren des Mausgenoms wurde durch externe Anbieter durchgeführt: Jeweils zwei sgRNAs (CCCACAGGTAGTGCCAGCCG für Pkd1<sup>R2216W</sup>, CCTAGGGCCTAAGTGCTGCT für den V5 Epitop-Marker) wurden mit CRISPR entwickelt. Um die genetischen Veränderungen

präzise durchführen zu können wurden 2 Einzelstrang Oligodeoxynukleotiddonoren (ssODN) Templates, jeweils mit der Punktmutation Pkd1<sup>R2216W</sup> und dem V5 Epitop-Marker am C-Ende direkt vor dem Stopcodon, verwendet, die von Integrated DNA Technologies (IDT) hergestellt wurden. Die sgRNAs wurden unter Verwendung des MEGAshortscript<sup>TM</sup>-Kits (ThermoFisher) transkribiert. Die in vitro transkribierten sgRNAs, das Cas9-Protein von New England Biolabs (NEB) und die beiden ssODN-Spendervorlagen wurden in befruchtete Zygoten mikroinjiziert, anschließend wurden Blastozysten vom Yale Genome Editing Center in die Gebärmutter von scheinschwangeren ICR-Weibchen (Institute of Cancer Research) übertragen. Die entstandenen Mäuse wurden mittels PCR und Sangersequenzierung genotypisiert. Es ergaben sich zwei Gründertiere mit V5 Epitop-Marker und Pkd1<sup>R2216W/R2216W</sup> Genotyp, darüber hinaus ergab sich ein Gründertier mit einem V5-Epitop-Marker und Pkd1 Wildtyp.

Eine jeweils mit Cre/loxP-Technologie erzeugte nierenspezifische Xbp1-hochregulierte ROSA26-Xbp1s Mauslinie wurde mit der Pkd1<sup>R2216W</sup> Mauslinie gekreuzt, um den Genotyp der Versuchstiere (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s) zu erhalten. Hierbei wurde durch die Cre-Recombinase das Pkd1 aus- und ROSA26-Xbp1s angeschaltet. Die ROSA26-Position stellt eine Region auf Chromosom 6 beim Mäusen dar, die sich durch eine gleichbleibend starke Transkription von inserierten Genen (Knock-In) auszeichnet.

### 2.3 Genotypisierung

Alle neugeborenen Mäuse wurden am dritten Tag postnatal genotypisiert und markiert um potentielle Versuchstiere zu identifizieren. Dazu wurde eine Gewebeprobe aus Schwanz oder Ohr entnommen und anschließend in Tail-Lysis Puffer über Nacht bei 55 °C in einem Wasserbad inkubiert. Das Lysat wurde am Folgetag für 10 min bei 90 °C erhitzt um die Proteinkinase K zu inaktivieren. Nach 10 min Abkühlen auf Eis erfolgte das Zentrifugieren des Lysats bei 2000 rpm für 10 min um Zellreste zu entfernen. Der Überstand beinhaltete die zu untersuchende DNA und wurde bei -20 °C aufbewahrt und im weiteren Verlauf für die PCR verwendet. Auf eine weitere Aufreinigung der DNA haben wir aufgrund einer ausreichenden Menge an Probenmaterial verzichtet.

#### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von klar definierten DNA-Abschnitten. Für die Herstellung von 25 µl Standard-Reaktionsansatz und

die Synthese der gewünschten DNA Kopien wurden folgende Schritte durchgeführt: (1) In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Thermo Fischer Scientific, TMS) wurden nacheinander 9,3 µl H<sub>2</sub>O (steril), 12,5 µl PCR Puffer, 2 µl DNA-Probe, jeweils 0,5 µl Fw- und Rv-Primer und 0,2 µl Taq-Polymerase (TMS) pipettiert. (2) Das Eppendorf-Reaktionsgefäß mit den 25 µl Reagenz wurde in den PCR-Thermocycler (Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler) gestellt und dieser wurde verschlossen. (3) Nun wurde das entsprechende Programm eingestellt (je nach Primer und gewünschter DNA Sequenz variierten die Zeiten und Temperaturen der Reaktionszyklen). Für die Genotypisierung meiner Versuchstiere wurden folgende Primer verwendet:

**Tab. 2:** Primer, die für die Genotypisierung verwendet wurden

Ziel	Sequenz
Pkd1 RW-V5	Forward 5'-AAG TCT GCT TGT CCA GTT TGA C-3' Reverse 5'-ACC CTG GGT CCT GGC TGG CCA-3'
Pkd1-flox	Forward 5'-CAC AAC CAC TTC CTG CTT GGT G-3' Reverse 5'-CCA GCA TTC TCG ACC CAC AAG-3'
Pkhd1-Cre	Forward 5'-CTG GTT GTC ATT GGC CAG G-3' Reverse 5'-GCA TCG ACC GGT AAT GCA GGC-3'
ROSA26-Xbp1s	Forward 5'- TAC ACT GCC TGG AGG ATA GCA- 3' Reverse 5'- ACC AGG TTA GCC TTT AAG CCT- 3'

**Tab. 3:** Reaktionsansatz für einen vollständigen PCR-Durchlauf

Substanz	Vol. für 25 µl Ansatz
PCR-Puffer	12,5 µl
H <sub>2</sub> O (steril)	9,3 µl
DNA Probe	2 µl
Fw-Primer	0,5 µl
Rv-Primer	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

**Tab. 4:** PCR-Programme (ROSA26-Xbp1s, Pkhd1-Cre; RW-V5, Pkd1-flox)

ROSA26-Xbp1s			Pkhd1-Cre;RW-V5			Pkd1-flox		
Schritt	Grad	Dauer	Schritt	Grad	Dauer	Schritt	Grad	Dauer
1.	95 °C	5 min	1.	95 °C	5 min	1.	95 °C	3 min
2.	94 °C	30 sec	2.	94 °C	30 sec	2.	94 °C	30 sec
3.	55 °C	30 sec	3.	55 °C	30 sec	3.	62 °C	45 sec
35 Zyklen			35 Zyklen			34 Zyklen		
4.	72 °C	1 min	4.	72 °C	1 min	4.	72 °C	1 min
5.	72 °C	3 min	5.	72 °C	3 min	5.	72 °C	7 min

### 2.3.2 Agarosegel-Elektrophorese

Das Verfahren der Agarosegel-Elektrophorese wird verwendet um die Reinheit und die Größe der PCR-Produkte zu bestimmen. Grundlegendes Prinzip bei der Auftrennung der PCR Produkte ist die größenabhängige Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Moleküle im Agarosegel. (1) Um 1000 ml eines 2 % Agarosegels herzustellen, wurden 20 g pulverförmige Agarose in 1000 ml TAE Puffer unter Aufkochen gelöst und das Gel in die Elektrophoreseschale gegossen. (2) Während des Abkühlens wurde Ethidiumbromid hinzugegeben. (3) Die PCR-Produkte wurden mit einem Loading Dye (TMS) im Verhältnis 1:5 verdünnt. (4) 10 µl der Verdünnung wurden in eine Tasche des 2 % Agarosegels gegeben. (5) Die Anode und Kathode wurden an die Elektrophoreseschale angeschlossen und eine Spannung von 120 V für ca. 1,5 h angelegt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren wanderten entsprechend ihrer Größe entlang der Spannung von der Kathode zur Anode. Durch das Hinzufügen von Ethidiumbromid und dessen Interaktion mit den Nukleinsäuren konnten diese im Gelstreifen nach erfolgreicher Elektrophorese unter einem UV-Transluminator sichtbar gemacht und abschließend ausgewertet werden. In der Regel wurden 5-10 verschiedene Proben eines zu untersuchenden Allels auf einem Gel aufgetragen, um ein entsprechendes Versuchstier mit gewünschtem Genotyp zu identifizieren.

Neben den zu analysierenden Proben wurde stets eine Positivkontrolle auf das Gel aufgetragen.

#### 2.4 Bestimmung des Cystic Index

Ziel des Cystic Index ist es, die durch die Zysten eingenommene Fläche im Präparat in Relation zur Gesamtfläche des Präparates zu stellen. Hierdurch lässt sich die Ausprägung der Zystenbildung bei den verschiedenen Genotypen quantifizieren und vergleichen.

Die histologische Auswertung der entnommenen Nieren erfolgte unter einem Lichtmikroskop an HE-gefärbten Präparaten. Die histologische Auswertung war wichtig um die Morphologie und Architektur des zugrundeliegenden Genotyps im Präparat zu verstehen und unsere Arbeitshypothese zu testen. Bei der Vorbereitung der Präparate achteten wir sorgfältig darauf die Nieren möglichst sagittal zu schneiden um einen vollständigen Durchmesser der entnommenen Nieren abzubilden. Die HE-Färbung wurde durch einen externen Anbieter, die Histology Consultation Services Inc. (Everson, WA, USA) durchgeführt und die fertigen HE-Präparate wurden uns zur Auswertung zugesendet. Die HE-Färbung basiert auf der Anwendung von zwei verschiedenen Farbstoffen. (1) Hämatoxylin färbt alle sauren und basophilen Strukturen, wie Zellkerne und die darin enthaltene DNA, blau. (2) Eosin färbt als saurer Farbstoff basische bzw. azidophile Bestandteile rot. Saure Strukturen stellen Zellplasmaproteine, Mitochondrien, Keratin und Kollagen dar, also erscheint auch das Zytoskelett in einer HE-Färbung rot. Das Präparat wurde als „whole kidney scan“ einer bildtechnischen Analyse unterzogen. (1) Das Präparat wurde bei 4-facher Vergrößerung unter einem Nikon Eclipse TE2000-U Mikroskop vollständig eingescannt. (2) Mittels der Software Metamorph erfolgte die Bestimmung des Cystic Index (CI). (3) Ich schnitt manuell den gesamten Scan der Niere am Computer aus und platzierte diesen auf einem einfarbigen Hintergrund. Der Kontrast stellte sich automatisch ein, um eine Verfälschung durch den Untersucher zu verhindern. (4) Die Software ermittelte aus dem durch die angeschnittenen Zysten detektierbaren Hintergrund nun den Anteil der Zysten an der Gesamtfläche des HE-Schnittes. Da das Nierenparenchym im gesunden Phänotyp aufgrund seiner histologischen Natur wie Nierenbecken, Sammelrohre und Tubuli ebenfalls geringe Anteile ohne weitere Färbung auf dem Hintergrund aufwies, musste ein „Standardanteil“ abgezogen werden.

## 2.5 Immunfluoreszenzfärbung

### 2.5.1 Ki67-Färbung

Ziel der Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen Ki67 ist die optische Darstellung von Tubuluszellen der Niere, die sich in der Proliferation befinden. Die ausschließliche Darstellung von proliferierenden Zellen ist möglich, da Ki67 nur in den Phasen des Zellzyklus (G1, G2, S, M), nicht aber in der G0-Phase von ruhenden Zellen vorhanden ist. Für die Färbung und anschließende Auswertung wurden Kryoschnitte der Nieren mit einer Dicke von 5-7  $\mu\text{m}$  angefertigt. Für die Schnitte wurden die Nieren verwendet, die nach einer Perfusion des Organismus mit 4 % PFA aus den Mäusen entnommen wurden. Die Nieren wurden nach der Entnahme über Nacht in einer 30 % Sucroslösung bei 4 °C fixiert. Anschließend wurden aus ihnen Kryoschnitte angefertigt. Die Schnitte durchliefen folgende Arbeitsschritte: (1) Spülung für 15 min mit 1xTBS (Tris-Buffered Saline) und anschließend Inkubation für 30 min in einer 0,1 % Natriumborohydrid/1xTBS Lösung, um eine Autofluoreszenz des Gewebes zu verhindern und um freie Aldehydgruppen der 4 % PFA Lösung zu eliminieren. (2) Behandlung der Schnitte für maximal 5 min mit 1 % SDS, um eine optimale Permeabilität für die Antikörper und die Blockierlösung zu erzeugen. (3) Dreimaliges Waschen mit 1xTBS. (4) Inkubation in 0,2 %/BSA/10 % Ziegen-Serum in 1xTBS bei 4 °C, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. (5) Abschluss der Vorbereitung durch erneutes Spülen mit 1xTBS. (6) Anti-Ki67-Primärantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt und 30  $\mu\text{l}$  der Antikörperlösung wurden für jeden Gewebeschnitt verwendet. (7) Die Inkubation wurde über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer durchgeführt. (8) Darauf folgte ein dreimaliges Waschen mit 1xTBS für jeweils 5 min und anschließendes Auftragen des Sekundärantikörpers mit 1 h Inkubation bei Raumtemperatur. Bei diesem Schritt wurde zur Identifizierung und Unterscheidung zwischen Sammelrohr- und proximalen Tubulusabschnitten gleichzeitig mit Lektinen (Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) für das Sammelrohr und Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL) für den proximalen Tubulus) gegengefärbt. (9) Mit einer Hoechst-Lösung wurden die Zellkerne angefärbt, indem je 50  $\mu\text{l}$  Hoechst-Lösung pro Gewebeschnitt aufgetragen wurden. (10) Es folgte ein dreimaliges Waschen für 5 min mit 1xTBS. (11) Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf dem Objektträger fixiert. Die verwendeten Antikörper und Lektine lassen sich Tabelle 5 und 6 entnehmen.

Zur Analyse der gefärbten Schnitte wurden die Objektträger unter einem Nikon Eclipse TE2000-U Fluoreszenzmikroskop beurteilt und mit Hilfe der NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Tokyo) aufgenommen. Die visuelle Bearbeitung der Bilder und das Auszählen der Zellen erfolgten mit Adobe Photoshop (Version 2015). Es wurden mindestens 1000 DBA/LTL-positive Zellen pro Nieren ausgezählt, sodass ein repräsentatives Ergebnis vorlag.

**Tab. 5:** Antikörper für die Ki67-Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Rabbit-Anti-Ki67	TMS	1:500 in Blockierlösung
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit Alexa Fluor®	TMS	1:500 in Blockierlösung

**Tab. 6:** Lektine bei der Ki67-Färbung

Lektin	Hersteller	Verdünnung
Fluorescein labeled DBA	Vector laboratories	1:500 in Blockierlösung
Fluorescein labeled LTA	Vector laboratories	1:500 in Blockierlösung

### 2.5.2 Durchführung des TUNEL-Assays

Ziel des TUNEL-Assays ist die Darstellung von Apoptosezellen. Es wurden wiederum Kryoschnitte von 5-7 µm Stärke verwendet, die aus den mit 4 % PFA perfundierten Nieren gewonnen und in einer 30 % Sucroslösung fixiert wurden. (1) Es folgte ein dreimaliges Waschen des Schnittes mit 1xPBS für 5 min. (2) Der Schnitt wurde mit 1xPBS/0,1 % Natriumcitrat/0,1 % Triton-X-100 behandelt und für exakt 2 min auf Eis inkubiert, um eine ausreichende Permeabilität des Gewebes gewährleisten zu können. (3) Danach erfolgte ein zweifacher Waschgang mit 1xPBS für jeweils 5 min. und (4) die Inkubation des Schnittes mit dem TUNEL Reaction-Mix (50 µl Enzymlösung + 450 µl Markerlösung) bei 37 °C für ca. 80 min. Für eine optimale Befeuchtung des Schnittes werden 80 µl des Reaction-Mix verwendet. (5) Danach schloss sich eine 5-minütige Waschung in 1 % PBS an. (6) Das Gegenfärben erfolgte mit Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) für das Sammelrohr und Lotus Tetragonolobus Lectin (LTL) für den proximalen Tubulus durch Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. DBA und LTL wurden jeweils in 1xPBS verdünnt. (7) Eine Zellkernfärbung erfolgte nach Hoechst mit einer 50 µl Lösung, im Anschluss daran ein (8) dreimaliges Abwaschen mit 1xPBS für jeweils 5 min. (9) Das Glasplättchen wurde mit Mowiol

auf dem Objektträger fixiert. Zur Analyse der gefärbten Schnitte wurden die Objektträger erneut unter einem Nikon Eclipse TE2000-U Fluoreszenzmikroskop beurteilt und mit Hilfe der NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Tokyo) aufgenommen. Die visuelle Bearbeitung der Bilder und das Auszählen der Zellen erfolgten mit Adobe Photoshop (Version 2015). Es wurden mindestens 1000 DBA/LTL-positive Zellen pro Nieren ausgezählt, um ein valides Ergebnis zu erzielen. Der Farbkontrast wurde jeweils um den gleichen Wert erhöht, um sowohl das Farbsignal besser sichtbar zu machen als auch die Vergleichbarkeit der Bilder gewährleisten zu können. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen, wurden mindestens 1000 DBA/LTL-positive Zellen pro Nieren ausgezählt

**Tab. 7:** Lektine beim TUNEL-Assay

Lektin	Hersteller	Verdünnung
Fluorescein labeled DBA	Vector laboratories	1:500 in 1xPBS
Fluorescein labeled LTA	Vector laboratories	1:500 in 1xPBS

### 2.5.3 Immunfluoreszenz Darstellung von Xbp1s

Ziel der immunhistochemischen Detektierung von Xbp1s in der Niere des untersuchten Mausmodells ist die Kontrolle der Xbp1s-Expression bei bekanntem Genotyp. Es wurden wieder Kryoschnitte von 5-7  $\mu\text{m}$  Stärke verwendet, die aus den mit 4 % PFA perfundierten Nieren gewonnen und in einer 30 % Sucroselösung fixiert wurden. (1) Darauf erfolgte dreimaliges Waschen des Schnittes mit 1xPBS für 5 min. (2) Der Schnitt wurde mit 1xPBS/0,1 % Natriumcitrat/0,1 % Triton-X-100 behandelt und für exakt 2 min auf Eis inkubiert, um eine ausreichende Permeabilität des Gewebes gewährleisten zu können. (3) Danach wurde das Material zweifach mit 1xPBS für jeweils 5 min gewaschen. (4) Eine Inkubation in 0,1 %/BSA/10 % Ziegen Serum in 1xPBS bei 4 °C erfolgte, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. (5) Den Abschluss der Vorbereitung bildete erneutes Spülen mit 1xPBS. (6) Die Primärantikörper wurden in Blockierlösung verdünnt (siehe Tabelle 8); 30  $\mu\text{l}$  der Antikörperlösung wurden für jeden Gewebeschnitt verwendet. (7) Über Nacht wurde das Material bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. (8) Dreimaliges Waschen mit 1xPBS erfolgte für jeweils 5 min und anschließendes wurde der Sekundärantikörper mit 1 h Inkubation bei Raumtemperatur aufgetragen. Bei diesem Schritt wurde zur Identifizierung und Unterscheidung zwischen Sammelrohr- und proximalen Tubulusabschnitten gleichzeitig mit Lektinen gefärbt (Tab. 9). (9) Mit einer Hoechst-Lösung wurden die

Zellkerne angefärbt, indem je 50 µl Hoechst-Lösung pro Gewebeschnitt aufgetragen wurden. (10) Es folgte ein Dreimaliges Waschen für 5 min mit 1xPBS. (11) Die Deckgläschen wurden mit Mowiol auf dem Objektträger fixiert.

Zur Analyse der gefärbten Schnitte wurden die Objektträger unter einem Nikon Eclipse TE2000-U Fluoreszenzmikroskop beurteilt und mit Hilfe der NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Tokyo) aufgenommen. Die visuelle Bearbeitung der Bilder und das Auszählen der Zellen erfolgten mit Adobe Photoshop (Version 2015). Es wurden mindestens 1000 DBA/LTL-positive Zellen pro Nieren ausgezählt.

**Tab. 8:** Antikörper für Xbp1s-Immunfluoreszenz

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Rabbit-Anti-Xbp1s	Sigma-Aldrich	1:200 in PBS
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit Alexa Fluor®	TMS	1:500 in PBS

**Tab. 9:** Lektine bei Xbp1s Immunfluoreszenz

Lektin	Hersteller	Verdünnung
Fluorescein labeled DBA	Vector laboratories	1:500 in 1xPBS
Fluorescein labeled LTA	Vector laboratories	1:500 in 1xPBS

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Proteinextraktion

Um weitere Proteine aus den Nieren analysieren zu können, mussten diese zunächst aus dem Nierengewebe isoliert werden. Für den Western Blot wurden die Nieren verwendet, die nach der Euthanasierung mit einer 1xPBS Lösung perfundiert und anschließend schockgefroren wurden. Diese Nieren wurden bis zu den nun folgenden Arbeitsschritten bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. (1) Die Niere wurde mit Hilfe eines Gewebemixers und je  $600\text{ }\mu\text{l}$  Fungs-Puffer pro Organ für ca. 1 min auf Eis homogenisiert. Zuvor wurden 10 ml Lyse-puffers mit einer Protease-Inhibitor Tablette versetzt. (2) Das Nierenlysat wurde für 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 3000 rpm zentrifugiert. Hierdurch wurden das Proteinlysat und andere Zellbestandteile voneinander getrennt. (3) Das Proteinlysat wurde vorsichtig abpipettiert und in einem Eppendorf-Gefäß bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Proteinbestimmung nach Bradford werden  $20\text{ }\mu\text{l}$  des Proteinlysats verwendet.

### 2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford ist eine photometrische Methode, benannt nach dem amerikanischen Biochemiker Marion M. Bradford. Dieses Verfahren basiert auf einer Reaktion zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (G-250) und den Proteinen im Lysat. G-250 besitzt ein Absorptionsmaximum bei 465 nm, das sich bei einer Durchmischung von G-250 und dem Lysat auf 595 nm verschiebt. Diese Verschiebung beruht auf der Komplexbildung zwischen dem negativ geladenen Farbstoff und den positiv geladenen, nichtpolaren Seitenketten der Proteine. Die Verschiebung des Absorptionsmaximums führt zu einem optischen Farbumschlag, der proportional zur Proteinkonzentration der Probe ist. Mittels Photometer kann so die Konzentration bestimmt werden. Die Genauigkeit dieser Methode erlaubt die Bestimmung von Konzentrationen im Bereich  $0,1 - 8\text{ mg/ml}$ . Bevor die Messung der Proteinkonzentration in den Lysaten erfolgen kann, muss das Photometer geeicht werden. Die Standardkurve wurde für diese Arbeit mit Hilfe einer BSA-Lösung erstellt. Die entsprechende Eichreihe bestand aus fünf Proben mit definierten Albuminkonzentrationen (BSA  $5\text{ mg/ml}$ ;  $2,5\text{ mg/ml}$ ;  $1,25\text{ mg/ml}$ ;  $0,625\text{ mg/ml}$ ;  $0,5\text{ mg/ml}$ ;  $0,25\text{ mg/ml}$ ). Der Nullwert wurde gegen die BSA-Lösung ohne Proteine geeicht. Die Konzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte mit je  $5\text{ }\mu\text{l}$  Lysat +

250 µl des fertigen Bradford-Reagenz (BioRad). Dieses Gemisch wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Am Ende erfolgte die Messung der Extinktion durch einen Nano-Drop™2000/2000c Spektralphotometer (TMS).

### 2.6.3 Vorbereitung der Proben für den Western Blot

Die Lysate wurden mit 5x loading dye im Verhältnis 1:4 (Lysat/loading dye) versetzt, für 5 min in siedendem Wasser erhitzt und anschließend direkt auf Eis abgeschreckt, um eine erneute Faltung der Proteine zu verhindern. In diesem Zustand konnten sie bei 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, haben wir die Taschen des Gels stets mit 40 µg Protein geladen.

### 2.6.4 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Dieses Verfahren basiert auf der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem SDS-Polyacrylamid-Gel, das in einem elektrischen Feld eingespannt wurde. Sodiumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihnen eine negative Ladung verleiht. Durch die gleichsame negative Ladung stoßen sich die Proteine voneinander ab. Dies - in Kombination mit der Denaturierung durch das Aufkochen - sorgt dafür, dass sich die Proteine in einem linear ausgerichteten, entfalteten Zustand befinden und so die Wanderungseigenschaft der Proteine während der Gelelektrophorese vorrangig durch das Molekulargewicht bestimmt wird. Für die Gelelektrophorese wurden Gele (Novex Tris-Acetate Gel) der Firma Thermo Fischer Scientific (TMS) mit einer Polyacrylamidkonzentration von 8 % benutzt. Auch der Laufpuffer (Novex Tris-Acette Running Buffer) wurde uns vorgefertigt von TMS zur Verfügung gestellt. Das Gel wurde in einer Laufkammer eingespannt, die schon mit dem Laufpuffer gefüllt war. Anschließend wurden die Kammern mit dem Protein beladen und eine Spannung von 120 V für einen Zeitraum von 2 h angelegt. Dass sie Reaktion wirklich ablief, konnte durch das Aufsteigen kleinster Bläschen an der Laufkammer kontrolliert werden.

### 2.6.5 Das Blotverfahren und der Immunoblot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde ein Immunoblot per Semidry-Blotverfahren durchgeführt. Das Ziel dabei war, die Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) zu übertragen, die zusammen mit Whatman-Papier für 10 min im

Transferpuffer (Novex Tris-Acetate Transfer Buffer) vorinkubiert wurde. Im Anschluss wurden Membran, Gel und Whatman-Papiere in der Blot-Kassette geschichtet. Hierbei wurde die Membran auf eine Lage von 2 Whatman-Papieren gelegt, darauf das Gel, gefolgt von einer weiteren Doppelschicht Whatman-Papier, positioniert. Hierbei musste vor allem darauf geachtet werden, dass keine Bläschen zwischen der PVDF-Membran und dem Gel entstanden. Für einen ordentlichen Transfer der Proteine wurde bei einer Spannung von 24 V über Nacht geblottet. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in die Blockierlösung gelegt, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren. Nach dem Blockierungsprozess folgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper, der in der Blockierlösung gelöst wurde. Im nächsten Schritt erfolgte das dreimalige Waschen für je 20 min mit 1xTBST und anschließend wurde die Membran für 1 h mit dem dazugehörigen Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend erfolgte ein erneuter dreifacher Waschgang mit 1xTBST. Das Prinzip der Detektion beruht auf der Kopplung des Sekundärantikörpers mit dem Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP). Nach der Behandlung mit HRP wurde die Membran bei Dunkelheit für 5 min mit ECL (Elektrochemolumineszenz) oder - im Falle eines zu schwachen Signals - mit Super Signal West Femto Substrat befeuchtet. Das darin enthaltene Substrat Luminol wird in einer Reaktion durch die Peroxidase umgesetzt, wodurch Chemolumineszenz entsteht. Die Intensität des emittierten Lichts konnte mit einem Odyssey Fc-Dual-Mode-Imaging System (LI-COR Biosciences) und der Image-Studio Software gemessen und aufgenommen werden.

**Tab. 10:** Primärantikörper für die Western Blots

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung	Sekundärantikörper
Rabbit anti-Xbp1s	Novus Biologicals	1:1000	Anti-Rabbit HRP
Mouse anti-Lamin A/C	Cell Signaling	1:1000	Anti-Mouse HRP

**Tab. 11:** Sekundärantikörper für die Western Blots

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Rabbit HRP	Jackson Immuno Research	1:10.000
Anti-Mouse HRP	Jackson Immuno Research	1:10.000

Wenn wir verschiedene Proteine auf einer Membran detektieren wollten, haben wir die Antikörper mit Hilfe eines Strippuffers von der Membran entfernt. Nach erneuter Blockierung konnte die Membran mit einem anderen Antikörper inkubiert werden. Zur Ladungskontrolle der Gele wurden standardmäßig GAPDH oder HSP90 verwendet.

**Tab. 12:** Ansatz des Stripping Puffers

Stripping Puffer	20 ml 10 % SDS 12,5 ml 0,5 M TRIS 0,8 ml 2-Mercaptoethanol 67,5 ml nukleasefreies Wasser
------------------	---

## 2.7 Ermittlung der BUN-Werte

Mit Hilfe des Blut-Harnstoff-Stickstoffs (BUN) kann man Rückschlüsse auf die Nierenfunktion ziehen. BUN ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) stellt den im Harnstoff gebundenen Stickstoff dar, der als Parameter für den Proteinabbau bestimmt werden kann. Das Blut wurde direkt nach der Euthanasierung aus dem rechten Vorhof des Herzens entnommen und bei 4 °C und 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Serum wurde in ein Eppendorf Gefäß umpipettiert und auf Trockeneis schockgefroren. Die Bestimmung des BUN erfolgte dann durch das O'Brien Kidney Research Core Center.

## 2.8 Statistik

Vergleiche von drei oder mehr Gruppen wurden unter Verwendung eines ANOVA-Tests mit Hilfe der Software GraphPad Prism Version 9.4.1. durchgeführt, anschließend wurde mit Hilfe des Tukey Test der Mehrfachgruppenvergleich durchgeführt. Der Vergleich zweier Gruppen wurde unter Verwendung des zweiseitigen Student-t-Tests durchgeführt. Die unterschiedlichen Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ . Ein Wert von  $p < 0,05$  wurde als Schwellenwert für die statistische Signifikanz definiert. Die Daten wurden als Mittelwert + Standardfehler (SE) dargestellt.

## 2.9 Chemikalien

Nachfolgend sind die Chemikalien und Antikörper, die für die vorliegende Studie verwendet wurden, aufgelistet:

**Tab. 13:** Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Agarose Pulver	Thermofisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit	Thermofisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Anti Ki67 (Clone Sp6 rabbit) Primärantikörper	Thermofisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Rabbit anti-HSP90	Novus Biologicals, Centennial, CO (USA)
Mouse anti-V5	Invitrogen by TMS, Waltham, MA (USA)

Rabbit anti-Xbp1s	Novus Biologicals, Centennial, CO (USA)
Mouse anti-Lamin A/C	Cell Signaling Technology, Danvers, MA (USA)
Anti-mouse HRP- Sekundärantikörper	Jackson Immuno Research, West Grove, PA (USA)
Anti-rabbit HRP- Sekundärantikörper	Jackson Immuno Research, West Grove, PA (USA)
Rabbit-Anti-Xbp1s	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Bradford dye reagent	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
BSA	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Chloroform	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
DNA Gel loading dye 6x	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
DNA ladder 1kb	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
ECL-Plus	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
EDTA	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Essigsäure	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Ethidiumbromid	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Failsafe PCR 2x Premix D	Illumina, Madison, WI (USA)
Failsafe PCR 2x Premix E	Illumina, Madison, WI (USA)
Fluorescein labeled DBA	Vector laboratories, Burlingame, CA (USA)
Fluorescein labeled LTL	Vector laboratories, Burlingame, CA (USA)
Glycerol	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Goat serum	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Hoechst stain	Molecular probes, Eugene, OR (USA)
In situ cell death detection kit, TMR red	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Magermilchpulver	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Methanol	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Mowiol (J.T. Baker)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
NaCl	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)

Natrium deoxycholate	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumborohydrid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumcitrat	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Natriumdodecylsulfat	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Novex Tris-Acetate Gel 8 %	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Novex Tris-Acetate Running buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Novex Tris-Acetate Transfer buffer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Nukleasefreies Wasser	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
OCT	Science services, München, D
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
PBS	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
PCR Primer	Keck Biothechnology Resource Laboratory, New Haven, CU (USA)
Pierce ECL Substrat	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Protein loading dye 5x	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
RNeasy-Kit (RNA-Isolierung)	Qiagen, Hilden (D)
Sucrose	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Super Signal West Femto Substrat	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Taq-Polymerase	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
TBS	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
TRIS	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Triton x100	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
TRIzol Reagent	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Tween 20	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)

## 2.10 Puffer und Lösungen

**Tab. 14:** Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
50x TAE Buffer	50 mM EDTA 2 M TRIS 1 M Essigsäure
Fengs Buffer	200 µl NaHPO <sub>4</sub> 1 M 600 µl NaCl 2.5 M 20 µl EDTA 0.5 M 500 µl Triton X-100 10 % 1 Tablette Proteaseinhibitor 7,28 ml Nukleasefreies Wasser
RIPA Buffer	10 mM TRIS pH 8 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 0,1 % Natriumdeoxycholat 0,1 % SDS 140 mM NaCl 1 Proteinase Tablette in 10 ml
Stripping Buffer	20 ml 10 % SDS 12,5 ml 0.5M TRIS 0,8 ml 2-Mercaptoethanol 67,5 ml Nukleasefreies Wasser
Tail-Lysis Buffer	10 mM TRIS pH 8 100 mM NaCl 10 mM EDTA pH 8 5 % SDS Nukleasefreies Wasser Proteinase K (20 µl 20mg/ml pro 1 ml)
TBST	20 mM TRIS pH 7,5 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20
Blockierlösung (Immunfluoreszenzfärbung)	0,2 % BSA 10 % goat serum 1XTBS
NET Lysis Buffer	50 mM TRIS-Cl pH 7,4 1 mM EDTA 150 mM NaCl 0,1 % Triton-X-100
Blockierlösung (Western Blot)	5 % Magermilchpulver 1x TBST

## 2.11 Geräte und Software

**Tab. 15:** Geräte und Software

Produkt	Hersteller
Adobe Photoshop (Version 2015)	Adobe, San José, CA (USA)
Agarose-Gel-Kammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Analysewaage (AE240)	Mettler-Toledo AG, Greifensee, CH
Cryomolds	Science Services, München, D
Electrophoresis Power Supply PowerPac 1000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Eppendorf Gefäße	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Gelgießstand	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Image Studio Software	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE (USA)
Kryotom (HM525 NX)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Laufkammer (Western Blot)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Metamorph software	Universal Imaging, Bedford Hills, NY (USA)
NanoDrop™2000/2000c Spektralphotometer	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Nikon Eclipse TE2000-U	Nikon, Tokyo, J
Nikon/Andor Spinning Disk Confocal Microscope System	Nikon, Tokyo, J
NIS-Elements Imaging Software	Nikon, Tokyo, J
Objekträger	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Odyssey Fc dual mode Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE (USA)
pH-Meter (CG 812)	Schott-Geräte, Ludwigshafen, D
Polytron PT 1200 (Homogenizer)	Kinematica, Luzern (CH)
PVDF Transfermembran	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Thermocycler (C1000 Touch)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA (USA)
Transferkammern (Western Blot)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Vortex-Schüttler	VWR International, Radnor, PA (USA)
Wasserbad	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)
Whatman-Papier	Sigma Aldrich, St. Louis, MO (USA)
Zentrifuge (5417r)	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge (Sorvall Legend Micro 17R)	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA (USA)

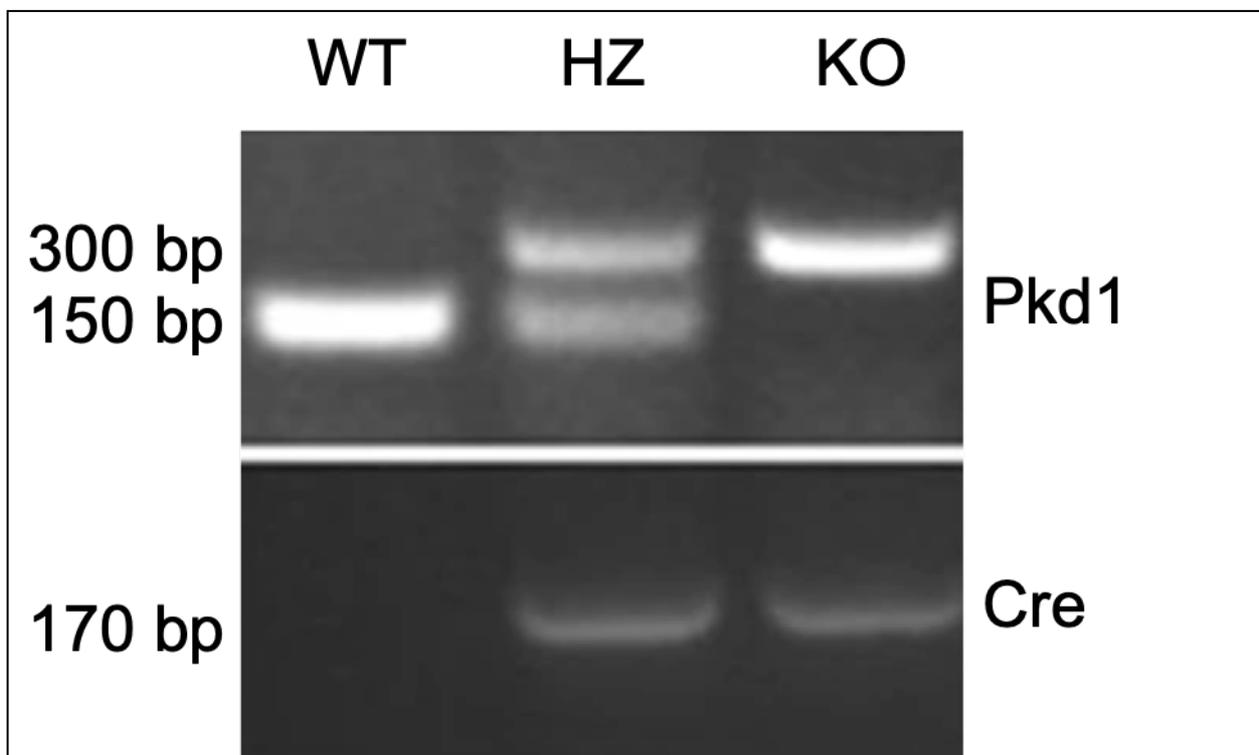
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der gewünschten Versuchstiere durch Genotypisierung

Damit ich meine Hypothese durch die Untersuchung von histologischen Schnitten, immunhistochemischen Färbungen und Western Blot Verfahren prüfen konnte, war es wichtig die Voraussetzung, nämlich den gewünschten Genotyp der Versuchstiere zu bestätigen. Die Genotypisierung erfolgte an allen frisch geborenen Mäusen an Tag 3. Neben der Bestimmung des richtigen Versuchstieres war es wichtig durch die Bestimmung der Genotypen weitere Kreuzungen von Tieren zu planen, um den gewünschten Genotyp zu züchten.

##### 3.1.1 Nachweis des $Pkd1^{R2216W/flox}$ , Pkhd1-Cre Mausmodells

Dieses Mausmodell diente als Ausgangs- und Vergleichsmodell, indem es den im erkrankten Menschen vorhandenen Geno- und Phänotyp darstellte.

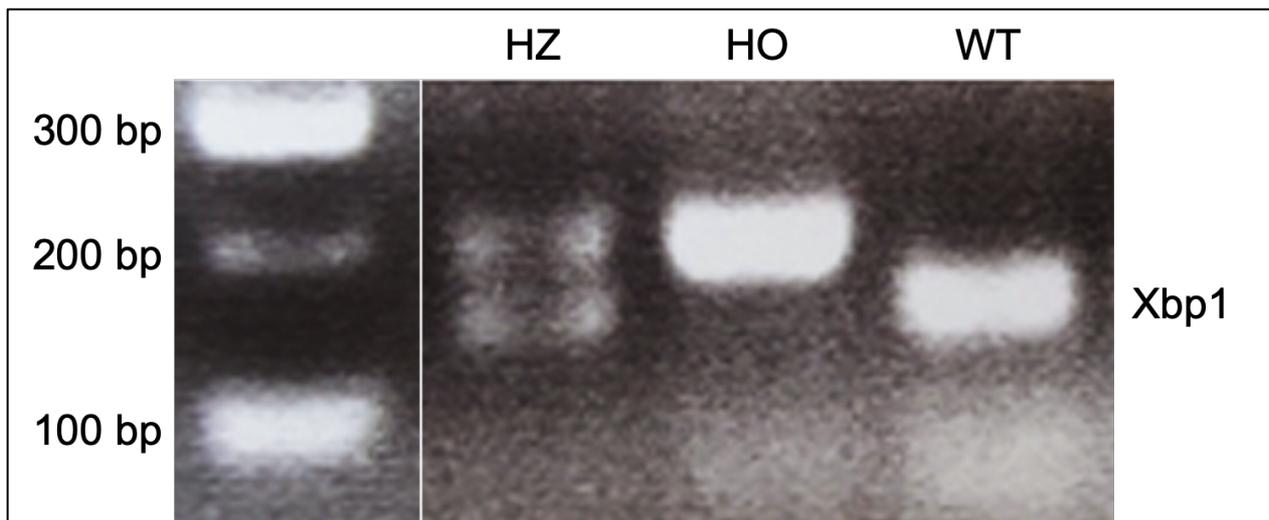


**Abb. 4:** Nachweis des gewünschten Genotyps  $Pkd1^{R2216W/flox}$ , Pkhd1-Cre. Wildtyp (WT), Heterozygot (HZ), Knock-Out (KO).

In Abbildung 4 sind mittels Gelelektrophorese drei Genotypen dargestellt. Der homozygote  $Pkd1^{R2216W/R2216W}$  Wildtyp (WT) trägt kein loxP und zeigt dadurch ein weiteres Laufen der Bande im Agarosegel aufgrund der geringeren Molekülmasse. Der heterozygote Genotyp (HZ) entspricht unserem gewünschten Genotyp  $Pkd1^{R2216W/flox}$ ,  $Pkhd1$ -Cre und zeigt zwei Banden aufgrund eines WT Allels und eines „gefloxten“ Allels, das durch die loxP-Ergänzung größer als das WT  $Pkd1$  ist. Das Knock-out Model (KO)  $Pkd1^{flox/flox}$  zeigt auf Grund von 2 „gefloxten“ Allelen nur eine Bande.

### 3.1.2 Nachweis des ROSA26-Xbp1s Allels im $Pkd1$ -Missense Mutationsmodell

Das zuvor genotypisierte Mausmodell diente zum einen als Vergleichsmodell zu der im nächsten Schritt erzeugten Kreuzung und zum anderen als Kreuzungspartner. Die in Abbildung 5 gezeigten Genotypen weisen alle bereits einen  $Pkd1^{R2216W/flox}$ ,  $Pkhd1$ -Cre-Genotyp auf. Das Ziel war das  $Pkd1^{R2216W/flox}$ ,  $Pkhd1$ -Cre, ROSA26-Xbp1s Mausmodell. In Abbildung 5 zeigt sich unser Versuchstier HZ (heterozygot) mit einem loxP. Als Kontrollen und für Versuche anderer Kollegen haben wir auch eine homozygote (HO) Maus mit einem doppel „gefloxten“ Allel und eine Wildtyp (WT) Maus erzeugt.

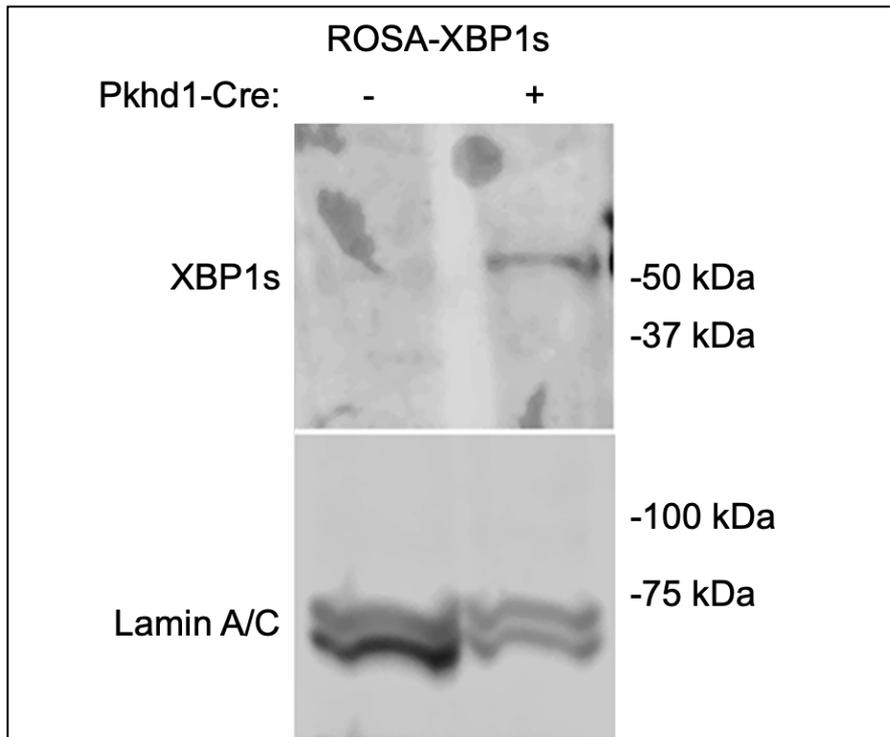


**Abb. 5:** Nachweis des ROSA26-Xbp1s Allels.

### 3.2 Untersuchung der Xbp1s-Überexpression in Nierenlysaten durch Western Blot

Um die immunhistochemischen Ergebnisse zu stützen, wurde zum Nachweis einer Hochregulierung der Xbp1s-Expression versucht, dieses Protein mittels Western Blot nachzuweisen (Abb. 15). Vor der Durchführung der Westernblots wurde eine Proteinbestimmung

nach Bradford durchgeführt, bei der die Proteinkonzentration der Nierenlysate mittels Photometer bestimmt wurde. Die hierzu verwendeten Zelllysate wurden aus den homogenisierten Nieren 16 Tage alter Versuchstiere mit den Genotypen  $Pkd1^{R2216W/flox}$ ;  $Pkhd1-Cre$ ,  $ROSA26-Xbp1s$  und  $Pkd1^{R2216W/flox}$ ;  $ROSA26-Xbp1s$  ohne  $Pkhd1s$  erzeugt. Zur Sicherung der empfindlichen Proteine wurden die Nieren nach der Entnahme sofort schockgefroren. Neben dem inhaltlichen Fokus beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe zusätzlich mit der Optimierung der Analyseverfahren. So zeigte sich bei unseren Immunoblots, dass der RIPA-Buffer eindeutiger Ergebnisse als der Fongs-Buffer ermöglichte. Wir fanden ebenfalls heraus, dass PBST beim Waschen der Membranen schonender für die Membran als TBST war. Dies sorgte für ein klareres Signal bei der Auswertung. Um eine aussagekräftige Proteinbeladung beider Versuchsreihen zu überprüfen und um beide Reihen miteinander vergleichen zu können, wurden Ladungskontrollen mit Lamin A/C durchgeführt. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Bestandteile der Zellkernmembran. Eine Darstellung dieser Proteine dient zudem dem Nachweis einer erfolgreichen Zellyse. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, zeigt sich eine kräftige Bande für Xbp1s bei gleichzeitiger Präsenz von Pkhd1-Cre. Dieser Nachweis zeigt zum einen die erfolgreiche Expression von Xbp1s, zum anderen konnte so die genetische Funktionalität der loxP/Cre gekoppelten Aktivierung der Xbp1s-Expression im ROSA26-Lokus bestätigt werden.

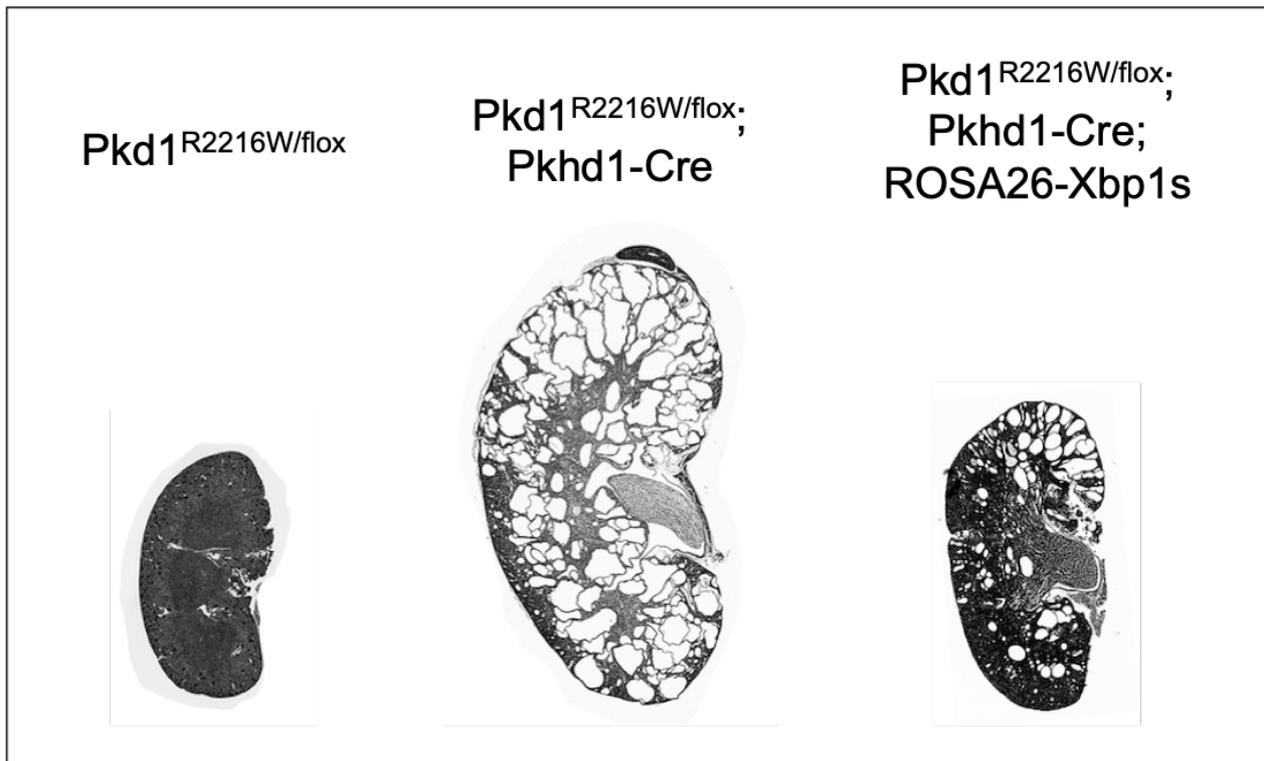


**Abb. 6:** Expression von Xbp1s bei Pkhd1-positivem Genotyp; Ladungskontrolle mit Lamin A/C (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023).

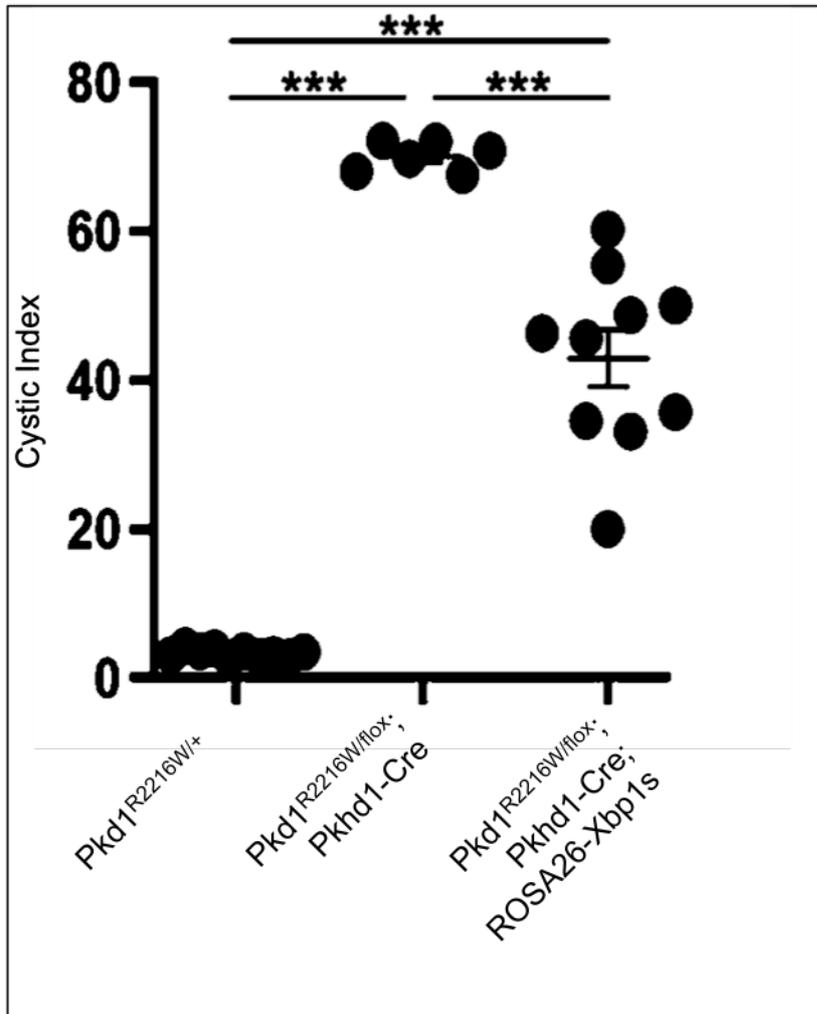
### 3.3 Histologische und physiologische Parameter der Nieren

#### 3.3.1 Histologie

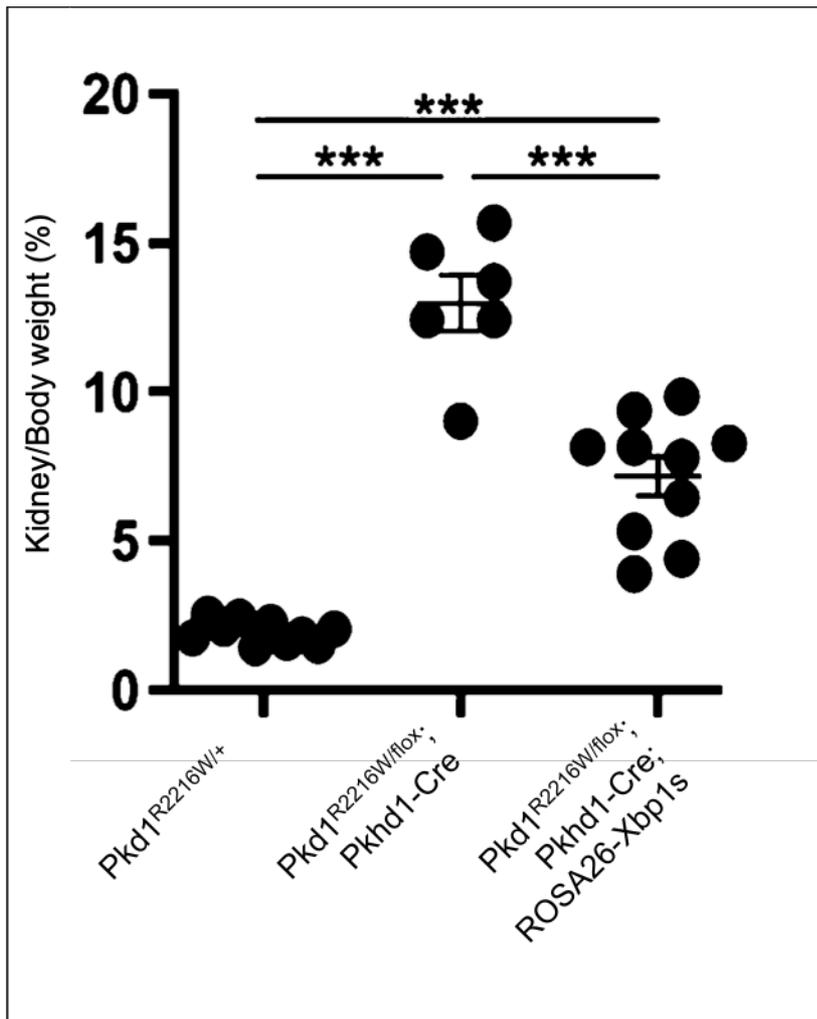
Nachdem die entsprechenden Genotypen der Versuchstiere bestimmt und die passenden Tiere für weitere Experimente ausgewählt worden waren, habe ich im nächsten Schritt die Morphologie der entnommenen Nieren unter einem Lichtmikroskop ausgewertet. Als erstes wurden histologische Schnitte von „gesunden“ Mäusen,  $Pkd1^{R2216W/+}$  und  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$  angefertigt und im nächsten Schritt mit denen des eigentlichen Versuchstieres  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$  verglichen. In Abbildung 6 sind deutliche Unterschiede in der Morphologie der Nieren zum Zeitpunkt p16 zu erkennen. Das  $Pkd1^{R2216W/+}$ -Modell zeigt erwartungsgemäß keine Zystenentwicklung. Die erkrankte Kontrolle  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$  hingegen zeigt einen deutlichen zystischen Phänotyp mit einer Zystenbildung über das gesamte Nierenparenchym reichend und einer deutlichen Zunahme des Nierenvolumens. Funktionelles Parenchym lässt sich nur noch schlecht abgrenzen und wurde fast vollständig durch die Zysten verdrängt. Quantitativ lässt sich diese Beobachtung durch den „Cystic Index“ (Abb. 7) und die „Kidney weight to body weight ratio“ (Abb. 8) darstellen. Das Nierengewicht im Verhältnis zum Gesamtkörpergewicht hat im Vergleich zur gesunden Kontrolle ( $Pkd1^{R2216W/+}$ ) signifikant zugenommen. Das Versuchstier  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$  weist zwar ebenfalls einen zystischen Phänotyp auf, dieser ist jedoch deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 6). Im Markbereich zeigen sich nur vereinzelte Zysten und die Rindenstruktur stellt sich grade im mittleren und kaudalen Bereich fast ohne Zysten dar. Das Nierenvolumen ist ebenfalls signifikant kleiner als bei dem kranken Vergleichstier. Dies zeigt sich sowohl im „Cystic Index“ (Abb. 7) als auch in der „Kidney weight to body weight ratio“ (Abb. 8).



**Abb. 7:** „Whole kidney scans“ als HE-Schnitte zeigen deutliche histologische Unterschiede zwischen den Vergleichsmodellen ( $Pkd1^{R2216W/+}$  und  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$ ) und dem Versuchstier ( $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$ ) zum Zeitpunkt p16. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023).



**Abb. 8:** Der Cystic Index zeigt das Verhältnis der von Zysten eingenommen Fläche im HE-Schnitt in Relation zur Gesamtfläche des HE-Schnittes zum Zeitpunkt p16. Kontrollgruppen (*Pkd1<sup>R2216W/+</sup>*, n=10, *Pkd1<sup>R2216W/flox+</sup>; Pkhd1-Cre*, n=6) gegen die Versuchsgruppe (*Pkd1<sup>R2216W/flox+</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s*, n=10), (\*\*P<0,001).

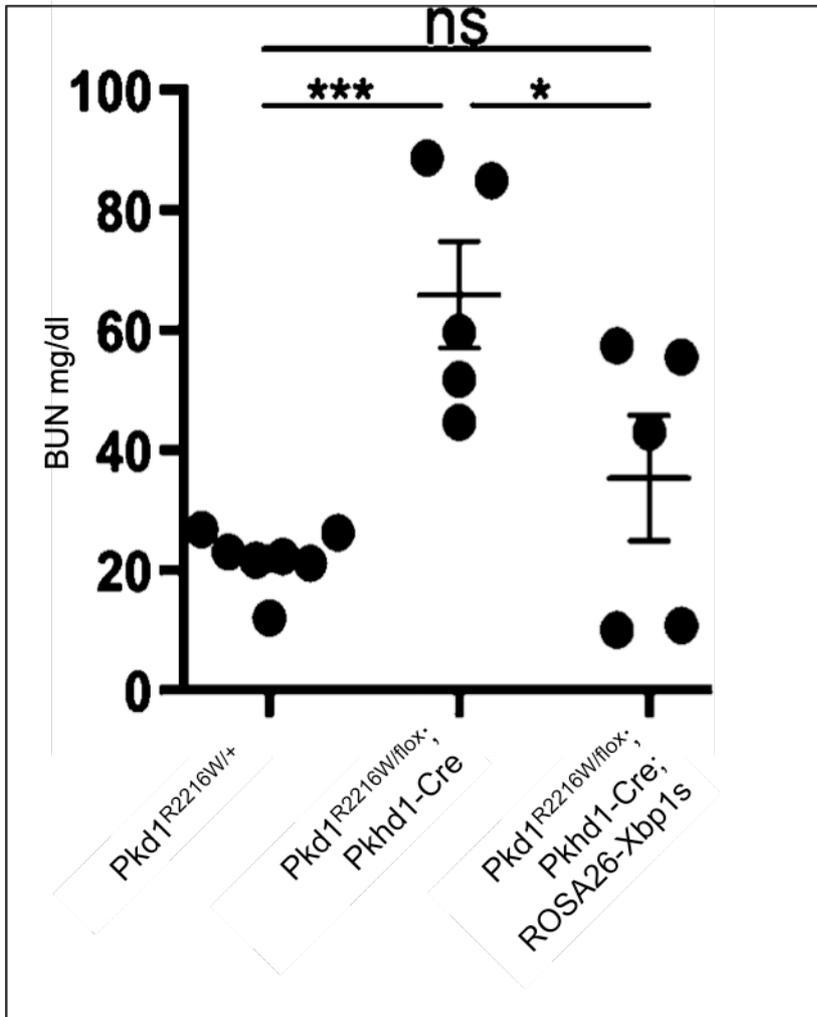


**Abb. 9:** Verhältnis Nierengewicht zu Gesamtkörpergewicht der Tiere. Kontrollgruppen ( $Pkd1^{R2216W/+}$ , n=10,  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$ , n=6) gegen die Versuchsgruppe ( $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$ , n=10) zum Zeitpunkt p16, (\*\* $P < 0,001$ ).

### 3.3.2 Auswirkungen der Xbp1s-Hochregulierung auf die Nierenfunktion

Von besonderem Interesse war neben den morphologischen Auswirkungen einer erhöhten Xbp1s-Expression der Einfluss auf die Nierenfunktion. Dazu wurde am Tag der Euthanasierung (p16) Blut von gesunden Tieren ( $Pkd1^{R2216W/+}$ ), erkrankten ( $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$ ) und dem Versuchstier ( $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$ ) abgenommen und der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Wert (BUN) als Nierenfunktionsparameter bestimmt (Abb. 9). Hier lässt sich im Vergleich zwischen dem gesunden und dem erkrankten Kontrolltier ein klarer Anstieg der Nierenretentionsparameter im Serum nachweisen. Es lässt sich eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion des Versuchstieres mit hochregulierter Xbp1s-Expression gegenüber dem erkrankten Tier feststellen. Von

besonderer Bedeutung ist der Vergleich der BUN-Konzentration von gesunden Tieren mit unserem erkrankten Versuchstier. Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede messen (Abb. 9).

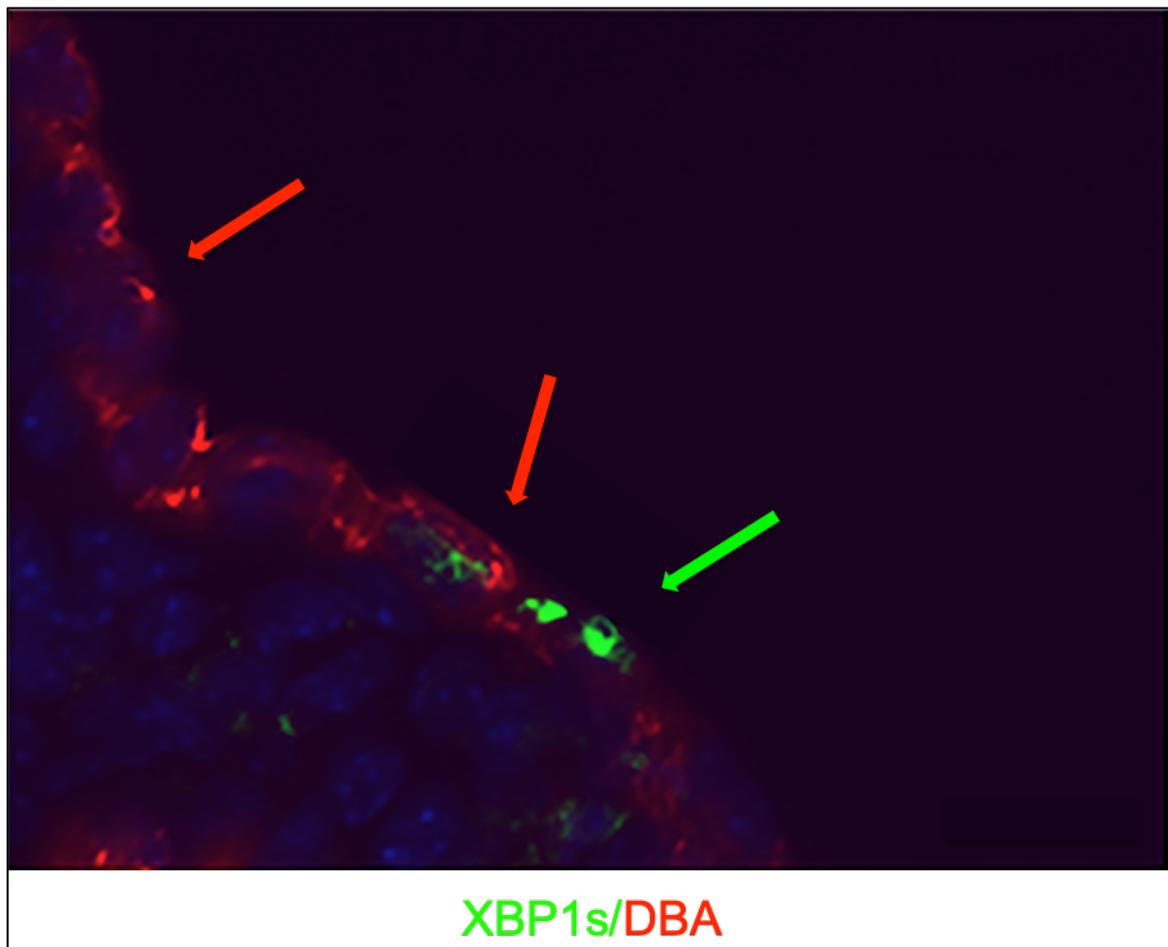


**Abb. 10:** Vergleich der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte (BUN) der gesunden Kontrollen ( $Pkd1^{R2216W/+}$ , n=7) mit den erkrankten Kontrollen ( $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$ , n=5) und der Versuchsgruppe  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre, ROSA26-Xbp1s$ , n=5) zum Zeitpunkt p16, (\*\*\*)  $P < 0,001$ ; \*  $P < 0,05$ ).

### 3.4 Immunhistochemische Auswertung

#### 3.4.1 Nachweis von Xbp1s in Sammelrohrzellen

Um die Xbp1s Expression in vivo zu ermöglichen, wurde eine Mauslinie erzeugt, bei der die aktive Form von Xbp1 (Xbp1s) als Knock-In in den ubiquitären ROSA26 Locus eingebracht wurde. Dieser Knock-In wurde mittels Stop-Kassette stummgeschaltet. Die Stop-Kassette wurde wiederum „gefloxed“. Durch die Anwesenheit von Pkhd1-Cre konnte die Stop-Kassette inaktiviert und die Expression von Xbp1 bzw. Xbp1s initiiert werden. Um die nukleare Expression von XBP1s in Gegenwart von Pkhd1 in den Sammelrohren nachzuweisen, wurde Xbp1s immunhistochemisch dargestellt (Abb. 10). Durch den Einsatz von Dolichos Biflorus Agglutinin (DBA) konnte nachgewiesen werden, dass das dargestellte Xbp1s im Sammelrohr und nicht in anderen Nephronabschnitten dargestellt wurde (Michael et al., 2007).

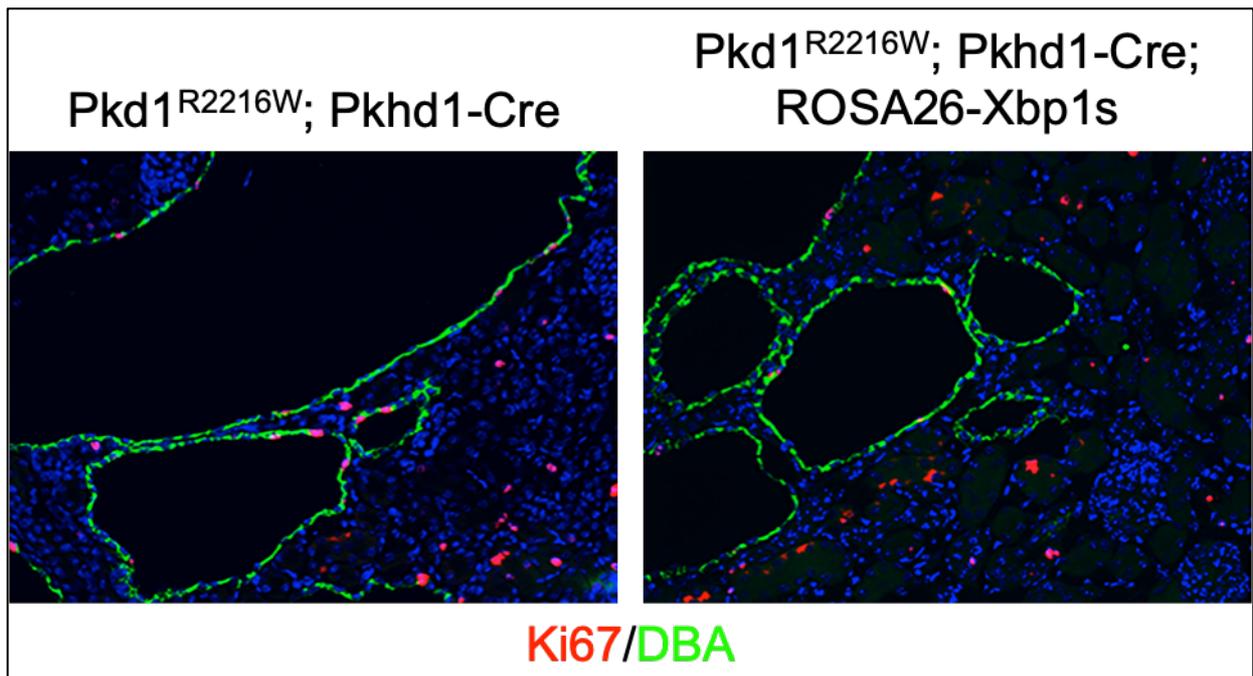


**Abb. 11:** Sammelrohrzellen (DBA-positiv/rot) zeigen eine deutliche Expression von Xbp1s (grün), Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023).

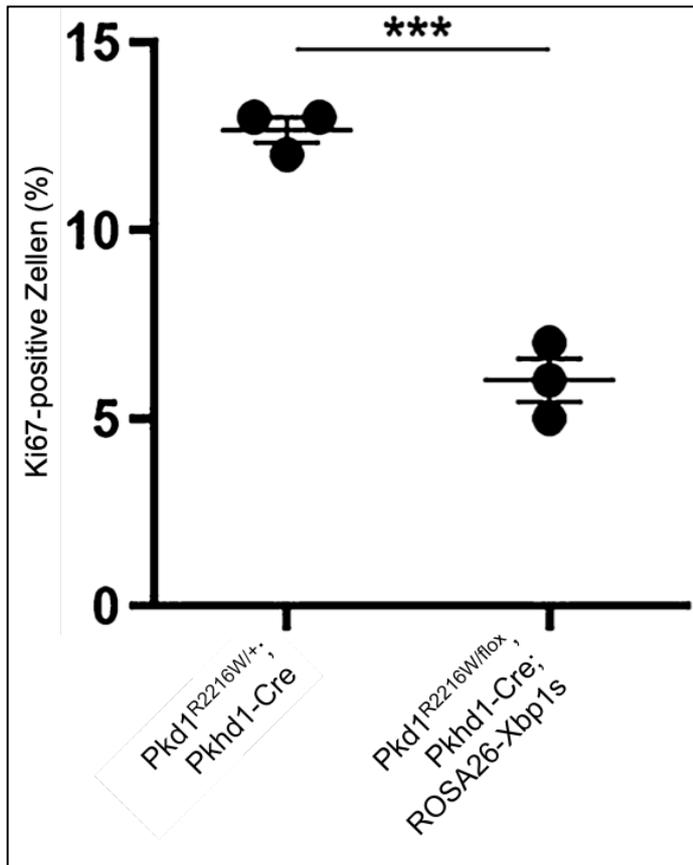
### 3.4.2 Untersuchung des Proliferationsverhalten von Sammelrohrzellen bei erhöhter Xbp1s-Expression

Nachdem eine deutliche Xbp1s-Expression in den Sammelrohrzellen des Nephrons dargestellt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob sich die vermehrte Xbp1s-Expression auf das Proliferationsverhalten der Sammelrohrzellen auswirken würde. Eine Veränderung des Proliferationsverhaltes könnte einer der möglichen Hebel im Hinblick auf das reduzierte Zystenwachstum bei erhöhter Xbp1s-Expression sein. Um das Proliferationsverhalten immunhistochemisch untersuchen zu können, wurde das bei der Zellteilung vorkommende Protein Ki67 durch eine Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Nachdem die Kryoschnitte mit Primär- und Sekundärantikörpern behandelt wurden, erfolgte die Darstellung der Zellkerne, um ein besseres Auszählen zu ermöglichen. Hier wurde eine DAPI (4'-6 Diamidino-2-Phenyldiol, auch Hoechst-Stain genannt)-Färbung angewendet (blaues Signal Abb.10, 11 und 13). Es wurden immunhistochemische Färbungen von Kryoschnitten der Nieren beider Mauslinien,  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$  und  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre, ROSA26-Xbp1s$ , angefertigt und ausgewertet (Abb. 11 und 12). Hier zeigt sich im bildmorphologischen Vergleich (Abb. 11) und nach einer Auszählung von über 1000 DBA-positiven Zellen eine signifikant geringe Proliferationsrate der Zellen mit erhöhter Xbp1s-Expression (Abb. 12).



**Abb. 12:** Darstellung von Ki67 in DBA-positiven Sammelrohrzellen beider Mauslinien. Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023).



**Abb. 13:** ROSA26-XBP1s positive Zellen zeigen eine signifikant geringere Expression von Ki67, (\*\*\*) $P < 0,001$ ).

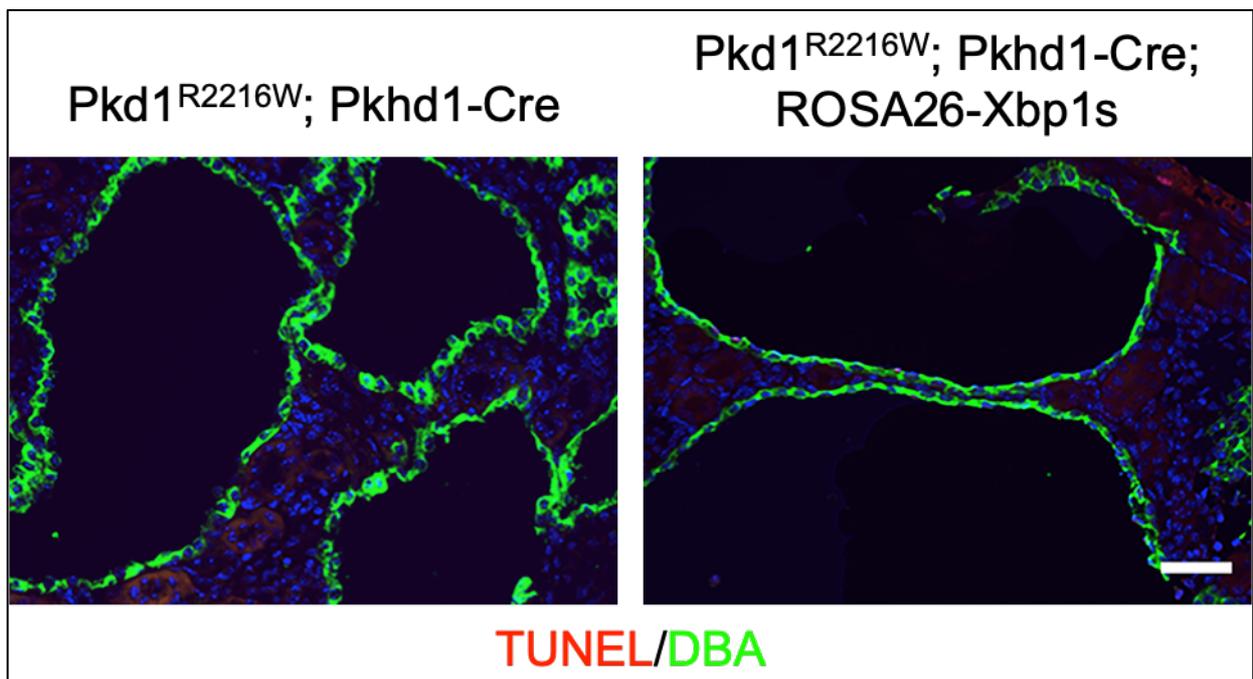
### 3.4.3 Untersuchung des Apoptoseverhaltens von Sammelrohrzellen bei erhöhter Xbp1s-Expression

Nachdem eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate in den Sammelrohrzellen des Nephrons dargestellt werden konnte, wurde als nächstes untersucht, ob sich die vermehrte Xbp1s-Expression auf das Apoptoseverhalten der Sammelrohrzellen auswirken würde. Eine Veränderung des Apoptoseverhaltens könnte einer der möglichen Hebel im Hinblick auf das reduzierte Zystenwachstum bei erhöhter Xbp1s-Expression sein. Es wurde untersucht, ob ein signifikanter Unterschied im Anteil der apoptotischen Zellen innerhalb der zystenbildenden Zellen zwischen den Kontrollen (*Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre*) und den Versuchstieren (*Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre, ROSA26-Xbp1s*) besteht.

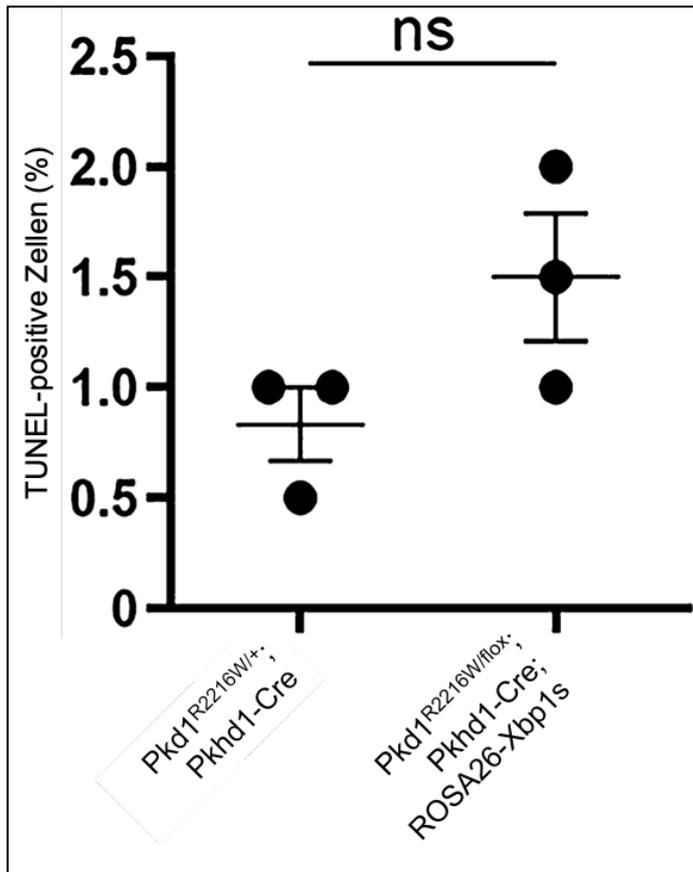
Um mögliche apoptotische Vorgänge im Sammelrohrepithel darstellen zu können, wurde ein TUNEL-Assay (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) an Kryoschnitten aus Nieren von Mäusen an p16 angefertigt. Zysten stellen sich als größere, schwarze

Bildanteile ohne detektierbares Farbsignal dar. Neben dem TUNEL-Signal wurde DBA (Dolichos biflorus agglutinin) zur Markierung von Sammelrohrzellen eingesetzt. DBA markierte Zellen zeigten sich hier grün. Es wurden je 1000 DBA-positive Zellen pro Niere ausgezählt, um ein valides Ergebnis zu erhalten.

In Abbildung 13 lässt sich selbst bei genauer Betrachtung der DBA positiven Zellen kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der Versuchsgruppe erkennen. Diese Beobachtung wurde nach dem Auszählen von über 1000 DBA-positiven Zellen quantitativ bestätigt (Abb14).



**Abb. 14:** Darstellung von TUNEL in DBA-positiven Sammelrohrzellen beider Mauslinien. Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023).



**Abb. 15:** Anteil der TUNEL-positiven Zellen bei Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; Pkhd1-Cre und Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s.

Einige der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse setzten sich aus gepoolten Daten zusammen, welche in Kollaboration und mit Zustimmung von Dr. Matteus Krappitz im Labor von Prof. Somlo an der Yale University generiert wurden. Hierzu zählen einige der BUN-Messungen, Westernblots und H&E-Schnitt- Scans, welche von Dr. Krappitz erfasst wurden und auch in die hier vorliegende statistische Auswertung miteingeflossen sind. Diese Daten sind auch die Grundlage der kürzlich erfolgten Publikation von Krappitz et al., 2023. Es liegen für alle in dieser Arbeit genutzten Abbildungen die entsprechenden Einverständnisse der Erstautoren bzw. Urheber vor. Eine Darstellung signifikanter Ergebnisse ist nur durch die zusätzliche Berücksichtigung von Messergebnissen meiner Arbeitsgruppe möglich und sinnvoll. Eine entsprechende Erlaubnis der Nutzung dieser Daten liegt ebenfalls vor.

## 4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Effekt einer hochregulierten Expression des Transkriptionsfaktors Xbp1s auf die Progression von ADPKD auf der Grundlage eines Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre Maus Missense Mutationsmodell untersucht, das der Pkd1<sup>R2220W</sup> Mutation des Menschen entspricht. Anhand von histologischen und biochemischen Verfahren konnte gezeigt werden, dass Xbp1s einen positiven Effekt auf die Morphologie und die Funktion der Niere im Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s-Model hat.

Xbp1s ist ein integraler Bestandteil der „Unfolded Protein Response“ und entsteht bei Faltungsstress des endoplasmatischen Retikulums (ER) durch die Endonukleaseaktivität des im ER gelegenen Transmembranproteins IRE1 $\alpha$ . Diese Signalkaskade der UPR stellt den evolutionär konserviertesten der drei Signalwege der UPR dar (Lee et al, 2003). Ziel dieses Schutzmechanismus ist eine Optimierung der Faltungsumgebung für neu translatierte Proteine. Dabei entsteht Xbp1s durch Spleißen der Xbp1-mRNA und induziert die Transkription von UPR Zielgenen wie BiP, Erdk4, Sec61p und Herp (Clauss et al, 1996; Lee et al, 2003; Malhotra und Kaufman, 2007). Diese Zielgene gehören unter anderem zum „ER-associated degradation pathway“ (ERAD), der mitunter zu einem Überlebensvorteil von Zellen unter ER-Stress führt. Funktioniert dieser Schutz nicht, z.B. durch Fehlen von Xbp1s, gibt es eine weitere Signalkaskade von IRE1 $\alpha$ , bei der die Apoptose der Zellen eingeleitet wird. Die Expansion der Zystenzellen führt durch Proliferation zum einen zu einer regionalen Hypoxie und zum anderen zeigt sich ein gestörter Glukosemetabolismus, der Warburg-Effekt genannt wird und auch bei Tumorzellen beobachtet werden kann (Liberti und Locasale, 2016; Magistroni und Boletta, 2017). Der Warburg-Effekt beschreibt eine Veränderung des Glukosestoffwechsels. Obwohl Sauerstoff vorliegt, wird Energie auf anaerobem Weg mittels Glykolyse generiert. Dies führt zur Bildung von Laktat statt Pyruvat, das den Mitochondrien für die oxidative Phosphorylierung nun fehlt. Der unkompensierte ER-Stress mündet schlussendlich in einer erhöhten Apoptoserate der Zystenzellen (Sano und Reed, 2001).

Diese proapoptotische Seite des IRE1 $\alpha$ -Signaweges konnte in einem Sec36/Xbp1 Doppel-Knock-out untersucht werden. Hier zeigte sich, dass beim Fehlen von Xbp1s eine vermehrte Apoptose zu beobachten ist (Hassan et al, 2016). Darüber hinaus konnten Spaan et al., 2019 zeigen, dass eine Expression von Xbp1s zu einer reduzierten

Proliferation von Tumorzellen führt. Es wird angenommen, dass dies durch eine Kopplung von Xbp1s und dem PERK-eIF2 $\alpha$ -Signalweg der UPR induziert wird (Spaan et al, 2019; Sequeira et al, 2007). Der Nachweis eines kausalen Zusammenhangs wäre hier ein interessanter Ansatz für weitere Studien.

Wir beobachteten, dass die vermehrte Expression von Xbp1s ebenfalls zu einer reduzierten Proliferationsrate der Zystenzellen geführt hat, wie wir es mittels Ki67-Immunostaining zeigen konnten. Demgegenüber konnten wir keine erhöhten Apotoseraten der Zystenzellen beobachten. Dies könnte auf eine bedeutende Funktion von Xbp1s bei ADPKD mit Pkd1<sup>R2216W</sup>-Mutation hinweisen: Durch die erfolgreiche Induktion von Chaperonproteinen durch XBP1s könnte die Dosis an funktionstüchtigem PC1 erhöht werden. Dies könnte zu einer Senkung der Proliferationsrate führen, wodurch das Zystenwachstum gebremst und folglich der Stress auf die Tubuluszellen und das umgebene Gewebe selbst reduziert wird.

Eine gezielte Hochregulierung der Xbp1s-Expression durch spezifische Agonisten, die die Endoribonukleaseaktivität von IRE1 $\alpha$  aktivieren, könnte einen therapeutischen Ansatz in der Behandlung der ADPKD bei hypomorpher Pkd1 Mutation darstellen (Grandjean et al., 2020; Wu et al., 2016). Zwar konnte bereits gezeigt werden, dass der IRE1 $\alpha$ -Signalweg eine protektive Rolle bei verschiedenen Erkrankungen spielt (Grandjean et al.), es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine chronische Aktivierung in Entzündungsreaktionen und maligne Erkrankungen münden kann. Dies würde gegen den Einsatz von Substanzen sprechen, die den IRE1 $\alpha$ -Signalweg dauerhaft aktivieren. Welche genauen Folgen eine chronische Xbp1s-Überexpression auf den Organismus hat, wird aktuell noch untersucht. Missense-Mutationen in Pkd1 verteilen sich relativ unspezifisch über das komplette Gen. Daher ist es schwer vorherzusagen welche Mutationen am ehesten von einer verbesserten Faltungsmaschinerie profitieren. Um eine genauere Identifikation bestimmter Mutationen und ein selektives Ansprechen auf mögliche Chaperontherapien untersuchen zu können, sollten in Zukunft weitere Studien durchgeführt werden, die Mutationen in spezifischen Domänen im PC1 Gen untersuchen. Dazu könnten *in vitro* Versuche an Zellkulturen durchgeführt werden. Es ist ebenfalls wichtig hervorzuheben, dass gezielte PC1 Chaperontherapien bei Mutationen, die die Interaktion von PC1 mit weiteren Proteinen im Rahmen von funktionellen Komplexen betreffen, nicht effektiv sein könnten. Ebenso

würde eine Chaperontherapie bei "Nonsense Mutationen" von PC1 mit verkürzter Translation und Proteinproduktion ebenfalls wenig effektiv sein, da zu wenig Substrat vorhanden wäre, das von einer verbesserten Faltungsmaschinerie profitieren würde.

Im Folgenden interpretiere ich die Ergebnisse meiner wesentlichen Versuche und schließe meine Diskussion mit einer abschließenden Einordnung ab.

#### 4.1 Auswirkung der Xbp1s Expression auf die Morphologie der Niere des Pkd1<sup>R2216W/flox</sup> Mutationsmodels

Als erstes wurde die Morphologie der Niere unseres Versuchstieres (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s) untersucht. In der aktuellen Fachliteratur und auch bedeutenden Studien zur polyzystischen Nierenerkrankungen wird der „Cytic Index“ (CI) als Methode der Wahl zur Quantifizierung zystischer Anteile am gesamten Nierengewebe genutzt (Fedele et al., 2014; Meca et al., 2019; Nieto et al., 2016; Yank et al., 2018). Deshalb wurde ein HE-Schnitt der Niere angefertigt und anschließend unter einem Nikon Eclipse TE2000-U Mikroskop untersucht und eingescannt. Der Scan wurde dann mittels Metamorph weiterbearbeitet und der CI bestimmt. Die Auswertung des CI ergab eine signifikante Reduktion der zystischen Anteile in unserem Versuchsmodell gegenüber der unbehandelten Mauslinie. Um bei dem Vergleich der verschiedenen Scans einen Kontrastfehler auszuschließen, wurde der Kontrast durch die Software automatisch eingestellt und unterlag nicht der Kontrolle des Untersuchers. So konnten unabhängige Scans generiert werden, die in der Auswertung frei von willkürlicher Verfälschung waren. Die einzige Fehlerquelle beruhte auf der Tatsache, dass die eingescannten Schnitte manuell mittels Cursor zugeschnitten werden mussten. Da dieses Zuschneiden durch gerade gezogene Linien erfolgte und die natürliche Form der Niere je nach Seite konvex oder konkav ist, ist selbst bei maximaler Vergrößerung keine 100-prozentige Präzision möglich. Durch diese Ungenauigkeiten im Randbereich lässt sich eine gewisse Verfälschung des CI durch den Untersucher nicht verhindern. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurden n=11 Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; n=6 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre und n=10 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s Exemplare untersucht. Hier könnte man die Zahl der untersuchten Tiere erhöhen, um eine geringere Streuung der Messwerte zu erzielen.

Zusammenfassend stellt die Bestimmung des CI eine allgemein akzeptierte Methode zur Quantifizierung der zystischen Nierenanteile dar. In Zukunft könnte man die Präzision des Zuschneidens der Nierenscans durch automatisierte und standardisierte Methoden verbessern.

#### 4.2 Auswirkung der Xbp1s Expression auf die „Kidney weight to Body weight ratio“ und den Cystic Index des Pkd1<sup>R2216W/flox</sup> Mutationsmodells

Die „Kidney weight to Body weight ratio“ stellt eine simple und gleichzeitig aussagekräftige Methode dar, um die anteilige Zu- oder Abnahme des Nierengewebes am Gesamtkörpergewicht zu messen. Es konnte eine deutliche Abnahme bei Tieren mit einer Xbp1s-Überexpression beobachtet werden. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurden n=10 Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; n=6 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre und n=10 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s Exemplare untersucht.

Da für diese Arbeit sowohl männliche als auch weibliche Tiere genutzt wurden und allen Tieren das gleiche, ausreichende Angebot an Nahrung und Wasser zugeführt wurden, sind aus Nahrung und Geschlecht resultierende systematische Fehler unwahrscheinlich. Als potentielle Fehlerquelle könnte hier der Untersucher aufgeführt werden, da die Entnahme der Organe und die Qualität der entnommenen Nieren vom sauberen Vorgehen des Untersuchers abhängen. Es ist ebenso darauf zu achten, dass bei der Sedierung der Tiere, die vor der Messung des Körpergewichts erfolgt, immer die gleichen Mengen an Betäubungsmittel in den Bauch appliziert werden, um eine Verzerrung der Körpergewichts zu verhindern. Als mögliche Anregung würde ich gerne den Entzug von Wasser und Nahrung eine Nacht vor Euthanasierung vorschlagen, um ungleich gefüllte Darmschlingen und Harnblasen als Fehlerquellen auszuschließen.

Zusammenfassend stellt die „Kidney weight to Body weight ratio“ eine solide und sehr praktikable Methode dar.

### 4.3 Auswirkung der Xbp1s Expression auf die Nierenfunktion des Pkd1<sup>R2216W/flox</sup> Mutationsmodels

In der Forschung an Nierenerkrankungen bedient man sich gerne dem im Blut am Harnstoff gebundenen Stickstoff, dem sog. BUN-Wert (Blood Urea Nitrogen) im Serum (Hopp et al., 2012; Fedeles et al., 2015; Chapman et al., 2012). Der BUN entsteht biochemisch als Abbauprodukt im Proteinstoffwechsel und wird über die Nieren ausgeschieden. Er wird frei filtriert und nur zu geringen Mengen rückresorbiert. Ein Anstieg der BUN-Werte ist bei Störungen oder Schäden des Filtrations- bzw. Sekretionsapparat der Niere im Rahmen von Nierenerkrankungen oder Nierenversagen zu sehen (Gowda et al., 2010). Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, wurden n=7 Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; n=5 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre und n=5 Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s Exemplare untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die BUN-Werte in der erkrankten Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Abb. 9). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es neben einer gestörten Morphologie der Niere auch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch die PC1-Mutation in unserem Mausmodell kommt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die BUN-Werte unseres Versuchstieres nicht signifikant von denen der gesunden Kontrollgruppe unterschieden und sich signifikant im Vergleich zu kranken Kontrollgruppe verbessert haben. Diese Verbesserung könnte man auf die verbesserste Nierenfunktion durch mehr erhaltenes, gesundes Nierengewebe zurückführen (Abb. 6 und 9).

Da der BUN-Wert im Serum vom Proteingehalt der Nahrung abhängig ist, ist bei der Haltung der Tiere auf eine gleichverteilte Nahrung zu achten, da eine ungleiche Ernährung eine mögliche Fehlerquelle darstellen würde. Darüberhinaus wäre es für zukünftige Studien relevant, auch andere Biomarker für die Nierenfunktion zu analysieren. Da der BUN bei Dehydratation erhöht sein kann, ist besonders auf eine ausreichende Wasserzufuhr während der Aufzucht der Tiere zu achten (Robinson und Weber, 2004).

#### 4.4 Auswirkung der Xbp1s Expression auf die Proliferationsrate der Zysten Zellen des Pkd1<sup>R2216W/flox</sup> Mutationsmodells

Um eine mögliche Erklärung für den Progress des Zystenwachstum im erkrankten Mausmodell und den Rückgang bzw. die Verlangsamung des Zystenwachstums im Versuchsmodell zu finden, wurde auch die Proliferationsrate der Zysten Zellen in den Sammelrohren der Nieren bestimmt. Es zeigte sich mit Hilfe der Ki67-Färbung eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate unter einer Über-Expression von Xbp1s (Abb. 11 und 12). Diese Beobachtung wird durch die Erkenntnis gestützt, dass sich unter Xbp1s die Proliferationsrate von Tumorzellen ebenfalls reduziert (Spaan et al., 2019). Diese Erkenntnis stellt zum einen eine mögliche Erklärung für das Zystenwachstum unter geringerer Xbp1s-Dosis (Vergleichsmodell ohne Xbp1s-Überexpression), zum anderen einen weiteren Therapieansatz durch den gezielten Einsatz von Agonisten im IRE1 $\alpha$ -Xbp1-Signalweg dar. Spaan et al. vermuten eine Verbindung zwischen dem IRE1 $\alpha$ - und dem PERK-Signalweg der UPR, die u.a. durch Xbp1s gekoppelt wird. Es zeigt sich also, dass eine genauere Untersuchung der UPR und ihrer komplexen Signalkaskaden weitere Aufschlüsse zur Pathogenese und darüber hinaus für Therapieoptionen der ADPKD bieten können.

Bei der Auswertung der Ki67-positiven Zellen hängt die Datenerhebung von der Genauigkeit des Untersuchers ab, da bisher jeweils mindestens 1000 Zellen pro Genotyp mit dem bloßen Auge ausgezählt wurden. Diese Fehlerquelle könnte durch den Einsatz selbstzählender, automatisierter Programme, ins Besondere mit Hilfe künstlicher Intelligenz (KI), vereinheitlicht und präzisiert werden (Xing et al., 2014, 2019). Zusammenfassend stellt die Ki67-Methode ein sehr spezifisches Verfahren zur Darstellung von Proliferationsverhalten dar.

#### 4.5 Auswirkung der Xbp1s Expression auf die Apoptoserate der Zysten Zellen des Pkd1<sup>R2216W/flox</sup> Mutationsmodells

Um zu untersuchen, ob neben der Proliferation auch eine vermehrte Apoptoserate der Grund für ein reduziertes Zystenwachstum in den Nieren des Versuchstiers sein könnte, wurde die Apoptoserate mittels TUNEL-Assay bestimmt. Nach dem Auszählen von über 1000 Zellen ließ sich keine signifikant gesteigerte Apoptoserate erkennen. Diese Beobachtung wird durch die Hypothese gestützt, dass der proapoptotische Arm des IRE1 $\alpha$ -Signalwegs durch einen Mangel, nicht aber durch eine Überexpression von Xbp1s angeregt werden konnte (Sano und Reed, 2013). Ein weiterer Grund für die ausbleibende Steigerung der Apoptoserate unter Xbp1s-Expression könnte der durch die reduzierte Proliferation ausbleibende Stress auf das Zystenepithel im Allgemeinen sein. Wie zuvor beschrieben kommt es in der Regel durch überschießendes Wachstum zu Hypoxie und einem gestörten Glukosestoffwechsel (Warburg-Effekt) im betroffenen Gewebe, als Folge mit erhöhten Apoptoseraten. Dieser Mechanismus entfällt in unserem Versuchstier, da eine reduzierte Proliferationsrate nachgewiesen werden konnte. Ergänzend möchte ich an dieser Stelle ein weiteres Experiment unserer Arbeitsgruppe erwähnen. Hier konnte in einem Xbp1-Knock-out eine gesteigerte Apoptoserate dargestellt werden. Diese Ergebnisse werden durch eine andere Studie mit Sec63/Xbp1-Knock-out bestärkt (Hassan et al., 2016).

Wie auch bei der Auszählung von Ki67-positiven Zellen ist die Analyse der über 1000 Zellen durch das bloße Auge des Untersuchers durchgeführt worden. Dies ist ebenfalls als eine direkte Fehlerquelle zu identifizieren und lässt sich in Zukunft durch den Einsatz von automatisierten Analyseverfahren vermutlich vermeiden. Um die Genauigkeit der Analyse für diese Arbeit noch optimieren zu können, wäre eine parallele Auswertung durch einen unabhängigen Untersucher sicherlich hilfreich gewesen. Um die Signalstärke der Kryoschnitte zu intensivieren, wurden die Farben der Scans mittels AdobePhotoshop verarbeitet, die Kontraste gleichgesetzt und die Farben zum sicheren Auszählen intensiviert.

Zusammenfassen lässt man wie auch bei der Ki-67-Färbung sagen, dass der TUNEL-Assay eine spezifische Methode darstellt, deren Ergebnisse jedoch sehr von der Erfahrung des Untersuchers abhängen und dadurch verschiedene Fehlerquellen ausweisen.

#### 4.6 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden dienen der Untersuchung der Hypothese, dass die gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors Xbp1s in einem Pkd1-Missense Mutationsmodell zu einer Verbesserung des Phänotyps und der Nierenfunktion führt. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit festgehalten werden konnten, zeigen, dass eine Überexpression von Xbp1s zu einer signifikanten Besserung des zystischen Phänotyps und zu einer signifikanten Besserung der Nierenfunktion in diesem spezifischen murinen ADPKD Missense-Modell führen kann. Bezüglich meiner Fragestellung könnten und werden noch weitere Versuche durchgeführt, die noch spezifischer den Effekt von Xbp1s in dem zugrundeliegenden Genotyp untersuchen. Dazu gehören z.B. Zellkulturen, in denen das ziliare „trafficking“, also der Transport von PC1 in das primäre Cilium, bei PC1-Mutation unter erhöhter Xbp1s-Expression untersucht werden könnte, indem man das C-Terminale V5-Epitop in einem  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$  und einem  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$ ; ROSA26-Xbp1s-Modell immunhistochemisch darstellt und vergleicht. Ebenso interessant ist die Untersuchung einer verzögerten Xbp1s-Expression in einem murinen „late-onset“ ADPKD-Modell, um den schleichenden Verlauf der ADPKD beim Menschen besser imitieren zu können. Diesen Fragestellungen gehen das Team um Professor Somlo an der Yale University und Kollegen an der Charité Berlin weiter nach.

Schlussendlich könnten nachfolgende Untersuchungen, die genauere Zusammenhänge zwischen ADPKD und der UPR offenlegen, zukünftig helfen, neue Therapieansätze für die ADPKD zu identifizieren.

Die durch meine Arbeit festgehaltenen Ergebnisse stellen einen möglichen Therapieansatz bei ADPKD dar. Durch den Einsatz spezifischer Agonisten am IRE1 $\alpha$ -Signalweg mit einhergehender Überexpression von Xbp1s könnten bei Patienten mit hypomorphen Pkd1 Mutationen ein verzögertes Zystenwachstum und eine verzögerte Abnahme der Nierenfunktion erreicht werden.

## 5. Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung:

Die autosomal dominant polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) stellt mit einer Prävalenz von 1:600 bis 1:800 eine der häufigsten monogenetischen Erbkrankheiten des Menschen dar. ADPKD beruht auf Mutationen in den Genen Pkd1 und Pkd2, die für die Transmembranproteine Polycystin 1 (PC1) und Polycystin 2 (PC2) codieren, welche im primären Zilium exprimiert werden. Die Entstehung der Zysten wird durch einen „second hit“ im gesunden Pkd-Allel initiiert. Ungefähr 25 % der Erkrankten tragen Missense-Mutationen, die auf Aminosäureaustauschen beruhen. Das veränderte PC1 zeigt häufig eine herabgesetzte Funktionalität. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors Xbp1s die Funktion des mutierten PC1 verbessern und dadurch die Progression der Zystenausbildung reduziert werden kann. Xbp1s stellt einen integralen Bestandteil der Unfolded Protein Response (UPR) dar, die bei erhöhtem Faltungsstress, wie im Fall einer PC1-Mutation, des endoplasmatischen Retikulums aktiviert wird.

Methoden:

Als Basis diente ein Pkd1<sup>R2216W</sup>-Mutations-Mausmodell. Die genetische Modifikation wurde mittels CRISPR/Cas9 durchgeführt und entspricht der Pkd1<sup>R2220W</sup>-Mutation des Menschen. Im nächsten Schritt wurde das gesunde Allel mittels loxP/Cre-Technologie ausgeschaltet, um den „second hit“ zu imitieren und die Zystenentstehung zu initiieren. Die Cre-Rekombinase konnte durch die Kopplung an das nierenspezifische Protein Pkhd1 ausschließlich im distalen Tubulus der Niere exprimiert werden. Dann wurde in dem ubiquitär vorkommenden ROSA26 Genlokus ein Xbp1s Knock-In-Transgen implementiert, das durch eine loxP-Paarung pausiert wurde. Dieser „Silencer“ wurde dann durch die Expression von Pkhd1-Cre in der Niere ausgeschaltet und Xbp1s sollte vermehrt exprimiert werden (ca. 3x). Es gelang die Züchtung des Versuchstieres Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s. Nun konnte die Auswirkung der erhöhten Xbp1s-Expression mittels Auswertung von histologischen, biochemischen, immunhistochemischen und Western Blot-Versuchen analysiert werden. Die histologische, morphologische Auswertung wurde um den „Cystic Index“ (CI) als quantitatives Instrument ergänzt. Die

Quantifizierung des zystischen Phänotyps wurde zusätzlich durch die „Kidney weight to body weight ratio“ dargestellt. Um das Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zysten-zellen zu analysieren, wurden Ki-67-Färbungen und TUNEL-Assays durchgeführt. Der Western Blot wurde zur Identifikation von Xbp1s im Nierenlysat durchgeführt.

#### Ergebnisse:

Im direkten Vergleich des Versuchstiers  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s$  mit den Kontrollgruppen  $Pkd1^{R2216W/+}$  und  $Pkd1^{R2216W/flox}; Pkhd1-Cre$  zeigte sich unter der erhöhten Expression von Xbp1s eine signifikante Verbesserung des zystischen Phänotyps und der Nierenfunktion (BUN). Die histologische, morphologische Auswertung und der „Cystic Index“ (CI) als quantitatives Instrument zeigten eine signifikante Reduktion der Zystenbildung mit deutlich mehr erhaltenem funktionalem Nierengewebe als die Kontrollgruppe. Die physiologische Auswertung durch die „Kidney weight to body weight ratio“ zeigte ebenfalls eine Abnahme der Nierenmasse in Relation zur Gesamtkörpermasse und unterstützte dadurch die Erkenntnisse aus der Auswertung des CI. Die Analyse des Proliferations- und Apoptoseverhalten der Zysten-zellen durch Ki-67-Färbungen und TUNEL-Assays zeigten eine reduzierte Proliferationsrate bei unveränderter Apoptose-rate.

#### Schlussfolgerung:

Die vermehrte Expression von Xbp1s in einem  $Pkd1$ -Missense Mutationsmodell mit Expression eines hypomorphen PC1-Moleküls führt zu einer signifikanten Verbesserung des Phänotyps und der Nierenfunktion. Weitere Versuche, die die Mechanismen der Unfolded Protein Response (UPR) weiter entschlüsseln, könnten potentielle Therapieziele zur Behandlung von ADPKD identifizieren.

## 6. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Strukturen von Polycystin 1 und Polycystin 2, nicht maßstabsgetreu. Fokus liegt hier auf der Darstellung von PC1 und PC2 als Transmembranproteine mit intra- und extrazellulären Domänen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird nicht auf alle abgebildeten Strukturen im Text eingegangen (Gallagher et al., 2010). ..... 12
- Abb. 2:** Signalkaskade der UPR mit ihren 3 nachgeschalteten Signalwegen von IRE1 $\alpha$ , PERK und ATF6. Nicht maßstabsgetreu (Park et al., 2021). ..... 16
- Abb. 3:** IRE1 $\alpha$ -Signalkaskaden mit adaptiv-protectivem und apoptotischem Signalweg Nicht maßstabsgetreu (Jäger et al., 2012). ..... 18
- Abb. 4:** Nachweis des gewünschten Genotyps Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>, Pkhd1-Cre. Wildtyp (WT), Heterozygot (HZ), Knock-Out (KO)..... 39
- Abb. 5:** Nachweis des ROSA26-Xbp1s Allels. .... 40
- Abb. 6:** Expression von Xbp1s bei Pkhd1-positivem Genotyp; Ladungskontrolle mit Lamin A/C (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023). ..... 42
- Abb. 7:** „Whole kidney scans“ als HE-Schnitte zeigen deutliche histologische Unterschiede zwischen den Vergleichsmodellen (Pkd1<sup>R2216W/+</sup> und Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre) und dem Versuchstier (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s) zum Zeitpunkt p16. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023). ..... 44
- Abb. 8:** Der Cystic Index zeigt das Verhältnis der von Zysten eingenommen Fläche im HE-Schnitt in Relation zur Gesamtfläche des HE-Schnittes zum Zeitpunkt p16. Kontrollgruppen (Pkd1<sup>R2216W/+</sup>, n=10, Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre, n=6) gegen die Versuchsgruppe (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s, n=10), (\*\*P<0,001)..... 45

**Abb. 9:** Verhältnis Nierengewicht zu Gesamtkörpergewicht der Tiere. Kontrollgruppen (Pkd1<sup>R2216W/+</sup>, n=10, Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre, n=6) gegen die Versuchsgruppe (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s, n=10) zum Zeitpunkt p16, (\*\*P<0,001). .. 46

**Abb. 10:** Vergleich der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Werte (BUN) der gesunden Kontrollen (Pkd1<sup>R2216W/+</sup>, n=7) mit den erkrankten Kontrollen (Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre, n=5) und der Versuchsgruppe Pkd1<sup>R2216W/flox</sup>; Pkhd1-Cre, ROSA26-Xbp1s, n=5) zum Zeitpunkt p16, (\*\*P<0,001; \* P<0,05)..... 47

**Abb. 11:** Sammelrohrzellen (DBA-positiv/rot) zeigen eine deutliche Expression von Xbp1s (grün), Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023)..... 48

**Abb. 12:** Darstellung von Ki67 in DBA-positiven Sammelrohrzellen beider Mauslinien. Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023)..... 50

**Abb. 13:** ROSA26-XBP1s positive Zellen zeigen eine signifikant geringere Expression von Ki76, (\*\*P<0,001)..... 51

**Abb. 14:** Darstellung von TUNEL in DBA-positiven Sammelrohrzellen beider Mauslinien. Vergrößerung 60-fach. Nicht maßstabsgetreu (Abbildung modifiziert nach Krappitz et al., 2023)..... 52

**Abb. 15:** Anteil der TUNEL-positiven Zellen bei Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; Pkhd1-Cre und Pkd1<sup>R2216W/+</sup>; Pkhd1-Cre; ROSA26-Xbp1s. .... 53

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Verantwortliche Gene und Pathomechanismen bei ADPKD und ADPLD .....	20
<b>Tab. 2:</b> Primer, die für die Genotypisierung verwendet wurden .....	23
<b>Tab. 3:</b> Reaktionsansatz für einen vollständigen PCR-Durchlauf.....	24
<b>Tab. 4:</b> PCR-Programme (ROSA26-Xbp1s, Pkhd1-Cre; RW-V5, Pkd1-flox).....	24
<b>Tab. 5:</b> Antikörper für die Ki67-Immunfluoreszenz .....	27
<b>Tab. 6:</b> Lektine bei der Ki67-Färbung .....	27
<b>Tab. 7:</b> Lektine beim TUNEL-Assay .....	28
<b>Tab. 8:</b> Antikörper für Xbp1s-Immunfluoreszenz .....	29
<b>Tab. 9:</b> Lektine bei Xbp1s Immunfluoreszenz .....	29
<b>Tab. 10:</b> Primärantikörper für die Western Blots .....	33
<b>Tab. 11:</b> Sekundärantikörper für die Wester Blots.....	33
<b>Tab. 12:</b> Ansatz des Stripping Puffers .....	33
<b>Tab. 13:</b> Chemikalien.....	34
<b>Tab. 14:</b> Puffer und Lösungen .....	37
<b>Tab. 15:</b> Geräte und Software .....	38

## 8. Literaturverzeichnis

Bernales S, Soto MM, McCullagh E. Unfolded protein stress in the endoplasmic reticulum and mitochondria: a role in neurodegeneration. *Front Aging Neurosci* 2012; 4: 5

Brasier JL, Henske EP. Loss of the polycystic kidney disease (Pkd1) region of chromosome 16p13 in renal cyst cells supports a loss-of-function model for cyst pathogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99: 194-199

Cai Y, Fedeles SV, Dong K, Anyatonwu G, Onoe T, Mitobe M, Gao JD, Okuhara D, Tian X, Gallagher AR, Tang Z, Xie X, Lalioti MD, Lee AH, Ehrlich BE, Somlo S. Altered trafficking and stability of polycystins underlie polycystic kidney disease. *J Clin Invest* 2014; 124: 5129-5144

Cai Y, Maeda Y, Cedzich A, Torres VE, Wu G, Hayashi T, Mochizuki T, Park JH, Witzgall R, Somlo S. Identification and characterization of polycystin-2, the Pkd2 gene product. *J Biol Chem* 1999; 274: 28557-28565

Chapman AB, Bost JE, Torres VE, Guay-Woodford L, Bae KT, Landsittel D, Li J, King BF, Martin D, Wetzel LH, Lockhart ME, Harris PC, Moxey-Mims M, Flessner M, Bennett WM, Grantham JJ. Kidney volume and functional outcomes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012; 7: 479-486

Clauss IM, Chu M, Zhao JL, Glimcher LH. The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1855-1864

Cornec-Le Gall E, Audrézet MP, Chen JM, Hourmant M, Morin MP, Perrichot R, Charasse C, Whebe B, Renaudineau E, Jousset P, Guillodo MP, Grall-Jezequel A, Saliou P, Férec C, Le Meur Y. Type of Pkd1 mutation influences renal outcome in ADPKD. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24: 1006-1013

Davila S, Furu L, Gharavi AG, Tian X, Onoe T, Qian Q, Li A, Cai Y, Kamath PS, King BF, Azurmendi PJ, Tahvanainen P, Kääriäinen H, Höckerstedt K, Devuyst O, Pirson Y, Martin RS, Lifton RP, Tahvanainen E, Torres VE, Somlo S. Mutations in SEC63 cause autosomal dominant polycystic liver disease. *Nat Genet* 2004; 36: 575-577

Deane JA, Ricardo SD. Emerging roles for renal primary cilia in epithelial repair. *Int Rev Cell Mol Biol* 2012; 293:169-193

Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 2008; 27: 6245-6251

Ecdar T, Schrier RW. Hypertension and left ventricular hypertrophy in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2: 369-374

Erickson KF, Chertow GM, Goldhaber-Fiebert JD. Cost-effectiveness of tolvaptan in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Ann Intern Med* 2014; 160: 143

Fedeles SV, Gallagher AR, Somlo S. Polycystin-1: a master regulator of intersecting cystic pathways. *Trends Mol Med* 2014; 20: 251-260

Fedeles SV, So JS, Shrikhande A, Lee SH, Gallagher AR, Barkauskas CE, Somlo S, Lee AH. Sec63 and Xbp1 regulate IRE1 $\alpha$  activity and polycystic disease severity. *J Clin Invest* 2015; 125: 1955-1967

Fedeles SV, Tian X, Gallagher AR, Mitobe M, Nishio S, Lee SH, Cai Y, Geng L, Crews CM, Somlo S. A genetic interaction network of five genes for human polycystic kidney and liver diseases defines polycystin-1 as the central determinant of cyst formation. *Nat Genet* 2011; 43: 639-647

Fischer M. 2020: Potter Klassifikation. <https://www.pschyrembel.de/Potter-Klassifikation/KORA0> (17.10.2022)

Gallagher AR, Germino GG, Somlo S. Molecular advances in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010; 17: 118-130

Geng L, Okuhara D, Yu Z, Tian X, Cai Y, Shibasaki S, Somlo S. Polycystin-2 traffics to cilia independently of polycystin-1 by using an N-terminal RVxP motif. *J Cell Sci* 2006; 119: 1383-1395

Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AA, Vernekar SN. Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci* 2010; 2: 170-173

Grandjean JMD, Madhavan A, Cech L, Seguinot BO, Paxman RJ, Smith E, Scampavia L, Powers ET, Cooley CB, Plate L, Spicer TP, Kelly JW, Wiseman RL. Pharmacologic IRE1/XBP1s activation confers targeted ER proteostasis reprogramming. *Nat Chem Biol* 2020; 16: 1052-1061

Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999; 397: 271-274

Hassan H, Tian X, Inoue K, Chai N, Liu C, Soda K, Moeckel G, Tufro A, Lee AH, Somlo S, Fedeles S, Ishibe S. Essential Role of X-Box Binding Protein-1 during Endoplasmic Reticulum Stress in Podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2016; 27: 1055-1065

Hateboer N, Lazarou LP, Williams AJ, Holmans P, Ravine D. Familial phenotype differences in Pkd11. *Kidney Int* 1999; 56: 34-40

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 3787-3799

Helal I. Treatment and Management of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. In: Li X, Hrsg. Polycystic Kidney Disease. Brisbane (AU): Codon Publications 2015: Chapter 3

Hopp K, Ward CJ, Hommerding CJ, Nasr SH, Tuan HF, Gainullin VG, Rossetti S, Torres VE, Harris PC. Functional polycystin-1 dosage governs autosomal dominant polycystic kidney disease severity. *J Clin Invest* 2012; 122: 4257-4273

Hosten AO. BUN and Creatinine. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, Hrsg. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd ed. Boston: Butterworths 1990: Chapter 193

Jäger R, Bertrand MJ, Gorman AM, Vandenabeele P, Samali A. The unfolded protein response at the crossroads of cellular life and death during endoplasmic reticulum stress. *Biol Cell* 2012; 104: 259-270

Jiang ST, Chiou YY, Wang E, Lin HK, Lin YT, Chi YC, Wang CK, Tang MJ, Li H. Defining a link with autosomal-dominant polycystic kidney disease in mice with congenitally low expression of Pkd1. *Am J Pathol* 2006; 168: 205-220

Karihaloo A, Korashy F, Huen SC, Lee Y, Merrick D, Caplan MJ, Somlo S, Cantley LG. Macrophages promote cyst growth in polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011; 22: 1809-1814

Kim DY, Park JH. Genetic Mechanisms of ADPKD. *Adv Exp Med Biol* 2016; 933: 13-22

Krappitz M, Gallagher AR, Fedeles S. Is it Time to Fold the Cysts Away? *Trends Mol Med* 2016; 22: 997-999

LaRiviere WB, Irazabal MV, Torres VE. Novel therapeutic approaches to autosomal dominant polycystic kidney disease. *Transl Res* 2015; 165: 488-498

Lantinga-van Leeuwen IS, Dauwerse JG, Baelde HJ, Leonhard WN, van de Wal A, Ward CJ, Verbeek S, Deruiter MC, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Lowering of Pkd1 expression is sufficient to cause polycystic kidney disease. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 3069-3077

Lantinga-van Leeuwen IS, Leonhard WN, van der Wal A, Breuning MH, de Heer E, Peters DJ. Kidney-specific inactivation of the Pkd1 gene induces rapid cyst formation in developing kidneys and a slow onset of disease in adult mice. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 3188-3196

Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 7448-7459

Li A, Davila S, Furu L, Qian Q, Tian X, Kamath PS, King BF, Torres VE, Somlo S. Mutations in PRKCSH cause isolated autosomal dominant polycystic liver disease. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 691-703

Li A, Tian X, Sung SW, Somlo S. Identification of two novel polycystic kidney disease-1-like genes in human and mouse genomes. *Genomics* 2003; 81: 596-608

Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18:716-731

Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells *Trends Biochem Sci* 2016; 41:211-218

Magistrini R, Boletta A. Defective glycolysis and the use of 2-deoxy-D-glucose in polycystic kidney disease: from animal models to humans. *J Nephrol* 2017; 30: 511-519

Meca R, Balbo BE, Ormanji MS, Fonseca JM, Iannuzzi LR, Santana Costa E, Onuchic LF, Heilberg IP. Caffeine Accelerates Cystic Kidney Disease in a Pkd1-Deficient Mouse Model. *Cell Physiol Biochem* 2019; 52: 1061-1074

Michael L, Sweeney DE, Davies JA. The lectin *Dolichos biflorus* agglutinin is a sensitive indicator of branching morphogenetic activity in the developing mouse metanephric collecting duct system. *J Anat* 2007; 210: 89-97

Milutinovic J, Rust PF, Fialkow PJ, Agodoa LY, Phillips LA, Rudd TG, Sutherland S. Intra-familial phenotypic expression of autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1992; 19: 465-472

Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, Miyazono K, Ichijo H. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell* 1998; 2: 389-395

Nieto JA, Yamin MA, Goldberg ID, Narayan P. An Empirical Biomarker-Based Calculator for Cystic Index in a Model of Autosomal Recessive Polycystic Kidney Disease-The Nieto-Narayan Formula. *PLoS One* 2016 3; 11: 0163063

Park SM, Kang TI, So JS. Roles of XBP1s in Transcriptional Regulation of Target Genes. *Biomedicines* 2021; 9: 791

Pei Y, Paterson AD, Wang KR, He N, Hefferton D, Watnick T, Germino GG, Parfrey P, Somlo S, St George-Hyslop P. Bilineal disease and trans-heterozygotes in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 355-363

Pei Y, Watnick T, He N, Wang K, Liang Y, Parfrey P, Germino G, St George-Hyslop P. Somatic *Pkd2* mutations in individual kidney and liver cysts support a "two-hit" model of cystogenesis in type 2 autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 1524-1529

Persu A, Duyme M, Pirson Y, Lens XM, Messiaen T, Breuning MH, Chauveau D, Levy M, Grünfeld JP, Devuyst O. Comparison between siblings and twins supports a role for modifier genes in ADPKD. *Kidney Int* 2004; 66: 2132-2136

Piontek K, Menezes LF, Garcia-Gonzalez MA, Huso DL, Germino GG. A critical developmental switch defines the kinetics of kidney cyst formation after loss of Pkd1. *Nat Med* 2007; 13:1490-1495

Qian F, Boletta A, Bhunia AK, Xu H, Liu L, Ahrabi AK, Watnick TJ, Zhou F, Germino GG. Cleavage of polycystin-1 requires the receptor for egg jelly domain and is disrupted by human autosomal-dominant polycystic kidney disease 1-associated mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16981-16986

Qian F, Watnick TJ, Onuchic LF, Germino GG. The molecular basis of focal cyst formation in human autosomal dominant polycystic kidney disease type I. *Cell* 1996; 6: 979-987

Ratnam S, Nauli SM. Hypertension in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease. A Clinical and Basic Science Perspective. *Int J Nephrol Urol* 2010; 2: 294-308

Ravine D, Walker RG, Gibson RN, Forrest SM, Richards RI, Friend K, Sheffield LJ, Kincaid-Smith P, Danks DM. Phenotype and genotype heterogeneity in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 1992; 340: 1330-1333

Robinson BE, Weber H. Dehydration despite drinking: beyond the BUN/Creatinine ratio. *J Am Med Dir Assoc* 2004; 5: 67-71

Rossetti S, Burton S, Strmecki L, Pond GR, San Millán JL, Zerres K, Barratt TM, Ozen S, Torres VE, Bergstralh EJ, Winearls CG, Harris PC. The position of the polycystic kidney disease 1 (Pkd1) gene mutation correlates with the severity of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:1230-1237

Rossetti S, Kubly VJ, Consugar MB, Hopp K, Roy S, Horsley SW, Chauveau D, Rees L, Barratt TM, van't Hoff WG, Niaudet P, Torres VE, Harris PC. Incompletely penetrant Pkd1 alleles suggest a role for gene dosage in cyst initiation in polycystic kidney disease. *Kidney Int* 2009; 75: 848-855

Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 3460-3470

Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 7499-7509

Sequeira SJ, Ranganathan AC, Adam AP, Iglesias BV, Farias EF, Aguirre-Ghiso JA. Inhibition of proliferation by PERK regulates mammary acinar morphogenesis and tumor formation. *PLoS One* 2007; 2: 615

Spaan CN, Smit WL, van Lidth de Jeude JF, Meijer BJ, Muncan V, van den Brink GR, Heijmans J. Expression of UPR effector proteins ATF6 and XBP1 reduce colorectal cancer cell proliferation and stemness by activating PERK signaling. *Cell Death Dis* 2019; 10: 490

Su Q, Hu F, Ge X, Lei J, Yu S, Wang T, Zhou Q, Mei C, Shi Y. Structure of the human Pkd1-Pkd2 complex. *Science* 2018; 361: 9819

Swenson-Fields KI, Vivian CJ, Salah SM, Peda JD, Davis BM, van Rooijen N, Wallace DP, Fields TA. Macrophages promote polycystic kidney disease progression. *Kidney Int* 2013; 83: 855-864

Ta CM, Vien TN, Ng LCT, DeCaen PG. Structure and function of polycystin channels in primary cilia. *Cell Signal* 2020; 72:109626

Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 663-674

Torra R. Autosomal dominant polycystic kidney disease, type 2 (Pkd2 disease). *Adv Nephrol Necker Hosp* 1999; 29:277-287

Torres VE, Chapman AB, Devuyst O, Gansevoort RT, Grantham JJ, Higashihara E, Perrone RD, Krasa HB, Ouyang J, Czerwiec FS. Tolvaptan in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med* 2012; 367: 2407-2418

Torres VE, Harris PC, Pirson Y. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *Lancet* 2007; 14: 1287-1301

Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 2000; 287: 664-666

Venkatesh D. Primary cilia. *J Oral Maxillofac Pathol* 2017; 21: 8-10

Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 2011; 334: 1081-1086

Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashtiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC. Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 2703-2710

Watnick TJ, Torres VE, Gandolph MA, Qian F, Onuchic LF, Klinger KW, Landes G, Germino GG. Somatic mutation in individual liver cysts supports a two-hit model of cystogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Mol Cell* 1998; 2: 247-251

Wu G, D'Agati V, Cai Y, Markowitz G, Park JH, Reynolds DM, Maeda Y, Le TC, Hou H Jr, Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Somatic inactivation of Pkd2 results in polycystic kidney disease. *Cell* 1998; 93: 177-188

Wu J, He GT, Zhang WJ, Xu J, Huang QB. IRE1 $\alpha$  Signaling Pathways Involved in Mammalian Cell Fate Determination. *Cell Physiol Biochem* 2016; 38: 847-858

Xing F, Cornish TC, Bennett T, Ghosh D, Yang L. Pixel-to-Pixel Learning With Weak Supervision for Single-Stage Nucleus Recognition in Ki67 Images. *IEEE Trans Biomed Eng* 2019; 66: 3088-3097

Xing F, Su H, Neltner J, Yang L. Automatic Ki-67 counting using robust cell detection and online dictionary learning. *IEEE Trans Biomed Eng* 2014 ; 61: 859-870

Xu M, Ma L, Bujalowski PJ, Qian F, Sutton RB, Oberhauser AF. Analysis of the REJ Module of Polycystin-1 Using Molecular Modeling and Force-Spectroscopy Techniques. *J Biophys* 2013; 2013: 525231

Yang Y, Chen M, Zhou J, Lv J, Song S, Fu L, Chen J, Yang M, Mei C. Interactions between Macrophages and Cyst-Lining Epithelial Cells Promote Kidney Cyst Growth in Pkd1-Deficient Mice. *J Am Soc Nephrol* 2018; 29: 2310-2325

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001; 107: 881-891

Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García-González MA, Menezes LF, Xu H, Germino GG, Zuo J, Qian F. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 18688-18693

Yu Y, Ulbrich MH, Li MH, Buraei Z, Chen XZ, Ong AC, Tong L, Isacoff EY, Yang J. Structural and molecular basis of the assembly of the TRPP2/Pkd1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 11558-11563

## 9. Danksagung

Ich danke Dr. Matteus Krappitz für die Unterstützung, Einweisung und Betreuung in die Laborarbeit bei Professor Somlo. Die Arbeit im Labor und die freundschaftliche Kooperation vor Ort haben die gemeinsame Zusammenarbeit deutlich befördert.

Ich danke vor allem Sorin Fedeles, MBA, PhD als dem verantwortlichen Wissenschaftler dieses Projekt und sein Vertrauen, dass er in meine Hände gelegt hat.

Ich bedanke mich bei Professor Somlo, der mich als Wissenschaftler in seinem Labor arbeiten ließ und ohne dessen Zuspruch ich nicht an die Yale University hätte gehen können.

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Dr. Lutz, der die zielstrebige und unkomplizierte Betreuung an der Universität Bonn ermöglichte.

Ein großer Dank geht an Dr. David Ruemmele, der mich bei dieser Arbeit maßgeblich unterstützt hat und trotz seiner Arbeit in der Klinik für mich immer erreichbar war.

Ich danke meiner Partnerin Jana Frank für die Unterstützung zuhause; dafür, dass ich mich ausschließlich auf die Arbeit konzentrieren konnte, weil sie mir den Rücken freigehalten hat.

Ich bedanke mich bei meinem Freund Dr. Nikolaus Handke. Seine stets motivierenden Worte waren für mich Energiequelle und Ansporn zugleich und haben mich immer wieder motiviert.

Ich bedanke mich bei meiner Familie. Meinen Eltern Klaus und Annette und meinem Bruder Niklas Hollmann. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte. Ihr Zuspruch war für mich eine notwendige Bedingung für dieses Vorhaben.