

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Funktionelle Untersuchungen zu NPHP1 mittels CRISPR/Cas9 basiertem Genome Engineering

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

vorgelegt von
Lea Münkner
aus Wuppertal

promoviert am 22. August 2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer
2. Gutachter: Professor Dr. med. H. J. Bolz

Erklärung

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

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

Herr Prof. Dr. Bernhard Schermer
Frau Dr. Lena Ebert

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

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

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Prof. Bernhard Schermer und Frau Dr. Lena Ebert überwiegend von mir selbst ausgeführt worden.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Organschnitte und histologischen Färbungen sind von mir mit Unterstützung durch die medizinisch-technische Assistentin Frau Martyna Brütting durchgeführt worden.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

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

Köln, den 06.01.2025

Unterschrift:

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne deren Hilfe und Engagement die Entstehung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Die Entscheidung, mich mit diesem Thema auseinanderzusetzen, ergab sich für mich, durch meine persönliche Verbindung zu Menschen, die von zystischen Nierenerkrankungen betroffen sind.

Daher möchte ich zunächst Herrn Professor Dr. Thomas Benzing danken, für die Bereitstellung der Rahmenbedingungen und für die Möglichkeit als Teil seines engagierten Teams wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt ebenso meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Bernhard Schermer, sowie meiner Betreuerin Frau Dr. Lena Ebert, die mich stets bei der Durchführung der Experimente und der Auswertung dieser Arbeit unterstützt haben und für Fragen und Anregungen immer zur Verfügung standen.

Dem gesamten Team des nephrologischen Forschungslabors möchte ich ebenso danken, insbesondere Frau Martyna Brütting, die mich bei der Durchführung der histologischen Experimente besonders unterstützt hat.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung möchte ich mich bei dem Verein für familiäre Zystennieren PKD e.V. bedanken, die mich im Rahmen des PKD-Grants gefördert haben. Darüber hinaus danke ich dem Köln Fortune Programm für die Förderung im Rahmen eines Forschungsstipendiums.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich während meines Studiums und der Erstellung dieser Arbeit stets emotional unterstützt und motiviert haben.

Meinen Eltern und Großeltern.
Meinen Geschwistern.
Henrik, Svea und Alva.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1. ZUSAMMENFASSUNG	11
2. EINLEITUNG	12
2.1 Hereditäre zystische Nierenerkrankungen	12
2.1.1. Die Nephronophthise (NPH)	13
2.1.2. Zilien und Ziliopathien	15
2.1.3. NPHP1	16
2.2 Genome Editing mittels CRISPR-Cas9	17
2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	18
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Material	19
3.1.1. Enzyme	19
3.1.2. DNA-Konstrukte	19
3.1.3. Antikörper	20
3.1.4. DNA-Oligonukleotide für sgRNAs/Primer	20
3.1.5. Zelllinien	22
3.1.6. Kits	22
3.1.7. Reagenzien und Chemikalien	22
3.1.8. Verbrauchsmaterial	25
3.1.9. Geräte/Werkzeuge	27
3.1.10. Software/Datenbanken	28
3.2 Methoden	29
3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	29
3.2.2. Enzymatischer Verdau und Klonierung	29
3.2.3. Amplifikation von Plasmiden	30
3.2.4. Sequenzierung	30
3.2.5. CRISPR/Cas9	31
3.2.6. Design der sgRNAs	31
3.2.7. Klonierung der sgRNAs in den pSpCas9(BB)-2A-GFP Vector	32
3.2.8. Zellkultur	32
3.2.9. Auftauen von Zellen	32
3.2.10. Splitten von Zellen	32
3.2.11. Einfrieren von Zellen	33

3.2.12.	Transfektion mit Calciumphosphat	33
3.2.13.	Transfektion mit Lipofectamin 2000	34
3.2.14.	Analyse der KO Zellen mittels FACS	34
3.2.15.	Analyse der Einzelzellklone im 96-well	34
3.2.16.	Herstellung von Zelllysaten (WCL)	35
3.2.17.	Herstellung/Aufbereitung von monoklonalen anti-Nphp1 Antikörpern	36
3.2.18.	Ammoniumsulfat Präzipitation	36
3.2.19.	Aufreinigung der anti-Nphp1 AK mittels Protein G Beads	36
3.2.20.	Konzentrationsbestimmung der anti-Nphp1 AK	37
3.2.21.	Immunopräzipitation	38
3.2.22.	Aufbereitung der IP Proben für SDS-PAGE und Westernblot	38
3.2.23.	Aufbereitung der IP Proben für MS	39
3.2.24.	Aufbereitung der Proteine mittels In Gel Digest für MS	39
3.2.25.	Aufbereitung der Proteine mittels In Solution Digest für MS	40
3.2.26.	StageTip	41
3.2.27.	Quantifizierung von Proteinen	41
3.2.28.	SDS-PAGE und Westernblot	41
3.2.29.	Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	42
3.2.30.	SDS-PAGE	42
3.2.31.	Westernblot	43
3.2.32.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen	44
3.2.33.	Herstellung der sgRNA zu Generierung von Mauslinien	45
3.2.34.	Generierung der transgenen Mauslinie mittels CRISPR/Cas9	45
3.2.35.	Aufbereitung der Eartags für die Genotypisierung	45
3.2.36.	Genotypisierungs-PCR für die Nphp1 Mäuse	46
3.2.37.	Herstellung der Organschnitte	46
3.2.38.	PAS-Färbung	46
4.	ERGEBNISSE	48
4.1	Herstellung und Validierung von NPHP1 defizienten humanen Nierenepithelzellen basierend auf der HKC8 Zelllinie	48
4.2	Der KO von NPHP1 in HKC8 Zellen wird auf Proteinebene bestätigt	50
4.3	Analyse des Proteoms in NPHP1 defizienten Zellen	51
4.4	Eine mittels CRISPR/Cas9 generierte Nphp1 defiziente Mauslinie zeigt keinen offensichtlichen renalen Phänotyp	58
4.5	Die Nphp1 KO Mauslinie entwickelt keinen Phänotyp	60
4.6	Die Aufreinigung und Quantifizierung monoklonaler anti-Nphp1 AK	64
4.7	Positive Testung der anti-Nphp1 AK für Immunopräzipitation in Zellen bei überexprimiertem und endogenem Nphp1	66

4.8	Der anti-Nphp1 #62 Antikörper bestätigt die Lokalisation von NPHP1 an der Zilienbasis von HKC8 Zellen	68
4.9	Austestung der IP Konditionen mit anti-Nphp1 #62 AK an Mausgewebe zeigt gute Immunopräzipitation von Nphp1 in Hoden und Nieren	69
4.10	Nphp1 lässt sich in den Hoden der Nphp1 ^{-/-} Mäuse mittels Massenspektrometrie nicht nachweisen	71
4.11	Das Nphp1 Interaktom aus Mausnieren	72
5.	DISKUSSION	78
5.1	Einfluss von NPHP1 auf die Ziliogenese und die Morphologie primärer Zilien	78
5.2	Proteom der NPHP1 KO Zellen	78
5.3	Die Rolle von NPHP1 im Hinblick auf immunmodulative Prozesse	79
5.4	Die Nphp1 defizienten Mäuse zeigen keinen Phänotyp	80
5.5	Das Nphp1 Interaktom in der Maus	82
5.6	Ausblick	83
6.	LITERATURVERZEICHNIS	84
7.	ANHANG	87
7.1	Abbildungsverzeichnis	87
7.2	Tabellenverzeichnis	87
7.3	Lebenslauf	88
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN	91

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Ammoniumbicarbonat
ACN	Acetonitril
ADPKD	Engl.: autosomal-dominant polycystic kidney disease
AK	Antikörper
ARPKD	Engl.: autosomal-rezessive polycystic kidney disease
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Engl.: base pairs
CAA	2-Chloroacetamid
Cas9	Engl.: CRISPR-associated protein 9
CCG	Cologne Center for Genomics
KO	Engl.: Knockout
CRISPR	Engl.: clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
DNA	Engl.: desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Engl.: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Engl.: Fluorescence Activated Cell Sorting
FBS	Engl.: fetal bovine serum
GFP	Engl.: green fluorescent protein
HDR	Engl.: homology-directed repair
HEBS	Engl.: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonic acid buffered saline
HEK	Engl.: human embryonic kidney
HKC	Engl.: human kidney cell
HRP	Engl.: Horseradish Peroxidase
IAA	Iodacetamid
iBAQ	Engl.: intensity Based Absolute Quantification
IF	Immunfluoreszenz
IFT	Intraflagellarer Transport
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
kb	Engl.: kilo base
LB	Engl.: lysogeny broth
mAb	Engl.: monoclonal antibody

MS	Massenspektrometrie
NDS	Engl.: normal donkey serum
nLC-MS/MS	Engl.: Nano-scale liquid chromatographic tandem mass spectrometry
NHD	Nephrocystin-homologie Domäne
NHEJ	Engl.: non-homologous end joining
NPH	Nephronophthise
<i>NPHP1</i>	Nephronophthise 1 Gen
NPHP1	Nephrocystin-1
<i>NPHP2</i>	Nephronophthise 2 Gen
NPHP2	Nephrocystin-2/Inversin
<i>NPHP3</i>	Nephronophthise 3 Gen
NPHP3	Nephrocystin-3
<i>NPHP4</i>	Nephronophthise 4 Gen
NPHP4	Nephrocystin-4
<i>NPHP8</i>	Nephronophthise 8 Gen
nt	Engl.: nucleotide
PAM	Engl.: proto-spacer adjacent motif
PBS	Engl.: <i>phosphate buffered saline</i>
PC1	Polycystin-1
PC2	Polycystin-2
PCR	Engl.: polymerase chain reaction
PFA	Para-Formaldehyd
<i>PKD1</i>	Engl.: polycystic kidney disease 1 gene
<i>PKD2</i>	Engl.: polycystic kidney disease 2 gene
<i>PKHD1</i>	Engl.: polycystic kidney and hepatic disease 1 gene
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
pAb	Engl.: primary antibody
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RNA	Engl.: ribonucleic acid
rpm	Engl.: rounds per minute
SDS	Engl.: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
sgRNA	Engl.: single chimeric guided RNA
SOC	Engl.: Super Optimal broth with Catabolite repression
ssODN	Engl.: single-stranded oligo DNA nucleotide
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat

TMED	Tetramethylethylendiamin
tracrRNA	Engl.: trans-activating crRNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
WCL	Engl.: whole cell lysate
wt	Wildtyp

1. Zusammenfassung

Zystische Nierenerkrankungen stellen in ihrer Gesamtheit eine der häufigsten genetischen Ursachen für die terminale Niereninsuffizienz im Kindes- und Erwachsenenalter dar. Die wichtigsten Vertreter sind die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) und die pädiatrische rezessive Form (ARPKD), sowie die ebenfalls meist pädiatrische Nephronophthise (NPH). Im Gegensatz zur mit einer Inzidenz von 1:1000 recht häufigen ADPKD zählt die NPH zu den seltenen genetischen Erkrankungen. Sie ist jedoch weltweit die häufigste genetische Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz im Kindes- und Jugendalter. Bereits früh wurden pathogene Mutationen im Gen *NPHP1* mit dem korrelierenden Protein Nephrozystin-1 als Krankheitsursache beschrieben. Mittlerweile wurden mehr als 19 weitere NPHP Gene identifiziert, der genaue Pathomechanismus der NPH und die Funktion dieser NPHP Gene ist aber nach wie vor wenig verstanden und somit fehlen ursächliche Therapien.

Mittels CRISPR/Cas9 basiertem Genome Engineering konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich renale Epithelzellen und Mäuse mit einer *Nphp1*-Defizienz („knockout“) generiert und validiert werden. In den Zellexperimenten zeigt sich mittels Immunfluoreszenz eine reduzierte Zahl Zilien tragender Zellen, sowie eine verringerte Zilienlänge bei den *Nphp1*-defizienten Zellen. Weiterhin zeigte die Analyse der Proteinexpression mittels MS/MS nur geringfügige Veränderungen im Expressionsprofil. In den *Nphp1*^{-/-} Mäusen konnte darüber hinaus in massenspektrometrischen Analysen der Verlust von *Nphp1* bestätigt werden. Die entsprechenden Tiere wiesen jedoch keinen offensichtlichen renalen Phänotyp auf. So zeigen sich keine Gewichtsunterschiede und keine morphologischen Veränderungen der Niere im Sinne von Zysten oder Fibrose. Im Zuge der Arbeit wurden weiterhin monoklonale Antikörper für die Immunpräzipitation validiert. Kombiniert mit den KO Modellen als Negativkontrolle konnten wir so ein *in vivo* *Nphp1* Interaktom zur detaillierten Analyse des NPHP1 Proteinkomplexes erstellen. Dabei konnten wir 154 potenzielle Interaktoren identifizieren. Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass *Nphp1*-defiziente Mäuse keinen offensichtlichen renalen oder hepatischen Phänotyp entwickeln bei einem nachgewiesenen Verlust der *Nphp1* Expression. Darüber hinaus haben die Zellexperimente gezeigt, dass ein *Nphp1* KO einen Einfluss auf die Ziliogenese zu haben scheint, allerdings das Expressionsprofil der Zellen nur wenig verändert.

2. Einleitung

2.1 Hereditäre zystische Nierenerkrankungen

Hereditäre zystische Nierenerkrankungen gehören einer Gruppe von Erkrankungen an, deren genetische Ursachen mannigfaltig sind. Bis heute sind mehr als 95 Gene bekannt, deren Mutation zu einer zystischen Nierenerkrankung führen kann. In mehr als der Hälfte der Fälle liegt eine pathogenetische Variante in nur einem Gen vor [1, 2]. Obwohl auch der klinische Verlauf eine große Heterogenität aufweist, führen alle Erkrankungen zu einer gestörten tubulären Morphologie in Form von Zysten oder dilatierten Tubuli [2, 3]. In Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Mutation und dem betroffenen Gen beginnt das Zystenwachstum bereits pränatal, in der Kindheit oder im jüngeren Erwachsenenalter.

Die Zysten variieren dabei in Größe, Anzahl und ihrer Ausdehnung über die verschiedenen Abschnitte der Niere. [3].

Von allen zystischen Nierenerkrankungen ist die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) am stärksten vertreten. Mit einer Inzidenz von 1:400 – 1:1000 weltweit ist sie damit gleichzeitig die häufigste dominant vererbte monogenetische Erkrankung. Die ADPKD wird durch Mutationen in den Genen *PKD1* oder *PKD2* verursacht, die jeweils für die Proteine Polycystin-1 (PC1) und Polycystin-2 (PC2) kodieren [4, 5]. Charakteristisch für die ADPKD sind multiples Zystenwachstum und eine massive Größenzunahme beider Nieren [4]. Etwa die Hälfte der Patienten mit ADPKD entwickelt bereits vor dem 40. Lebensjahr eine Hypertonie. Hinzu kommen abdominelle Schmerzen durch die Raumforderung und Zysteninfektionen, Harnsteine und gehäufte Harnwegsinfektionen [1, 5]. Neben den Nieren sind häufig auch andere Organe betroffen. Diese extrarenalen Manifestationen zeigen sich in der Leber und im Pankreas als Zysten, aber schließen auch Herzklappenfehler, intrakranielle oder Aortenaneurysmen ein. Mit zunehmender Zystengröße wird das Gefäßsystem der Nieren komprimiert, was eine intrarenale Ischämie, die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) eine verstärkte Natriumretention und schließlich renale Fibrose zur Folge hat [1, 6]. Die ADPKD macht sich in den meisten Fällen erst im Erwachsenenalter durch ihre typischen Symptome bemerkbar. Typischerweise kommt es bei den Patienten im Alter von 50-60 Jahren zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Eine Abnahme der Nierenfunktion im Kindesalter wird nur in seltenen Fällen beobachtet [7]. Bei weniger als 1% der Patienten ist die ADPKD bereits in der Fetal- und Neonatalperiode erkennbar und macht sich dann bereits durch Symptome im Kindesalter bemerkbar [1, 8]. Damit kommt die ADPKD auch als Differenzialdiagnose für zystische Nierenerkrankungen des Kindesalters in Betracht. Die klassischen pädiatrischen Formen der zystischen Nierenerkrankung sind die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) und die Nephronophthise (NPH), sowie die NPH-assoziierten Ziliopathien. Die ARPKD tritt mit einer Prävalenz von 1:20.000 deutlich

seltener auf als die ADPKD [8]. Ursächlich für die ARPKD sind Mutationen im Gen *PKHD1*, welches für das Protein Fibrocystin-1 kodiert [1, 5]. Die Erkrankung manifestiert sich bereits pränatal und zeigt im Ultraschall massiv vergrößerte zystische Nieren. In Abhängigkeit von der genauen Mutation kann auch die Niereninsuffizienz bereits pränatal oder nach der Geburt in der frühen Kindheit einsetzen. Eine pränatale Niereninsuffizienz führt zu einem Oligohydramnion, verbunden mit Lungenhyperplasie und einer insuffizienten Atmung nach der Geburt [1, 8]. Ein weiteres typisches Merkmal der ARPKD ist die Leberfibrose, die bei allen Patienten bereits bei der Geburt vorliegt. Die Leberfunktion ist bei Kindern mit ARPKD ein entscheidender Faktor für die Langzeitprognose. Häufig benötigen Patienten sowohl eine Nieren-, als auch Lebertransplantation [1].

Im Gegensatz zur ADPKD und ARPKD zeigen sich bei der NPH keine stark vergrößerten Nieren, sondern leicht vergrößerte, normal große oder sogar verkleinerte Nieren. Die NPH zählt ebenso wie die ARPKD zu den zystischen Nierenerkrankungen des Kindesalters und ist der häufigste genetische Grund für eine terminale Niereninsuffizienz bei Kindern und Jugendlichen [5, 7]. Die Klinik und Genetik der NPH ist deutlich komplexer als bei der ADPKD/ARPKD und wird im folgenden Abschnitt eingehend dargestellt.

2.1.1. Die Nephronophthise (NPH)

Die NPH ist eine autosomal-rezessiv vererbte zystische Nierenerkrankung, die erstmals 1945 durch Smith & Graham und 1951 von Fanconi beschrieben wurde [9] [10]. Mit einer Inzidenz von 1:68.100 in Europa [11] zählt sie zu den seltenen genetischen Erkrankungen und stellt dennoch die weltweit häufigste genetische Ursache für ein terminales Nierenversagen im Kindes- und jungen Erwachsenenalter dar. 10-25% der Kinder mit terminaler Niereninsuffizienz sind in Europa von der NPH betroffen [12]. Allgemeine Charakteristika, auch bekannt als histopathologische Trias der NPH, sind kortikomedulläre Zysten, eine tubulointerstitielle Nephritis und Fibrose, sowie eine Verdickung und Aufsplitterung der tubulären Basalmembran [13]. Bisher konnten 20 *NPHP* Gene identifiziert werden, deren Mutation für die Entstehung der NPH ursächlich sind. Diese erklären aber nur etwa 30% aller NPH Fälle.

In zeitlicher Abhängigkeit vom Einsetzen des terminalen Nierenversagens, lässt sich die NPH in die infantile, juvenile und adoleszente Form unterteilen [14]. Das Nierenversagen tritt durchschnittlich jeweils im ersten, 13. und 19. Lebensjahr ein [15]. Die seltene infantile NPH mit Mutationen im *NPHP2* Gen ist die am stärksten und schnellsten fortschreitende Variante und unterscheidet sich morphologisch deutlich von der juvenilen und adoleszenten Form durch beidseits vergrößerte Nieren mit kortikalen Zysten, sowie eine Fibrosierung der Leber [16]. Histopathologisch finden sich interstitielle Fibrose und atrophische Tubuli, wohingegen

Veränderungen der Basalmembran meistens fehlen [11]. Die häufigste Form ist die juvenile NPH mit dem am typischerweise betroffenen Gen *NPHP1* [15]. Im Ultraschall können zunächst normal große und echoreichere Nieren beobachtet werden, deren Mark-Rinden-Grenze schlecht differenzierbar ist. In späteren Krankheitsstadien entwickeln sich kleine medulläre Zysten [14]. Lichtmikroskopisch imponieren die interstitielle Nephritis, atrophische und dilatierte Tubuli, sowie eine verdickte oder ausgedünnte Basalmembran [11]. Die adoleszente NPH mit Mutationen im *NPHP3* Gen ähnelt morphologisch und histologisch der juvenilen Form [14].

Die ersten Symptome treten bei den Patienten mit juveniler NPH in der Regel zwischen dem vierten und dem sechsten Lebensjahr auf. Initial lässt die Fähigkeit der Niere den Urin zu konzentrieren allmählich nach, was bei den Betroffenen zu vermehrter Urinausscheidung (Polyurie) und folglich zu vermehrtem Durstgefühl mit erhöhter Flüssigkeitsaufnahme (Polydipsie) führt. Oft führt das zu einer sekundären Enuresis. Des Weiteren lässt sich ein verstärkter Natriumverlust über die Nieren beobachten, was zu Hyponatriämie mit Hypovolämie führen kann, vor allem bei vermindertem Natriumaufnahme durch die Nahrung. Bluthochdruck, Anämie und Wachstumsverzögerungen sind späte Zeichen der NPH und stehen zeitlich eng mit der terminalen Niereninsuffizienz in Verbindung.

Bei 10-15% der Patienten mit NPH zeigen sich zusätzliche extrarenale Manifestationen im Rahmen von mit der NPH genetisch und phänotypisch überlappenden Syndromen. Am häufigsten sind dabei die Augen von einer *Retinitis pigmentosa* im Rahmen eines Senior-Løken-Syndroms betroffen. Neben der renalen Symptomatik leiden die Patienten hierbei unter einer Verschlechterung des Gesichtsfeldes und Nachtblindheit [15]. Als ursächlich zeigten sich hier Mutationen in den Genen *NPHP5* und *NPHP6* [17]. Neurologische Auffälligkeiten zeigen sich zum Beispiel durch Hypoplasie des *Vermis cerebelli* mit mentaler Retardierung und Ataxie beim Joubert-Syndrom. Bisher konnten Mutationen in 27 Genen als ursächlich identifiziert werden, daneben Mutationen in *NPHP1* und *AHI*, welches für Joubertin codiert und mit den Proteinen *NPHP1*, *NPHP3* und *NPHP4* interagiert [18]. Darüber hinaus können noch weitere Organe wie das Herz durch einen Ventrikelseptumdefekt oder einen Situs inversus betroffen sein, was sich in Kombination mit Lungen- und Nierenhypoplasie, Meningoencephalozele und zystischen Nieren im Rahmen des sogenannten Meckel-Gruber-Syndroms zeigt. Die multiplen Organmanifestationen, welche häufig pränatal zum Tod führen, beruhen darauf, dass multiple Allele verschiedenster Gene, wie u.a. *NPHP3*, *NPHP6* und *NPHP8* ursächlich sein können [19-21]. In der Zusammenschau führen also pathogenetische Varianten in einer Vielzahl von Genen zu zystischen Nierenerkrankungen. Interessanterweise zeigen diese Gene eine Gemeinsamkeit: Sie kodieren für Proteine mit einer gemeinsam Lokalisation, dem primären Zilium.

2.1.2. Zilien und Ziliopathien

Zilien sind föhlerartige Organellen, die auf der Oberflöhche vieler Säugetierzellen zu finden sind und aus Mikrotubuli aufgebaut sind. Durch strukturelle Variationen des Mikrotubulus-Skeletts und die damit verbundene Motilität lassen sich zwei Arten von Zilien unterscheiden, die motilen Zilien und die sogenannten primären Zilien, welche für die Entstehung der NPH eine entscheidende Rolle spielen. [5].

Primäre Zilien spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Zellpolarität, in der Regulation des Zellzyklus und als Sensoren für die Transduktion von thermosensorischen, olfaktorischen, osmosensorischer oder mechanischen Reizen [5, 22]. Die Zellpolarität spielt eine wichtige Rolle für die Struktur und Funktion von epithelialen Geweben. Epitheliale Gewebe bilden an der Zelloberfläche eine dichte Barriere, um das Gewebe von der extrazellulären Umgebung abzugrenzen.

Zilien entstehen während der G₀- oder G₁-Phase des Zellzyklus. Die sogenannte Ziliogenese ist auf diese Phasen des Zellzyklus beschränkt, da das primäre Zilium am Basalkörper verankert ist, der sich aus der Mutterzentriole des Zentrosoms bildet. Von der apikalen Seite des Basalkörpers geht der Hauptteil des Ziliums, das Axonem aus. Das Axonem ist von einer speziellen Plasmamembran umgeben, die mit dem Basalkörper über Transitionsfasern verbunden ist [1, 5, 23]. Die Transitionsfasern sind Bestandteil der gleichnamigen Transitionszone, die sich zwischen Axonem und Basalkörper befindet und das Zilium vom Rest der Zelle trennt [24]. An der Transitionszone wird selektiv und hoch spezifisch der Transport von Proteinen aus dem Zilium hinaus und in das Zilium hinein reguliert einschließlich des Transports von Membranproteinen [25]. Daraus resultiert unter anderem eine sehr spezifische Zusammensetzung der ziliären Zellmembran, die für die ziliäre Signalübertragung essentiell ist [5]. Neben Proteinen werden Lipide als weitere Membranbestandteile über Vesikel zu den Transitionsfasern transportiert und dort prozessiert. Die Transitionszone wird daher als eine Art Schranke zum Zilium angesehen [24, 26]. Da im Zilium selbst keine Proteine synthetisiert werden können, werden durch IFT Proteine in das Zilium hinein und hinausbefördert. Der anterograde Transport von der Basis bis zur Spitze wird durch das Motorprotein Kinesin katalysiert, der retrograde Transport wird durch Dynein katalysiert [1, 23]. In der Niere finden sich primäre Zilien auf der apikalen Seite der Tubulus- und Sammelrohrepithelzellen der Nephrone [1, 3].

Ziliopathien entstehen durch Mutationen in Genen, die für ziliäre Proteine kodieren oder die die direkt die Funktion von Zilien beeinträchtigen [5]. Die bereits erwähnten Transmembranproteine PC1 und PC2 fungieren in der Zilienmembran als Sensor (PC1) und als Ca²⁺-Kanal (PC2) und interagieren über ihre jeweils intrazellulär gelegene C-terminale Domäne miteinander [6]. Fibrocystin-1 ist im Basalkörper lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Sammelrohre und des biliären Systems [1, 5].

Die 20 bisher identifizierten *NPHP* Gene, kodieren für die Nephrocystine, eine Gruppe heterogener Proteine. Für einige NPH Proteine, beispielsweise NPHP2, NPHP6 oder NPHP7, konnte neben der ziliären eine zusätzliche nukleäre Lokalisation gezeigt werden. Die NPH Proteine bilden große Proteinkomplexe an der Zilienbasis, die auch weitere Ziliopathie-Proteine umfassen [27]. Bei primären Ziliopathien kommt es durch genetische Heterogenität zu einer großen Bandbreite an klinischen Phänotypen und Überlappung verschiedener Ziliopathien, was die Diagnosestellung zu einer Herausforderung macht und häufig eine genetische Diagnostik erfordert [3]. Da die genaue Funktion primärer Zilien und ihre Rolle bei der Entstehung zystisch-degenerativer Nierenerkrankungen bisher noch unzureichend geklärt sind, fehlen ursächliche Therapien, sodass Patienten nur symptomatisch behandelt werden können [12].

2.1.3. NPHP1

Bei ca. 25% aller Patienten mit NPH lässt sich eine ursächliche Mutation im *NPHP1* Gen nachweisen. Das Gen liegt auf dem Chromosom 2 im Abschnitt 2q12-q13 [28]. *NPHP1* kodiert für das Protein NPHP1, welches aus 732 Aminosäuren aufgebaut ist und verschiedene Bereiche für Proteininteraktionen aufweist. Neben drei N-terminal lokalisierten coiled-coiled Domänen finden sich unter anderem eine SH3-Domäne, sowie eine putative Nephrocystin-homologie Domäne (NHD), welche die C-terminalen 2/3 des Proteins umfasst [29, 30].

Es konnte gezeigt werden, dass NPHP1 mit zahlreichen weiteren NPHP Proteinen interagiert unter anderem mit den Proteinen NPHP2, NPHP3 und NPHP4 [31-33]. Untersuchungen von Sang et al. konnten zudem zeigen, dass NPHP1 zusammen mit NPHP4 und NPHP8 einen Proteinkomplex bildet. In dem Komplex geht NPHP4 eine direkte Bindung mit NPHP1 und NPHP8 ein und dient als Brücke zwischen diesen [27, 34]. Vor allem im Bereich von Zell-Zell-Kontakten konnte eine Anreicherung dieser NPH Proteine beobachtet werden. Der NPHP1-4-8 Komplex wurde in einem Bereich nachgewiesen, der sich zwischen dem Basalkörper und der Basis des Axonems erstreckt. Dies erlaubt die Hypothese, dass NPHP1 als ein Ankerprotein für NPH Proteinkomplexe fungiert und dass diese NPH Komplexe lokalisiert an der Zilienbasis den ziliären Import und Export von Proteinen regulieren [27, 34]. Im Rahmen der Studie wurden weitere Protein-Komplexe mit Beteiligung von NPHP Proteinen beschrieben und mittels Affinitätsaufreinigung ca. 850 potentielle Interaktoren ermittelt. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass NPHP Proteine eine wichtige Rolle für die Verbindung des primären Ziliums zu seiner Zelle spielen [27, 34]. Die genaue Rolle von NPHP1 bleibt jedoch vorerst unklar. Neue Modelle basierend auf Genome Editing könnten helfen, die Funktion von NPHP1 und weiteren NPH Proteinen weiter zu entschlüsseln.

2.2 Genome Editing mittels CRISPR-Cas9

Das ursprünglich aus dem adaptiven Immunsystem von Bakterien stammende CRISPR/Cas9 System (Engl.: clustered regularly interspaced short palindromic repeats), wurde in den letzten Jahren als effektives molekularbiologisches Werkzeug etabliert, um genomische DNA gezielt zu schneiden und zu verändern [35, 36]. Das Enzym Cas9 ist eine Endonuclease, die durch eine kurze RNA zur entsprechenden Zielsequenz geleitet und aktiviert wird und so Doppelstrangbrüche in der DNA induzieren kann.

Die crRNA enthält an ihrem 5' Ende eine sog. Spacer-Sequenz, die aus 20 bp besteht und komplementär zu einem Abschnitt der zu schneidenden Ziel-DNA ist. Auf dem 3' Ende der crRNA liegt ein Abschnitt mit der CRISPR-repeat Sequenz, die als Erkennungs- und Bindestelle für Cas9 dient. Die tracrRNA bindet ebenfalls an die repeat-Sequenz der crRNA und erfüllt zwei entscheidende Aufgaben. Sie triggert die Prozessierung der crRNA durch die RNA-spezifische Ribonuclease RNase III, sodass sich ein stabiler haarnadelförmiger RNA-Komplex ausbilden kann und aktiviert darüber hinaus die Funktionen von Cas9. Es hat sich zudem gezeigt, dass Cas9 auch durch eine einzelne sgRNA programmiert und aktiviert werden kann, in der die crRNA und die tracrRNA von vornherein fusioniert sind [36, 37]. Durch den Austausch der Spacer-Sequenz ist es möglich, Cas9 an jede beliebigen Stelle im Genom zu lenken und dort Doppelstrangbrüche zu induzieren.

Neben den beiden RNAs hat die sogenannte PAM ebenfalls eine entscheidende Rolle. Hierbei handelt es sich um eine 3 bp (im Fall von *Streptococcus pyogenes* „NGG“) umfassende Erkennungssequenz, die direkt auf das 3' – Ende des komplementären Abschnitts auf der Ziel-DNA folgen muss. Sie ist spezifisch für das aus *Streptococcus pyogenes* stammende Enzym Cas9 und ist entscheidend für dessen Aktivität. Cas9 schneidet 3 bp strangaufwärts der PAM [35, 36].

Die induzierten Doppelstrangbrüche werden, etwas vereinfacht, entweder durch NHEJ (Engl.: non-homologous end joining) oder HDR (Engl.: homology-directed repair) korrigiert. NHEJ kann zu Insertion oder Deletion von Basen führen, die durch ein entstehendes Stopcodon oder meist durch die Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) zum Verlust der Genaktivität führen können. Auf diese Weise ist es möglich, „Knockout-Zelllinien“ bzw. weitere Modellorganismen, wie Mäuse mit einem Knockout zu generieren [35, 38]. HDR benötigt ein entsprechendes repair-template, welches es ermöglicht ausgewählte Sequenzen in die Ziel-DNA zu integrieren. So können zum Beispiel gezielt Patientenmutationen eingefügt werden, die helfen können ein besseres Verständnis für die Pathologien zu entwickeln. Das repair-template kann sowohl in ein Plasmid integriert werden oder in Form eines ssODN oder auch einer sehr langen ssDNA eingesetzt werden [37, 39, 40].

2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit

Auch wenn mit Ausnahme der ADPKD jede Ziliopathie für sich alleine zu den seltenen Erkrankungen zählt, kommt man in der Summe aller Ziliopathien doch auf eine relativ hohe Anzahl, bei bisher fehlender kausaler Therapie [1]. Um den Patienten neben der Nierenersatztherapie zukünftig neue, ursächlichere Therapiemöglichkeiten bieten zu können, ist es wichtig, neue ziliäre Proteine zu charakterisieren und Signalwege bereits bekannter Gene zu entschlüsseln, um die Krankheitsmechanismen aufzuklären.

Diese Dissertation basiert auf der Hypothese, dass NPHP1 als Ankerprotein für den NPH Proteinkomplex fungiert, der eine zentrale Rolle bei der Entstehung der NPH spielt [27, 34]. In welcher Funktion NPHP1 seine Schlüsselrolle in der molekularen Pathogenese der NPH und der Biologie primärer Zilien einnimmt, ist bislang unklar. Um die Funktion und Integration von NPHP1 in ziliären Signalwegen besser untersuchen zu können, wird im Rahmen dieser Arbeit modernes Genome Editing mittels CRISPR/Cas9 eingesetzt. Spezifische Ziele der Arbeit sind (1) die Generierung von *NPHP1*-Knockout Zelllinien und (2) die Analyse, in wie weit der Verlust von NPHP1 die Protein Expression verändert. Mit Hilfe einer bereits generierten *Nphp1*^{-/-} Mauslinie soll zusätzlich (3) das *Nphp1* Interaktom in vivo analysiert werden. Hierzu erfolgt die Immunpräzipitation von *Nphp1* aus Nieren und die Analyse mittels nLC-MS/MS.

Mit meiner Arbeit möchte ich einen Beitrag zur Entschlüsselung der Funktion von NPHP1 leisten. Ein besseres Verständnis für die Rolle von NPHP1 in der Pathogenese der NPH hat auch für weitere nephrologische Krankheitsbilder, die mit renaler Fibrose einhergehen, wie zum Beispiel die häufigere ADPKD, eine hohe Relevanz und eröffnet neue Wege für die Entwicklung ursächlicher Therapien.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1. Enzyme

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
FastDigest BbsI	Thermo Fisher Scientific	FD1014
Proteinase K	New England Biolabs	P8107S
Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	M0491L
EcoRI	New England Biolabs	R 3101S
ExoI	New England Biolabs	Thermo EN0581
MluI	New England Biolabs	R0198L
NotI	New England Biolabs	R0189L
SAP	New England Biolabs	M0371S
T4 DNA Ligase	New England Biolabs	M0202L
T4 PNK	Thermo Fisher Scientific	EK0031

3.1.2. DNA-Konstrukte

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
pSpCas9(BB)-2A-GFP(PX458)	Addgene	48138
pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459) V2.0	Addgene	62988
hNphp1 sgRNA1 pSpCas9(BB)-2A-GFP	Nephrolab	-
hNphp1 sgRNA6 pSpCas9(BB)-2A-GFP	Nephrolab	-

3.1.3. Antikörper

Bezeichnung	Host	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Nphp1 (polyklonal)	Kaninchen	1:500 (Western)	Sigma Aldrich	N6523
Anti-Nphp1 #19	Maus	1:500 (Western)	Zentgraf/ Nephrolab	
Anti-Nphp1 #30	Maus	1:500 (Western)	Zentgraf/ Nephrolab	
Anti-Nphp1 #62	Maus	1:500 (Western)	Zentgraf/ Nephrolab	
anti-mouse IgG (H+L) HRP	Ziege	1:30.000 (Western)	Jackson Immuno Research	115-035-003
anti-rabbit IgG (H+L) HRP	Ziege	1:30.000 (Western)	Jackson Immuno Research	111-035-003
donkey anti rabbit Cy3	Esel	1:500 (IF)	Jackson Immuno Research	711-165-152
donkey anti mouse A488	Esel	1:500 (IF)	Jackson Immuno Research	715-545-150
ARL13B (polyclonal)	Kaninchen	1:500 (IF)	Proteintech	17711-1-AP
Pan-Actin	Kaninchen	1:500 (Western)	Cell signaling	#8456

3.1.4. DNA-Oligonukleotide für sgRNAs/Primer

Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
hNphp1_exon1_sgRNA_top	CACCGCTCCTGATTGCGGCGCCGCA	IDT
hNphp1_exon1_sgRNA_bottom	AAACTGCGGCGCCGCAATCAGGAGC	IDT
hNphp1_exon6_sgRNA_top	CACCGTTAGCTATCCACCAACCATC	IDT
hNphp1_exon6_sgRNA_bottom	AAACGATGGTTGGTGGATAGCTAAC	IDT
mNphp1_exon1_top	CACCGAGCGCCTGCAGCGGGTCCCG	IDT
mNphp1_exon1_bottom	AAACCGGGACCCGCTGCAGGCGCTC	IDT

mNphp1_Ex1_CRISPR3_T7_g RNA_fw	TTAATACGACTCACTATAGG CTGCAGGCGCTGAGGCGCCGGTTTA GAGCTAGAAATAGC	IDT
mNphp1_Ex1_CRISPR4_T7_g RNA_fw	TTAATACGACTCACTATAGG AGCGCCTGCAGCGGGTCCCGGTTTT AGAGCTAGAAATAGC	IDT
CRISPR_T7_gRNA_rev	AAAAGCACCGACTCGGTGCC	IDT
mNphp1_Ex1_var1_FP	GGATGTGGGACCCTCTACC	IDT
mNphp1_Ex1_var1_RP	GTTTAGTGCAACCTGTGGCA	IDT
m.Nphp1 3'HA FWD	GCATGGACGAGCTGTACAAGTAATGG CGACCATGCTCCGA	IDT
m.Nphp1 3'HA REV	GACCATGATTACGCCAAGCTAATAAC CTACAAATATCATTAGCAACATTC	IDT
m.Nphp1 5'HA FWD	GAGCTCGGTACCCGGGGATCGACCC TTGCTCTCACAGAGA	IDT
m.Nphp1 5'HA REV	TTGCTCACTCCCCCTCCGCCGCCTGA GTTCTTTCTTATTTCA	IDT
Nphp1_exon20_sgRNA_top_fp	CACCGTAAGAAAGAACTCAGGCTAA	IDT
Nphp1_exon20_sgRNA_bottom _rp	CAAAGTTAGCCTGAGTTCTTTCTTA	IDT
mNPHP1_CRISPR_T7_gRNA_ 1_fw	TTAATACGACTCACTATAGGTAAGAAA GAACTCAGGCTAAGTTTTAGAGCTAG AAATAGC	IDT
Nphp1_exon20_fp	GGAAGAGACAGAGGCTGCAAGA	IDT
Nphp1_exon20_rp	GAGGCAAGTCTTCCTGGAAGCT	IDT
Nphp1_sgRNA4- cellculture_bottom	AAACCGGGACCCGCTGCAGGCGCTC	IDT
Nphp1_sgRNA4_cellculture_top	CACCGAGCGCCTGCAGCGGGTCCCG	IDT
Nphp1_sgRNA6_cellculture_bot tom	AAACGTTAGTTGGCTTTCAGTCACC	IDT
Nphp1_sgRNA6_cellculture_top	CACCGGTGACTGAAAGCCAACTAAC	IDT
Nphp1_exon6_fp	TTGTGGGGAAAAAGACCTGGATA	IDT
Nphp1_exon6_rp	GGCGGACCGCATACTTACC	IDT
hNphp1_exon1_rp3	AGTTGGGATCAGGAGGGGTT	IDT
hNphp1_exon1_fp2	CCGAGGAAAAGTGAATCCCC	IDT
M13(-20)F	GTAAAACGACGGCCAG	IDT

M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	IDT
------	-------------------	-----

3.1.5. Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Ursprung	Herkunft
HEK 293T	Human	Embryonale Niere	Prof. Dr. B. Seed, Harvard Medical School, Boston
HKC8	Human	Niere	Uniklinik Erlangen, Gunner Schley

3.1.6. Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23227
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific	4337455
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific	K0691
GeneJET Plasmid MiniPrep Kit	Thermo Fisher Scientific	K0502
HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit	New England Biolabs	E2040S
NucleoBond® Xtra MidiPrep Kit	Macherey-Nagel	740410.10
PCR Mycoplasma Test Kit I/C	Promokine	PK-CA91-1096
REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich	R2523
RNA purification miRNesay Kit	Qiagen	74106

3.1.7. Reagenzien und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
2-Chloroacetamid	Sigma-Aldrich	C0268
50bp DNA Ladder	New England Biolabs	N3236S

Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich	A 6141
Acetonitril für LC-MS	Applichem	701881.1611
Acrylamid Rotiphorese Gel 40 (37, 5:1)	Carl Roth	T802.1
Adenosintriphosphat	Thermo Fisher Scientific	R0441
Ameisensäure	Fluka	94318
Ampicillin-Natrium	Carl Roth	K029.2
Ammoniumpersulfat (APS)	PanReac AppliChem	A0834
Ammoniumsulfat	Roth	3746.3
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich	A9418
Bromphenolblau	Carl Roth	A512
Calcium-Chlorid Dihydrat >99% Zellkultur	Sigma-Aldrich	C7902
Coomassie brilliant blue G-250	AppliChem	A3480,0025
Cumarinsäure	Sigma-Aldrich	C-9008
D (+) Glucose	Sigma-Aldrich	G7021
DNA Gel Loading Dye	Thermo Fisher Scientific	R0611
dNTPs (10 mM)	Thermo Fisher Scientific	R0191
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	A3672,0100
Dithiothreitol (DTT)	Thermo Fisher Scientific	R0862
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	31966-021
Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12	Sigma-Aldrich	D6421
EGTA >97%	Sigma-Aldrich	E4378
Essigsäure	Sigma-Aldrich	49199
Ethanol absolut	Carl Roth	9065,3
Ethanol 99,8%	AppliChem	A5007
Ethidiumbromid Lösung (1%)	Carl Roth	2218
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich	60-00-4
Fetal Bovines Serum (FBS)	Gibco	10270-106
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific	SM0311
Glutamax	Gibco	35050-038
Glycerol	Carl Roth	3783
Glycin	Carl Roth	3908

Hefeextrakt	BD	212750
HEPES	Carl Roth	HN77.3
Histomount	National Diagnostics	HS-103
Incidin PLUS	Igefa	SAP 225194
Isopropanol	Carl Roth	5752
KCl	Sigma-Aldrich	P5405
KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich	P5655
LB Agar (Lennox)	Roth	X965.1
LB Medium (Lennox)	Roth	X964.1
Lipofectamine 2000	Invitrogen	11668
Luminol	Fluka	9253
Lysyl Endopeptidase	Wako	125-05061
Methanol	Carl Roth	4627,4
Mayer's Hämatoxylin	AppliChem	A0884
MgCl ₂	Merck	1.05833.0250
NaCl	Sigma-Aldrich	S5886
Natriumdeoxycholate	PanReac AppliChem	A1531
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	S9390
NaOH (2N)	Carl Roth	T135
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich	S6508-50G
NEBuffer™ 3.1	New England Biolabs	B7203S
Normal Donkey Serum (NDS)	Dianova/Jackson ImmunoResearch	017-000-001
Optimem-I	Gibco	31985
PageRuler Plus prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	26620
Paraplast Plus (Paraffin)	Surgipath	39602004
Penicillin-Streptomycin	Sigma	P4333
Perjodsäure	Carl Roth	3257
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	PanReac AppliChem	A0999
Pierce™ Bindungspuffer für IgG-Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific	21019
Pierce™ Elutionspuffer für IgG- Aufreinigung	Thermo Fisher Scientific	21004

ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific	P36931
50x Protease Inhibitor	Roche	
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich	GE17-0618-01
Q5 Reaction Buffer 5X	New England Biolabs	B9027S
Schiff's-Reagenz	VWR	1.090.330.500
SDS (Transfer-Puffer)	PanReac AppliChem	A2263, 0500
SDS Pellets (Laufpuffer)	Carl Roth	CN 30.3
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34095
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific	EL0011
T4 DNA Ligase Buffer 10x	Thermo Fisher Scientific	B69
T7 DNA Ligase	New England Biolabs	M0318S
Tango-Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific	BY5
Tetramethylethylendiamin >98,5% p.a. (TMED)	Carl Roth	2367
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich	302031
Triethylammoniumbicar-bonat (TEAB), 50 mM	-	-
Tris (Trizma Base)	Sigma-Aldrich	T1503
Tris Hydrochlorid (HCL)	Carl Roth	9090.3
Triton X-100	Applichem	A4975,1000
Trypsin Protease 1 µg/µl	-	-
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco	25300
Trypton	MP Biomedicals	1010817
Tween 20	US Biological	P4379
Urea 8 M	-	-
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth	8070.2
Xylol	Geyer	0371.5000

3.1.8. Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Artikelnummer/Bezeichnung
1.5 ml Safe Lock Tubes	Eppendorf	0030 123.328
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt	72.706.200
15 ml Falcon	Greiner	188271
50 ml Falcon	Greiner	227261

Biosphere Filter Tip 10 µl farblos, steril	Sarstedt	70.1116.210
Biosphere Filter Tip 200 µl farblos, steril	Sarstedt	70.760.211
Biosphere Filter Tip 1000 µl blau, steril	Sarstedt	70.762.211
Blotting Papier	Sartorius Stedium Biotech	FT-2-521-580600 G
Gefriermodul CoolCell für 12 Kryoröhrchen	VWR	479-0921
Deckgläser 18 mm, Stärke 1,5	Thermo Fisher Scientific	7628045
Handschuhe S	Verschiedene Hersteller	-
Histosetten	Simport	M499-11
Leere Gelkassetten, mini, 1,0mm	Thermo Fisher Scientific	NC2010
Kämme für leere Gelkassetten mini, 1.0 mm, 10, 12, 15 well	Thermo Fisher Scientific	NC3010 NC3012 NC3015
Multiply µStrip 0,2ml 8er Kette ohne Deckel	Sarstedt	72985002
Multiply Deckelkette für 8er Kette	Sarstedt	65989002
Objektträger adhäsiv 90° 75x25x1mm	Geyer	7695021
Plastikschalen	VWR	-
PVDF-Membranen (Immobilon-P Transfer Membranen)	Carl Roth	T831.1
StageTips für MS 200 µl	-	-
Stripetten (5 ml)	LMS	4051
Stripetten (10 ml)	LMS	4101
Stripetten (20 ml)	LMS	4251
Stripetten (50 ml)	LMS	4501
TipOne 0,1-10µl (steril)	Starlab	S1110-3810
TipOne 1-200µl (steril)	Starlab	S1111-1816

TipOne 101-1000µl (steril)	Starlab	S1111-6811
Ultrazentrifugen-Röhrchen	Beckman Coulter	357448
Zellkulturschalen 100x20 mm	LMS	430167
Zellkulturschalen (6-well)	LMS	3516
Zellkulturschalen (12-well)	LMS	3513
Zellkulturschalen (24-well)	Corning / LMS	3527
Zellkulturschalen (96-well)	Greiner BioOne	655180
Zellschaber	Corning	3008

3.1.9. Geräte/Werkzeuge

Gerät/Werkzeug	Hersteller	Bezeichnung/Nummer
Apotome	Zeiss	-
Autoklav	Systec	VX-150
Avanti Zentrifuge	Beckman Coulter	J-26S XPI
Bioruptor	Diagenode	-
Einbettssystem	Leica Biosystems	EG 1150 C
Elektrophorese-Geräte (Agarosegelelektrophorese)	amersham pharmacia biotech	Consort E425
Elektrophoresegerät (SDS-PAGE)	Consort	E831
Elektrophoresekammern (Agarosegelelektrophorese)	Owl Scientific inc.	-
Elektrophoresekammer (SDS PAGE)	Invitrogen	XCell Sure Lock™ Novex® Mini-Cell
Enspire Multimode Plate Reader	Perkin Elmer	2300-0000
Eppendorf Research® plus, 8-channel, variable, 10 – 100 µL, yellow	Eppendorf	3122000035
Heizblock digital	VWR	-
Heizschüttler Thermomixer comfort	Eppendorf	-
Inkubator, Zellkultur	BINDER	Serie CB
Inkubator function line	Heraeus	50042307
Inkubator, schüttelnd	Infors HT	Multitron Pro, S-000120234-003
Inkubationsschüttler	IKA	-
Inverses Labormikroskop	Leica Biosystems	DM IL LED
Mikrotom	Leica Biosystems	149MULTI0C1

Multifuge (Zentrifuge)	Heraeus	4KR
NanoDrop Spectrophotometer	PeqLab	1000
Odyssey CLx	LI-COR	-
Pipetten	Gilson	-
Slidescanner	Leica Biosystems	Aperio GT 450 DX
Smart Fluorescent Cell Analyser	Ruskinn	JuLI™
SpeedVac	Thermofischer Scientific	DNA120OP230
Sterile Werkbank	SCANLAF	Mars Safety Class 2
Tenbroeck Tissue Grinder 2 ml	Wheaton Science Products	357422
Thermal Cycler	BIO-RAD	S1000
Transferkammern (The Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell)	BIO-RAD	170-3940
UV-Kamera (Agarosegelelektrophorese)	INTAS UV-Systeme	-
UV-Kamera (Westernblot)	PeqLab	Fusion
Vakuumpumpe	Vacuubrand	CVC 3000
Wasserbad für Paraffin-Schnitte	Leica Biosystems	HI1210)
Zentrifugen	Eppendorf	-

3.1.10. Software/Datenbanken

Name	Hersteller/Link
Aperio ImageScope	Leica Biosystems
AxioVision Rel.4.8	Carl Zeiss
Benchling	Benchling Inc. https://www.benchling.com
CiliaCarta	https://tbb.bio.uu.nl/john/syscilia/ciliacarta/
Ensembl Genome Browser	https://www.ensembl.org/index.html
Fiji (ImageJ)	General Public License
Image Studio	LI-COR
InDesign	Adobe
PubMed	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
Office 2016 for Mac	Microsoft

3.2 Methoden

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR ist eine Methode zur in vitro Amplifikation ausgewählter DNA- oder RNA-Fragmente [41, 42]. Für diese Arbeit wurden jeweils das Standard-Protokoll für die Verwendung der Q5® Polymerase und des REDTaq® ReadyMix™ verwendet.

Mittels Gelelektrophorese ist es möglich die DNA-Fragmente aus der PCR der Größe nach aufzutrennen und auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Produkte der REDTaq®-PCR können direkt auf ein Agarose-Gel geladen werden und die Produkte der Q5®-PCR nach Zusatz von 1 µl DNA Gel Loading Dye je 5 µl Probe. Die Proben werden je nach zu erwartender Größe der Fragmente auf ein 1 %-/ 2 %-Agarosegel geladen, daneben je 3 µl des 50 bp DNA Markers/1 kb DNA Markers. Die Fragmente werden bei 90-140 V für 35-70 min aufgetrennt. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid können die DNA Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden [43]. PCR-Produkte für Klonierungen wurden jeweils mit Hilfe eines Gelextraktions-Kits aufgereinigt.

Verwendete Puffer

1x TAE-Puffer

40 mM Tris; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; 0,05 % Ethidiumbromid

Agarosegel (1%/2%)

1 %/2 % Agarose in 1x TAE-Puffer

3.2.2. Enzymatischer Verdau und Klonierung

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen ist es möglich Vektoren an spezifischen Schnittstellen für die Klonierung zu linearisieren. Ebenso können DNA-Fragmente aus einem Vektor herausgeschnitten werden oder PCR-Produkte mit enzym-spezifischen Schnittstellen am 3' -und 5'- Ende geschnitten werden. Die DNA-Fragmente können mittels Ligation in einen entsprechend geschnittenen Vektor eingebracht werden. Der Reaktionsansatz wird nach dem Standard-Protokoll der Firma NEB auf Eis pipettiert. Dieser enthält den NEBuffer™ 3.1, das zu verdauende Produkt und ein oder zwei Restriktionsenzyme (s. 3.1). Es folgt eine Inkubation für 1-6 h bei 37 °C. Das Produkt wird nach dem Verdau mit 1 µl Loading Dye versetzt und vollständig neben einem 1 kb-DNA-Marker auf ein 1 % Agarosegel geladen. Die DNA-Bande wird unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgt ebenfalls mit einem Gelextraktions-Kit (s. 4.1). Mit der kommerziell erhältlichen T4-Ligation können DNA-Fragmente mit jeweils zum Vektor passenden Enden in diesen integriert werden [44]. Der Reaktionsansatz wird entsprechend dem Protokoll für die T4 DNA Ligase pipettiert und für

2 h bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wird ein Reaktionsansatz mit H₂O anstelle der Insert DNA pipettiert. Anschließend wird die Ligationsreaktion für 10 min bei 70 °C erhitzt. Die Ligation kann nun für die Transformation weiter verwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden. Für die Transformation werden 5 µl der Ligation zu 50 µl DH10 B T1 Phage-Resistant E. coli Bakterien gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 45 s bei 42 °C im Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium erneut für 1 h bei 37 °C und 900 rpm auf dem Schüttler inkubiert [45].

Verwendete Puffer

SOC-Medium

20 mM Glucose; 0,5 % Hefeextrakt; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 8,6 mM NaCl;
2 % Trypton

3.2.3. Amplifikation von Plasmiden

Es werden jeweils 50 µl der transformierten Bakterien auf einer Agarplatte ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert [45]. Am nächsten Tag können einzelne Kolonien gepickt werden. Die Kolonien werden in je 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank mit Schüttler inkubiert. Mittels eines kommerziellen Kits (GeneJET Plasmid MiniPrep Kit) wird die Plasmid DNA aus den Bakterien extrahiert und durch enzymatischen Verdau und Gelelektrophorese, sowie Sequenzierung analysiert. Um größere Mengen an DNA zu extrahieren wird ca. 1 ml der Bakterienansätze auf 200 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank mit Schüttler inkubiert. Die DNA Extraktion erfolgt ebenfalls mit einem Kit (NucleoBond® Xtra MidiPrep Kit).

Verwendete Puffer/Nährmedien

LB-Agarplatten (0,1 µg/ml Ampicillin)

32 g LB-Agar (Lennox); 1000 ml H₂O; 100 µg Ampicillin

LB-Medium (0,1 µg/ml Ampicillin)

20 g LB-Medium (Lennox); 1000 ml H₂O; 100 µg Ampicillin

3.2.4. Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger wird dazu benutzt die generierten Plasmide und DNA-Fragmente auf die Richtigkeit ihrer DNA-Sequenz zu überprüfen [46]. Die Sequenzierungen wurden alle durch das Cologne Center for Genomics (CCG) durchgeführt. PCR Produkte werden zunächst enzymatisch mit den Enzymen Exo1 (Exonuclease I) und SAP (Shrimps Phosphatase Alkali) nach dem Standardprotokoll des CCG von übrig gebliebenen Primern und

Nukleotidresten der Reaktion gereinigt. Plasmide können ohne vorherige Aufreinigung für die Sequenzierung aufbereitet werden. Die DNA wird für die Sequenzierung mit einem Sequenzierungs-Kit (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) nach dem Standardprotokoll des CCG aufbereitet.

3.2.5. CRISPR/Cas9

Die Zell-Experimente in dieser Arbeit wurden nach dem Protokoll von *Ran et al.* durchgeführt [38]. Bei dieser Strategie wird die Sequenz der sgRNA in einen Vektor hinter einen U6 RNA Polymerase III Promotor für die Expression integriert. Der Vektor exprimiert zusätzlich Cas9 [38]. Der Vektor pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) wurde uns von Feng Zhang zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid # 48138 ; <http://n2t.net/addgene:48138> ; RRID:Addgene_48138) Durch die Co-Expression von GFP wird im weiteren Verlauf die Selektion an Hand von GFP ermöglicht.

3.2.6. Design der sgRNAs

Für das Design der sgRNAs wurden Online-Tools von Sanger und Benchling benutzt (s. 3. 10) Das Tool von Benchling identifiziert innerhalb der gewünschten DNA-Sequenz mögliche Zielbereiche für sgRNAs und deren Sequenz. Es wurden sgRNAs mit möglichst wenig off-target Effects gewählt. Da der oben erwähnte U6 Promoter ein Guanin als erste Base des Transkriptes bevorzugt, muss ein entsprechender Überhang an die 20 Nukleotide angefügt werden [38].

Beispiel:



Abbildung 1: Designbeispiel für sgRNA

3.2.7. Klonierung der sgRNAs in den pSpCas9(BB)-2A-GFP Vector

Für die Klonierung muss zunächst das sgRNA Insert hergestellt werden. Dies wird im Protokoll von Ran et al. in den Methoden unter 5(B) (i-v) genau beschrieben [38]. Die komplementären top - und bottom-Sequenzen werden in einer Annealing-Reaktion aneinander gefügt und phosphoryliert. Das fertige sgRNA Insert wird in den pSpCas9(BB)-2A-GFP Vector kloniert. Im Anschluss wird, abweichend vom Protokoll, wie unter 4.3 beschrieben fortgefahren.

3.2.8. Zellkultur

Die Experimente dieser Arbeit wurden mit verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt:

- HEK 293T Zellen (humane embryonale Nierenzellen)
- HKC8 Zellen (humane Nierenzellen)

Die Zellen werden in spezifischem Medium in Zellkulturschalen (10 cm) und auf 6-well-, 12-well- und 96-well-Platten in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten in der Zellkultur werden, sofern möglich unter sterilen Bedingungen durchgeführt oder mittels Penicillin/Streptomycin das Kontaminationsrisiko gemindert. Diese werden durch eine sterile Abzugshaube, sowie die Reinigung der Arbeitsfläche und aller benötigten Geräte mit Ethanol (70 %) gewährleistet. Die verwendeten Lösungen werden zudem steril filtriert oder autoklaviert.

3.2.9. Auftauen von Zellen

Die Zellen werden in flüssigem Stickstoff verwahrt. Jedes Vial wird zügig bei 37 °C aufgetaut und in einen 15 ml Falcon mit 9 ml vorgewärmtem Medium (37 °C) überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 1000 rpm bei Raumtemperatur (RT) wird der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und in die 10 cm Zellkulturschale gegeben. Nach 24 h kann ggf. das Medium erstmalig gewechselt werden. Innerhalb der ersten 7 Tage nach Auftauen wird eine Mycoplasmen-PCR mittels eines kommerziellen Kits (PCR Mycoplasma Test Kit I/C) durchgeführt.

3.2.10. Splitten von Zellen

Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 90 % werden diese für den Erhalt oder die Durchführung von Experimenten auf neue Zellkulturschalen bzw. Platten verteilt. Nach Abnahme des Mediums mittels einer Vakuumpumpe werden die Zellen mit 1x PBS (RT) gewaschen. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA werden die Zellen für 5-10 min bei 37 °C inkubiert, um deren Adhärenz aufzuheben. Durch Zugabe von vorgewärmtem Medium werden die Zellen resuspendiert und im gewünschten Verhältnis auf mit Medium vorbereitete Zellkulturschalen oder Platten verteilt.

3.2.11. Einfrieren von Zellen

Die Zellen können bei ca. 90 % Konfluenz zur Verwahrung eingefroren werden. Hierzu werden die Zellen wie beim Splitting gewaschen, trypsinisiert und mit der ursprünglichen Menge Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen werden in einen 15 ml Falcon überführt und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Zellpellet in 1 ml Freezing-Medium gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden zunächst über Nacht bei -80 °C in einem speziellen Gefrierbehälter, der das kontrollierte Herunterkühlen gewährleistet, eingefroren. Danach können die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

Verwendete Medien/Puffer

Medium für HKC8

Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12; 10 % FBS; 1 % GlutaMax; (1 % Penicillin-Streptomycin bei gesorteten Zellen)

Medium für HEK 293T

Dulbecco's Modified Eagle Medium; 10 % FBS

1x PBS Puffer

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

Freezing Medium

45% zellspezifisches Medium; 45 % FBS; 10 % DMSO

3.2.12. Transfektion mit Calciumphosphat

Die Transfektion mit Calciumphosphat wurde in dieser Arbeit für Überexpressionsexperimente in HEK 293T Zellen eingesetzt. Bei der Transfektion mit Calciumphosphat bindet die zu übertragende DNA an Calciumphosphatkristalle, was zur Aufnahme der DNA in die Zelle führt. Der Komplex aus Calciumphosphatkristall und DNA wird von der Zelle phagozytiert [47]. Die Zellen werden bei einer Konfluenz von ca. 50 % in 10 cm Schalen transfiziert. Es werden 10-25 µg DNA steril in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 500 µl 0,25 M Calciumchlorid Lösung gegeben. Unter ständigem vortexen werden tropfenweise 500 µl 2x HEBS-Puffer hinzugefügt und weitere 10 s durch vortexen gemischt. Nach mehrmaligem auf und ab pipettieren werden 960 µl des Gemischs tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6-8 h wird das Medium gewechselt, um die Transfektionsreaktion zu stoppen. Die Zellen werden über Nacht inkubiert und können dann für die jeweiligen Experimente verwendet werden.

Verwendete Puffer

2x HEBS-Puffer

280 mM NaCl; 10 mM KCl; 12 mM Dextrose; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na₂PO₄ 2 H₂O

3.2.13. Transfektion mit Lipofectamin 2000

Bei der Transfektion mit Lipofectamin erfolgt die Aufnahme der DNA/RNA durch Bildung von liposomalen Komplexen, die über Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Lipofectamin 2000 wurde in dieser Arbeit für die Transfektion der Zellen eingesetzt, die mit CRISPR/Cas9 genetisch modifiziert werden sollten und erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Thermo Scientific™. Es wurden jeweils 1 µg DNA in Form des Plasmids (4.5) transfiziert. Zur Vorbereitung der Transfektion werden jeweils HKC8 Zellen in 6-wells gesplittet, sodass sie am Tag der Transfektion zu ca. 50 % konfluent vorliegen.

3.2.14. Analyse der KO Zellen mittels FACS

Die Zellen werden zwei Tage nach der Transfektion (s. 4.7.2) mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) einer speziellen Form der Durchflusszytometrie analysiert und sortiert. Auf diese Art werden die Zellen anhand von Fluoreszenzmerkmalen ausgewählt. Zur Vorbereitung wird mit den Zellen wie unter 4.6.2 verfahren. Die Zellepellets werden jedoch in je 1 ml FACS-Puffer gelöst und gefiltert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert und transportiert [48]. Die anschließende Durchflusszytometrie wird mit dem BD FACSAria™III in der FACS und Imaging Facility am Max Planck Institut für Biologie des Alterns in Köln durchgeführt. Erfolgreich transfizierte Zellen werden während der Durchflusszytometrie als GFP-positiv detektiert und die einzelnen Zellen in jeweils ein Well auf 96-well Platten verteilt. In den 96-well Platten (5 je Zelllinie) wurden im Vorfeld je 100 µl/well entsprechendes Zellmedium (s. 4.6) vorgelegt.

3.2.15. Analyse der Einzelzellklone im 96-well

Nach ca. 2 Wochen haben sich die Zellklone soweit vermehrt, dass sie analysiert werden können. Für die Analyse und den Erhalt werden die Zellen aus dem ursprünglichen 96-well auf je zwei neue 96-well Platten verteilt. Zunächst werden in dem 96-well, das für den Erhalt der Zellen vorgesehen ist 100 µl vorgewärmtes Zellmedium vorgelegt. Im Gegensatz zum Splitten wie unter 4.6.2 werden die gelösten Zellen in je 200 µl Medium resuspendiert. Je ein Tropfen der resuspendierten Zellen wird für den Erhalt in das vorgelegte Medium der 96-well Platte gegeben, der Rest der Zellsuspension kommt komplett in ein Well einer weiteren 96-well Platte (für die Analyse). Die Analyse erfolgt einen Tag später.

Für die Extraktion der DNA wird das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit 1x PBS gewaschen. Pro Well werden 30 µl Lysepuffer hinzugefügt und die Zellen für 5 min auf einem Schüttler gelöst. Die lysierten Zellen werden in PCR-Tubes überführt und im Thermocycler bei 56 °C für 1 h gefolgt von 10 min bei 95 °C inkubiert. Die gelöste DNA kann bei 4 °C gelagert oder direkt für die PCR genutzt werden. Für die Analyse der Casper/Cas9 Zellen wird die RedTaq PCR verwendet und die Proben mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung (s. 4.4) analysiert.

Verwendete Puffer

Lysepuffer für CRISPR/Cas9 Zellen

50 mM KCl; 2,5 mM MgCl₂; 10 mM Tris (pH 8,3); 0,45 % Tween; 0,45 % Triton-X-100
→ 100 µg/ml Proteinase K direkt vor Benutzung hinzugeben

FACS-Puffer

1x PBS Puffer; 2 % FBS

3.2.16. Herstellung von Zelllysaten (WCL)

Alle nun folgenden Arbeitsschritte werden auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Das Zellmedium wird abgenommen und die Zellen mit 5 ml 1x PBS je 10 cm Schale resuspendiert (1 ml PBS im 6-well). HEK 293T Zellen lösen sich durch mehrmaliges auf und ab pipettieren vom Boden der Zellkulturschalen. Für HKC8 Zellen wird zusätzlich ein Zellschaber verwendet. Die resuspendierten Zellen werden in ein 15 ml Falcon (1,5 ml Eppendorfgefäß bei 1 ml Zellsuspension) überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes werden die Pellets mit je 1 ml 1x PBS im 15 ml Falcon erneut resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Zur Herstellung eines WCL werden dann je ca. 500 µl 1x Laemmli-Puffer (ca. 200 µl je 6-well) auf die Zellpellets gegeben. Das zuzugebende Volumen an Laemmli-Puffer kann je nach Zellmenge variieren. Nach Zugabe des Laemmli-Puffers werden die Zellen bei 95 °C für 5 min gekocht und im Anschluss erneut auf höchster Stufe für 1 min zentrifugiert [49]. Die aufgekochten Lysate können bei -20 °C gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

Verwendete Puffer

2x Laemmli-Puffer (pH 6,8)

100 mM Tris; 20 % Glycerol; 4 % SDS; Bromphenolblau; 100 mM DTT

1x Laemmli-Puffer

50 % 2x Laemmli-Puffer; 50 % H₂O

3.2.17. Herstellung/Aufbereitung von monoklonalen anti-Nphp1 Antikörpern

Die monoklonalen murinen anti-Nphp1 AK wurden im Vorfeld durch das Nephrolab in Kollaboration mit dem Labor von Hanswalter Zentgraf (†2011) am German Cancer Research Center generiert. Mittels Hybridoma-Technik [50] wurden Klone generiert, die monoklonale anti-Nphp1 AK sezernieren, deren Aufbereitung im Folgenden beschrieben wird.

3.2.18. Ammoniumsulfat Präzipitation

Die gewünschte Menge Hybridomaüberstand wird in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Unter ständigem Rühren mittels magnetischem Rührer wird tropfenweise die gleiche Menge gesättigte Ammoniumsulfatlösung hinzugegeben. Schaumbildung sollte dabei möglichst vermieden werden. Die benötigte Menge an Ammoniumsulfatlösung kann leicht variieren, es sollte jedoch so viel hinzugegeben werden, bis sich der Reaktionsansatz trübt. Der Ansatz wird über Nacht bei 4 °C gelagert. Der gesamte Inhalt des Erlenmeyerkolbens wird dann in ein Zentrifugationsgefäß gegeben und bei 1000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das Pellet getrocknet. Das Pellet wird dann in 10 % des Ursprungsvolumens in 1x PBS resuspendiert.

Verwendete Puffer

Ammoniumsulfatlösung

5,75 M Ammoniumsulfat

3.2.19. Aufreinigung der anti-Nphp1 AK mittels Protein G Beads

Die konzentrierte Fällung wird nun mittels Protein G Beads aufgereinigt. Hierzu werden dem resuspendierten Pellet (s. 4.10.1) je nach Konzentration ca. 200 µl Protein G Beads hinzugefügt und der Ansatz 1 h bei RT auf dem Overheadshaker inkubiert. Der Ansatz aus Antikörpern und Protein G Beads wird nun zur Aufreinigung auf eine Säule gegeben (Abbildung 1). Nachdem die gesamte Flüssigkeit durch die Säule gelaufen ist wird diese zunächst mit 5 ml und anschließend mit weiteren 2 ml Binding-Puffer gewaschen (Abbildung 1 „Waschen“). Um sicher zu stellen, dass alle nicht gebundenen Proteine aus der Säule herausgewaschen wurden, können während des Waschvorgangs einzelne Fraktionen des Puffers aufgefangen werden und deren Absorption bei 280 nm mittels Nanodrop gemessen werden. Am Ende des Waschvorgangs sollte diese ca. im Bereich der Absorption des puren Binding-Puffers liegen. Anschließend werden die Antikörper eluiert. Hierfür werden 2 ml Elutions-Puffer auf die Säule gegeben und ca. 0,2 ml Fraktionen aufgefangen (Abbildung 1 „Elution“). Den Antikörperfraktionen werden jeweils 10 µl Tris (pH 8,5) hinzugegeben, um den physiologischen pH-Wert herzustellen. Die Absorption der einzelnen Fraktionen wird ebenfalls

gemessen. Die Absorption der letzten Fraktion sollte ca. der des reinen Elutions-Puffers entsprechen. Im nächsten Schritt erfolgt die Konzentrationsbestimmung der Antikörper.

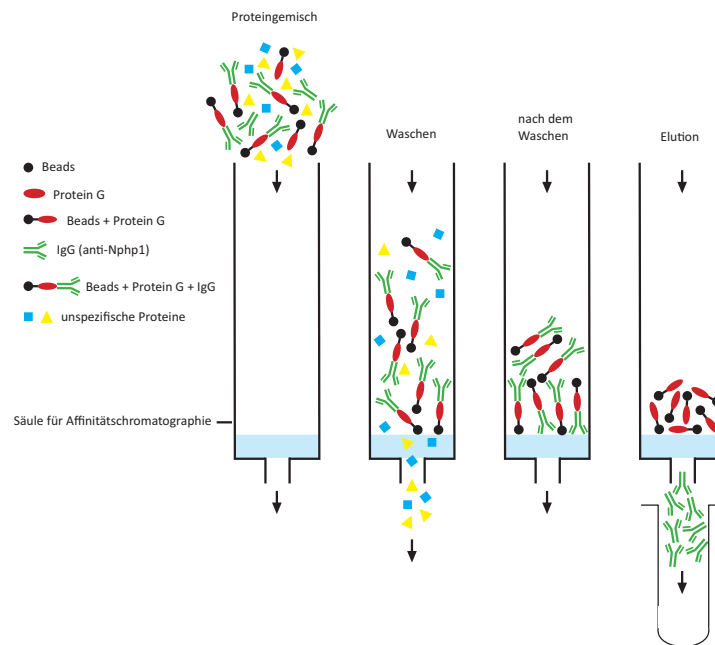


Abbildung 2: Aufreinigung der anti-Nphp1 AK mittels Protein G beads

3.2.20. Konzentrationsbestimmung der anti-Nphp1 AK

Die ungefähre Konzentrationsbestimmung der einzelnen Antikörperfraktionen erfolgt mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung durch Coomassie. Von jeder Fraktion werden 5 µl mit 5 µl 2x Laemmli bei 95 °C für 5 min gekocht und im Anschluss für 1 min fullspeed zentrifugiert. Als Referenz dient eine Probe BSA, die genauso mit 2x Lämmli versetzt und behandelt wird, wie die Proben der Antikörper. Die Konzentration der BSA Probe beträgt 0,5 µg/µl. Für die SDS-PAGE wird ein 15 % Acrylamidgel (s. 4.13.1) verwendet. Von den Antikörperfraktionen werden jeweils die 10 µl der aufbereiteten Proben geladen. Neben diesen läuft auf einer Spur der Größen-Marker. Zusätzlich wird eine Spur mit 2 µl der BSA-Probe (ca. 1 µg BSA) und eine weitere Spur mit 10 µl der BSA-Probe (ca. 5 µg BSA) geladen. Das Gel wird wie unter 4.13.2 beschrieben laufen gelassen. Anschließend wird das Gel für 30 min in 15 ml Fixierlösung fixiert. Danach wird das Gel in einer Colloidal Coomassie Färberlösung über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgt mit Wasser. Das Gel wird mit dem Odyssey CLx System von LI-COR gescannt. Anhand des Scans können mit Hilfe ImageStudio Software von LI-COR und der Referenzproben aus BSA die Konzentrationen der einzelnen Antikörperfraktionen abgeschätzt werden (s. 5.1). Die Antikörperfraktionen werden

für die Lagerung 1:1 mit Glycerol verdünnt wodurch sich die geschätzte Konzentration halbiert. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C.

Verwendete Puffer

Fixierlösung

25 % Isopropanol; 10 % Reine Essigsäure

Colloidal Coomassie Färbelösung

80 % Färbelösung (755 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,55 % Phosphorsäure; 0,1 % Coomassie brilliant blue G-250), 20 % Methanol

3.2.21. Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation (IP) wurde sowohl mit Zellen, als auch mit Mausgewebe (Hoden/Niere) durchgeführt. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis/4 °C durchgeführt, sofern nicht anders beschrieben. Die Organe werden mit einem Skalpell zerkleinert und jeweils mit 1 ml modifiziertem RIPA Puffer in einen Tissue Grinder gegeben. Die Zellen werden ebenfalls in 1 ml modifiziertem RIPA Puffer geerntet und in den Tissue Grinder gegeben. Nach 60 x Homogenisierung folgt eine Inkubation für 30 min auf dem Overheadshaker. Im Anschluss werden die Proben für 30 min mit fullspeed zentrifugiert. Der Überstand wird in Ultrazentrifugationsgefäß überführt. Die Proben werden für 30 min mit 45.000 rpm ultrazentrifugiert. Der Überstand wird in ein Eppendorfgefäß gegeben. Das Preclearing erfolgt mit 30 µl unverdünnte Protein G Beads je Probe für 1h auf dem Overheadshaker. Anschließend erfolgt eine 3 min Zentrifugation mit 4.000 rpm. Der Überstand wird abgenommen. Jeweils 30 µl des Überstandes werden in ein separates Eppendorfgefäß überführt und mit je 30 µl 2x Lämmli als Lysat aufbereitet. Die restlichen Überständen werde mit je 30 µg des anti-Nphp1 #62 AK (oder ca. 10 µg unaufgereinigter Hybridomaüberstand) für 1h auf dem Overheadshaker inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit je 30 µl unverdünnte Protein G Beads für 1h auf dem Overheadshaker. Die Proben werden anschließend für 1 min mit 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Beads mit 1 ml modifiziertem RIPA Puffer gewaschen. Die Folge aus Zentrifugation und Waschen wird insgesamt 3x wiederholt. Die Proben wurden dann entweder für SDS-PAGE und Westernblot oder für die Analysen mit MS aufbereitet.

3.2.22. Aufbereitung der IP Proben für SDS-PAGE und Westernblot

Der Überstand wird abgenommen und die Beads mit je 30 µl 2x Laemmli versetzt und zu Lysaten aufbereitet (4.9)

Verwendete Puffer

2x Laemmli-Puffer

100 mM Tris; 20 % Glycerol; 4 % SDS; Bromphenolblau; 100 mM DTT

Modifizierter RIPA Puffer (pH 8)

1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 0,1 % Na-DOC, 2 mM Na₃VO₄, 0,44 % PMSF,
10 mM Tris, 1 % Trion-X 100

3.2.23. Aufbereitung der IP Proben für MS

Für Aufbereitung der Mäusenieren für das Nphp1 Interaktom, wird der Überstand abgenommen (s. 4.11) und die Beads mit je 80 µl SDS (4 %) bei 95 °C für 3 min aufgeköcht und den Proben jeweils 4 µl DTT (200 mmol) hinzugefügt (ca. 10 mmol/Probe). Die Proben werden für 30 min RT inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl IAA (200 mmol, ca. 10 mmol/Probe) je Probe, werden diese 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 5 min bei fullspeed. Jeweils ca. 100 µl können als Überstand abgenommen und bei -20 °C gelagert werden.

Die weitere Verarbeitung und das Messen der Proben erfolgte in der CECAD/ZMMK Proteomics-Facility in Köln. Die MS Rohdaten wurden unter Verwendung von Standardparametern mit Maxquant (Version 1.5.3.8) verarbeitet. Der Students-t Test wurde mit Perseus (Version 1.6.15.0) nach Entfernung potentieller Verunreinigungen berechnet.

3.2.24. Aufbereitung der Proteine mittels In Gel Digest für MS

Die Hoden der Nphp1 Mäuse wurden mittels In Gel Digest für MS aufbereitet. Um die Proben so sauber wie möglich zu halten, werden während der Arbeiten Handschuhe getragen. Die mit Laemmli aufgeköchten Proben der IP (s.o.) werden zunächst mit 5 mM DTT versetzt und für 30 min bei 56 °C inkubiert. Dann wird den Proben 40 mM CAA hinzugegeben, gevortext und für 30 min bei RT im dunklen inkubiert. Die Proben werden dann auf einem SDS-Gel laufen gelassen und anschließend mittels Coomassie gefärbt (4.13.2 u. 4.10.3). Die gewünschten Banden werden aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert (ca. 1mm) und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Es werden jeweils 100 µl 50 mM ABC/50 % ACN hinzugegeben, gevortext und die Proben für 20 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird anschließend verworfen und der Schritt erneut durchgeführt. Danach werden 100 µl ACN auf die Gelstücke gegeben, gevortext und für 10 min inkubiert.

Um die Gelstücke vollständig zu entfärben, werden folgende Schritte so oft wie notwendig durchgeführt: Es werden 100 µl 50 mM ABC hinzugegeben, gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird abgenommen und so viel ACN hinzugegeben, dass die Stücke

bedeckt sind, gevortext und für 15 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird danach erneut abgenommen.

Die entfärbten Gelstücke werden für 5 min im SpeedVac getrocknet. Auf die Gelstücke wird dann eine Verdau-Lösung (10 ng/ μ L von 90 % Trypsin und 10 % LysC in 50 mM ABC) gegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und so viel 50 mM ABC hinzugegeben, dass die Gelstücke bedeckt sind, die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C im Schüttler mit 750 rpm.

Am folgenden Tag wird der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die Gelstücke werden mit 100 μ L 30 % ACN/3 % TFA bedeckt, gevortext und 20 min bei RT inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und dem zuvor abgenommenen Überstand hinzugegeben. Danach werden 100 μ L 100 % CAN auf die Gelstücke gegeben, gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Der Überstand wird ebenfalls zu den zuvor abgenommenen Überständen gegeben. Die gesammelten Überstände werden im Speedvac getrocknet (Restvolumen <50 μ l). Dem Restvolumen wird Ameisensäure bis zu einer finalen Konzentration von 1% hinzugegeben. Es wird wie unter 4.11.5 beschrieben fortgefahren.

Verwendete Puffer

Puffer A für In gel Digest

0,1 % Ameisensäure in H₂O

Puffer B für In gel Digest

0,1 % Ameisensäure in 80 % Acetonitril

3.2.25. Aufbereitung der Proteine mittels In Solution Digest für MS

Die Proben für das Proteom aus HKC8 Zellen wurden mittels In Solution Digest aufbereitet. Die Zellpellets werden in Urea Puffer gelöst, die Konzentration sollte danach ≥ 6 M Urea betragen. Um das Chromatin zu zersetzen wird der Biorupter benutzt (10 min, Cycle 30/30 sec). Anschließend werden die Proben bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Protein Konzentration wird nun mittels BCA Assay gemessen (s. 4.12.). Es werden 50 μ g je Probe in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nun wird DTT hinzugegeben (finale Konzentration 5 mM), die Proben gevortext und bei 25 °C für 1h inkubiert. Danach wird CAA (finale Konzentration 40 mM) hinzugegeben, erneut gevortext und für 30 min bei RT im dunklen inkubiert. Die Proben werden nun mit 50 mM TEAB verdünnt, um eine finale Urea Konzentration von ≤ 2 M zu erreichen. Nach Hinzugabe von Trypsin (Enzym:Substrat-Verhältnis 1:75) werden die Proben bei 25 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wird wie unter 4.11.5 beschrieben, fortgefahren.

Verwendete Puffer

Urea Puffer

8 M Urea in 50 mM TEAB

3.2.26. StageTip

Zur Aufreinigung der Proben nach dem In Gel und In Solution Digest, wird je Probe ein StageTip verwendet, welcher zunächst equilibriert wird. Hierzu werden 20 µl Methanol auf den StageTip gegeben und 1 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Es werden dann 20 µl von Puffer B hinzugegeben und die Zentrifugation wie zuvor durchgeführt. Anschließend werden 20 µl des Puffers A auf den StageTip gegeben und bei 2.600 rpm für 1,5 min zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 20 µl des Puffers A erfolgt die Zentrifugation bei 2.600 rpm für 2 min. Danach sollten noch ca. 1-2 mm des Puffers A auf der C¹⁸ – haltigen Schicht stehen und die übrigen Flüssigkeiten verworfen werden bevor mit der eigentlichen Proteinaufreinigung begonnen werden kann. Die Proben werden für 5 min fullspeed zentrifugiert und der Überstand auf je ein StageTip gegeben und erneut für 5 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Die StageTips werden dann gewaschen. Zunächst mit 30 µl Puffer A und 3 minütiger Zentrifugation bei 2.600 rpm und anschließend 2x mit je 30 µl Puffer B gefolgt von jeweils 3 minütiger Zentrifugation bei 2.600 rpm. Die restliche Flüssigkeit wird mit einer Spritze abgenommen und die StageTips bei 4 °C verwahrt.

Die weitere Verarbeitung und das Messen der Proben erfolgte in der CECAD/ZMMK Proteomics-Facility in Köln. Die MS Rohdaten wurden unter Verwendung von Standardparametern mit Maxquant (Version 1.5.3.8) verarbeitet. Der Students-t Test wurde mit Perseus (Version 1.6.15.0) nach Entfernung potentieller Verunreinigungen berechnet.

3.2.27. Quantifizierung von Proteinen

Für die Quantifizierung von Proteinkonzentrationen in Organlysaten/Zelllysaten wurde das BCA-Protein-Assay-Kit verwendet. Der Proteinstandard wird nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls angefertigt. Je 5 µl des Standards und 5 µl der Probe werden in ein Well einer 96-well Platte pipettiert und ein Mastermix mit 150 µl BCA-Lösung A und 3 µl BCA-Lösung B je Well vorbereitet. 150 µl des Mastermixes werden zu jedem Well hinzugegeben und für 30 Sek. auf einem Schüttler gemischt und danach bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem EnSpire Microplate Reader bei 560 nm.

3.2.28. SDS-PAGE und Westernblot

Mittels Westernblot können Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt und mittel spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden. Dies ist möglich, da durch den

Zusatz von SDS und das Erhitzen auf 95 °C die Proteine der Zellen und IP-Proben denaturieren und in ihre sekundär Struktur versetzt werden (s. 4.9). Durch Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die negativ geladenen Proteine zur Anode und werden durch die Poren des SDS-Gels der Größe nach aufgeteilt. Die Proteine können nach Übertragung auf eine Trägermembran mittels spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden.

3.2.29. Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Die PAA-Gele bestehen jeweils aus zwei Phasen, einer Sammelphase gefolgt von einer Trennphase. Die Zusammensetzung der Gele erfolgt nach dem Standardprotokoll, welches im Nephrolab verwendet wird. Kommerziell erhältliche Gel-Kassetten werden zunächst zu 2/3 mit der Trennphase gefüllt. Der Anteil an Acrylamid (10 %/12 %/15 %) kann dabei je Größe der interessierenden Proteine variieren. Gele mit geringerem Anteil an Acrylamid haben größere Poren und eignen sich daher besonders zur Auftrennung großer Proteine (> 100 kDa). Die Trennphase ist nach ca. 20 min fest. Im Anschluss wird die Kassette mit der Sammelphase aufgefüllt und ein Kamm eingesetzt, der die Taschen des Gels präformiert, in die später die Proben gegeben werden. Die Sammelphase benötigt ebenfalls ca. 20 min bis sie fest ist.

Verwendete Puffer/Chemikalien

Sammelphase (pH 6,8)

5 % Acrylamid, 0,2 % APS, 0,2 % SDS, 0,3 % TMED, 250 mM Tris

Trennphase (pH 8,8)

10 %/12 %/15 % Acrylamid, 0,1 % APS, 0,2 % SDS, 0,15 % TMED, 750 mM Tris

3.2.30. SDS-PAGE

Die fertigen PAA-Gele werden nach Entfernung des Kamms in eine Gelelektrophorese-Kammer gestellt (2 Gele pro Kammer). Die Kammer wird mit Laufpuffer gefüllt. Es werden nun in Abhängigkeit von der Konzentration ca. 15 µl je Probe und zusätzlich 3 µl eines Größen-Markers geladen. Die Gele werden im Anschluss mit einem zweigeteilten Programm laufen gelassen. Die Sammelphase wird bei 70 V für 30 min durchlaufen, die mA-Zahl variiert. In der Trennphase werden die Proteine in 100 min bei variierender V-Zahl und je 25 mA je Gel aufgetrennt.

Verwendete Puffer/Chemikalien

Laufpuffer

192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 25 mM Tris Base

3.2.31. Westernblot

In diesem Schritt werden die aufgetrennten Proteine von dem Gel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) transferiert. Für jedes Gel werden eine Membran, sowie zwei Filterpapiere benötigt. Das Gel wird vorsichtig aus der Kassette gelöst, die Sammelphase wird abgetrennt und verworfen und das Gel vorübergehend in Transferpuffer gelegt. Die Filterpapiere werden mit Transferpuffer getränkt. Die PVDF-Membran wird für 30 s in Methanol aktiviert und anschließend in Transferpuffer gewaschen. Alle Komponenten werden in folgender Reihenfolge von unten nach oben in einer Transfer-Kammer geschichtet: Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier. Der Transfer erfolgt bei RT für ca. 65 min (für Nphp1, variabel je nach Proteingröße) und 12 V.

Verwendete Puffer/Chemikalien

Transferpuffer

188 mM Glycin, 15,2% Methanol, 3,5 mM SDS, 25 mM Tris Base

Blocken

Nach dem Transfer wird die Membran für eine Stunde bei RT in Blockpuffer geblockt. Nach dem Blocken wird die Membran 3x je 10 min in Protein-Waschpuffer gereinigt.

Verwendete Puffer/Chemikalien

Blockpuffer

5 % BSA in Protein-Waschpuffer

Protein-Waschpuffer (pH 7,5)

306 mM NaCl, 30,6 mM Tris, 0,3 % Tween 20

Primärer und sekundärer Antikörper

Die Membranen werden mit einem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert. Der Antikörper wird in Protein-Waschpuffer gegeben (Verhältnis s. Material) und mit der Membran über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird die Membran für 3x 5 min in Protein-Waschpuffer gewaschen. Die sekundären Antikörper sind mit HRP markiert und werden 1:30.000 in Protein-Waschpuffer verdünnt. Die Inkubation des sekundären

Antikörpers erfolgt für 30 min bei RT auf dem Schüttler. Danach wird die Membran für 3 x 10 min gewaschen.

Chemilumineszenz

Die Markierung mit HRP ermöglicht es, die Proteine mit selbst hergestelltem ECL oder kommerziell erhältlichem *Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* sichtbar zu machen. Es werden 800 µl des ECLs oder 100 µl des Femtos auf die Membran gegeben. Die dann ablaufende Chemolumineszenzreaktion kann mit einer UV-Kamera (Fusion) detektiert werden.

Verwendete Puffer/Chemikalien

Enhanced Chemiluminescence (pH 8,5)

0,198 mM Cumarinsäure, 0,01 % H₂O₂ , 25 mM Luminol, 100 mM Tris

3.2.32. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die Zellen zunächst im 12-well auf Deckgläser gesplittet. Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 90 % wird das Zellmedium abgenommen, die Deckgläser mit 1x PBS gewaschen und Zellmedium ohne FBS hinzugefügt. In diesem Zustand werden die Zellen für weitere 24 h inkubiert. Das Zellmedium wird abgenommen und die Zellen in 1x PBS (s.o) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt dann mit 4 % PFA-Fixierlösung für 10 min bei RT (unter dem Abzug). Es folgen drei Waschschr. mit PBS+ für 3x 5 min. Nach dem letzten Waschschr. werden die Zellen mit 5 % NDS in PBST (ca. 100 µl/Deckglas) für 30 min bei RT geblockt. Die Zellen werden dann einmal mit PBS+ gewaschen. Der primäre Antikörper wird dann in PBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank auf den Zellen belassen. Am folgenden Tag werden die Zellen zunächst 3x 5 min mit PBS+ gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird ebenfalls nach Herstellerangaben mit PBST verdünnt. Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte für 1 h bei RT im Dunkeln. Anschließend werden die Zellen 3x 5 min mit PBS+ und dann kurz in destilliertes Wasser getaucht. Die Waschschr. werden im Dunkeln durchgeführt. Das überschüssige Wasser wird vorsichtig mit einem Tuch über den Rand der Deckgläser abgenommen und jedes Deckglas mit einem Tropfen (max. 10 µl) Prolong Diamond+DAPI auf einem Objektträger eingedeckelt. Zum Trocknen werden die Objektträger für 24 h im Dunkeln bei RT gelagert und anschließend am Mikroskop analysiert.

Verwendete Puffer

PBS+

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂ HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 1 mM CaCl₂; 0,5 mM MgCl₂

PBST

137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂ HPO₄; 2 mM KH₂PO₄; 1 mM CaCl₂

3.2.33. Herstellung der sgRNA zu Generierung von Mauslinien

Für die Herstellung der sgRNAs wird zunächst eine Q5 PCR (s.o) mit dem für die jeweilige sgRNA spezifischen Vorwärtsprimer und einem universellen Rückwärtsprimer laufen gelassen. Als Template dient der Vektor pSpCas9(BB)-2APuro(PX459) V2.0 (Addgene). Das PCR Produkt wird auf ein Agarosegel geladen, ausgeschnitten und mit einem Gelextraktions-Kit (s.o.) aufgereinigt. Die Synthese der sgRNA erfolgt mit dem HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit. Anschließend erfolgt die Aufreinigung mittels des RNA purification miRNesay Kit. Die RNA wird vor der Lagerung bei - 80 °C je nach Konzentration im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.2.34. Generierung der transgenen Mauslinie mittels CRISPR/Cas9

Die Generierung der Mauslinien auf Basis eine C57/Bl6 Backgrounds mittels CRISPR/Cas9 erfolgte durch die *in vivo* Facility des CECAD Kölns durch pronukleäre Injektion [51]

3.2.35. Aufbereitung der Eartags für die Genotypisierung

Die von der Tierhaltung zur Verfügung gestellten Gewebeproben (Eartags) der Versuchstiere, werden zunächst mit 75 µl einer basischen Lösung für 30 min bei 95 °C gekocht. Nachdem die Proben abgekühlt sind, werden je 75 µl einer Neutralisationslösung hinzugegeben und die Proben für 5-10 s gevortext. Die Proben können dann direkt für die Genotypisierungs-PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

Verwendete Puffer

Base-Lösung 1X (pH 12)

24,8 mM NaOH; 0,2 mM EDTA

Neutralisationslösung 1X (pH 5)

2M Tris-HCL

3.2.36. Genotypisierungs-PCR für die *Nphp1* Mäuse

Die PCR zur Genotypisierung der Mäuse wird mit dem REDTaq® ReadyMix™ durchgeführt wie folgt pipettiert:

REDTaq® ReadyMix™	10 µl
ddH₂O	7 µl
Primermix (1:10)	1 µl
DNA aus Eartag	2 µl

Für jede PCR werden jeweils 3 Proben zusätzlich pipettiert (*Nphp1*^{+/+}, *Nphp1*^{-/+}, *Nphp1*^{-/-}). Für die Analyse der *Nphp1* Mauslinie wurde der Thermocycler wie folgt programmiert:

Temperatur	Zeit	Wiederholung
94°	3 min	
94°	30 s	
54°	30 s	32 x
72°	1 min	
72°	10 min	

Die Proben werden mit einem 50 bp DNA-Marker auf ein 2 % Agarosegel geladen (s. 3.1), sodass der Genotyp der Mäuse bestimmt werden kann.

3.2.37. Herstellung der Organschnitte

Die entnommenen Organe werden in 4 % Formalin für 24 h bei 4 °C eingelegt und durch die Pathologie der Uniklinik Köln entwässert. Anschließend erfolgt die Einbettung in Paraffin. Mit dem Mikrotom werden dann 2 µm dicke Präparate geschnitten, die bei 60 °C für 1 h oder über Nacht bei RT getrocknet werden.

3.2.38. PAS-Färbung

Für die Färbung wird den Präparaten zunächst in mehreren Einzelschritten das Paraffin entzogen. Die Inkubation der Präparate erfolgt für je 5 min in folgender Reihenfolge: 2x Xylol, 3x 100 % Ethanol, 2x 95 % Ethanol und 1x in 70 % Ethanol. Es folgt ein Waschschrift in destilliertem Wasser für 1 min. Danach werden die Präparate für 10 min in Perjodsäure inkubiert und erneut für 1 min gewaschen. Im Anschluss folgt die Inkubation im Schiffs-Reagenz für 10 min gefolgt von einem Waschschrift mit Leitungswasser für 2 min. Die Anfärbung erfolgt dann mit Mayer's Hämatoxylin für 10 min. Überschüssige Farbe wird mit

Leitungswasser heruntergewaschen. Die Alkoholreihe (s.o.) wird nun in aufsteigender Reihenfolge erneut durchlaufen. Die Präparate werden dann mit Histomount auf einem Deckglas fixiert und im Slidescanner gescannt.

4. Ergebnisse

4.1 Herstellung und Validierung von *NPHP1* defizienten humanen Nierenepithelzellen basierend auf der HKC8 Zelllinie

Um die bislang nicht hinreichend geklärte Funktion von *NPHP1* zu analysieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst *NPHP1* KO Zellen generiert.

Für die Generierung des KO von *NPHP1* in HKC8 Zellen wurden je eine spezifische sgRNA für Exon 1 und Exon 6 ausgewählt. Für Exon 1 zeigten sich nach der Transfektion insgesamt 10% der Zellen GFP positiv, für Exon 6 13,2%. Von den GFP positiven Zellen sind für Exon1 91 Klone und für Exon6 64 Klone herangewachsen (jeweils auf 2 96-well Platten). Die genaue Anzahl von KO Zellklonen, also auch die Effizienz der Editierung ist nicht bekannt, da die Analyse beendet wurden, sobald KO Klone in ausreichender Zahl vorlagen. Abbildung 3A zeigt, dass beim ausgewählten Klon in Exon 1 eine 1 bp Insertion zu einem Frameshift führt, der sich auf Proteinebene durch den Einbau eines Stop-Codons bei AS 25 zeigt (Abbildung 3B). Ein Klon aus dem Exon 6 Ansatz zeigt hingegen eine 1 bp Deletion (Abbildung 3C), die auf Proteinebene zum Einbau eines Stop-Codons bei AS 191 führt (Abbildung 3D). Beide selektierten monoklonalen KO Linien werden im Folgenden auf Proteinebene mittels Westernblot verifiziert.

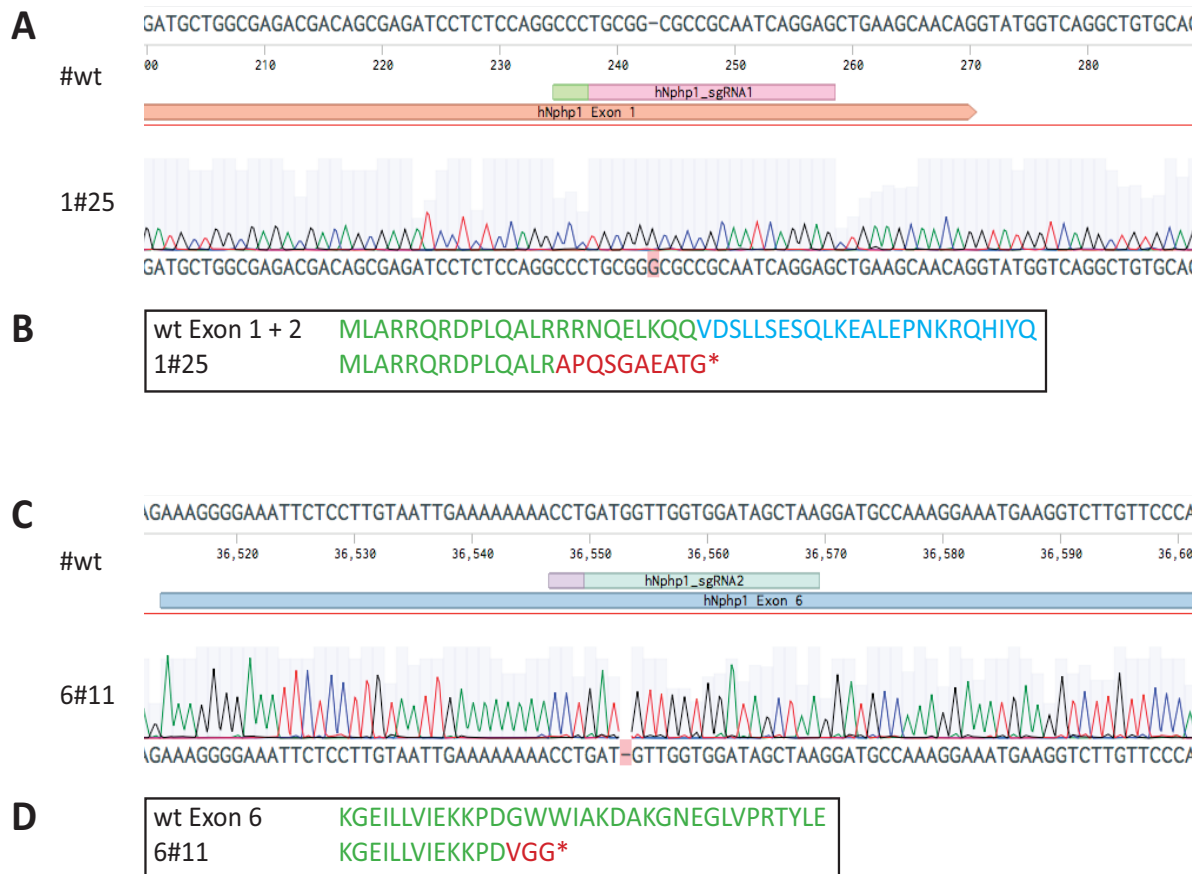


Abbildung 3: Spezifische sgRNAs induzieren den KO von *NPHP1* in Exon 1 und Exon 6 in HKC8 Zellen.

A. Der KO von *NPHP1* in Exon 1 bei HKC8 Zellen wird auf DNA Ebene bestätigt. HKC8 Zellen wurden mit einer spezifisch für Exon 1 ausgewählten sgRNA mit den unter 3.7 beschriebenen Konditionen transfiziert und wie unter 3.8 beschrieben analysiert. Das Ergebnis der Sequenzierung für den Klon 1#25 ist hier im Vergleich zur wt Sequenz dargestellt. Eine 1 bp Insertion führt zum Frameshift und induziert den KO in Exon 1. **B. Auswirkung der Insertion in Exon 1 auf die AS-Sequenz.** Es wird die AS-Sequenz des wt von Exon 1 (grün) und Exon 2 (blau) dargestellt. Die 1 bp Insertion in Exon 1 führt über einen Frameshift zum Einbau eines Stop-Codons bei AS 25 zu Beginn des Exons 2. Es kommt zum KO von *NPHP1*. **C. Der KO von *NPHP1* in Exon 6 bei HKC8 Zellen wird auf DNA Ebene bestätigt.** HKC8 Zellen wurden mit einer spezifisch für Exon 6 ausgewählten sgRNA mit den unter 3.7 beschriebenen Konditionen transfiziert und wie unter 3.8 beschrieben analysiert. Das Ergebnis der Sequenzierung für den Klon 6#11 ist hier im Vergleich zur wt Sequenz dargestellt. Eine 1 bp Deletion führt zum Frameshift und induziert den KO in Exon 6. **D. Auswirkung der Deletion in Exon 6 auf die AS-Sequenz.** Es wird die AS-Sequenz des wt von Exon 6 (grün) dargestellt. Die 1 bp Deletion führt über einen Frameshift zum Einbau eines Stop-Codons und damit zum KO von *NPHP1*.

4.2 Der KO von NPHP1 in HKC8 Zellen wird auf Proteinebene bestätigt

Um den Verlust der NPHP1 Expression in den Zellen zu bestätigen, wurden jeweils Zellen der NPHP1-KO Klone 1#25 und 6#11, sowie ursprünglichen ‚Wildtyp‘ (wt) Zelllinie für einen Westernblot aufbereitet und der Westernblot mittels entsprechender Antikörper angefärbt.

Das wt Lysat zeigt im Westernblot eine deutliche Bande für NPHP1 unterhalb von 100 kDa. Die beiden KO Klone 1#25 und 6#11 zeigen jeweils keine Banden für NPHP1. Es wurde zusätzlich ein Färbung des Westernblots gegen Aktin durchgeführt, um technische Fehler und Proteinverluste während des Experiments auszuschließen. Diese zeigt auf Höhe von ca. 40 kDa für die wt Zellen und die KO Zellen deutliche Banden für Actin (Abbildung 4). Insgesamt kann der NPHP1 KO der Klone 1#25 und 6#11 auch auf Proteinebene als bestätigt angesehen werden. Mittels CRISPR/Cas9 konnten erfolgreich NPHP1 defiziente HKC8 Zellen generiert werden.

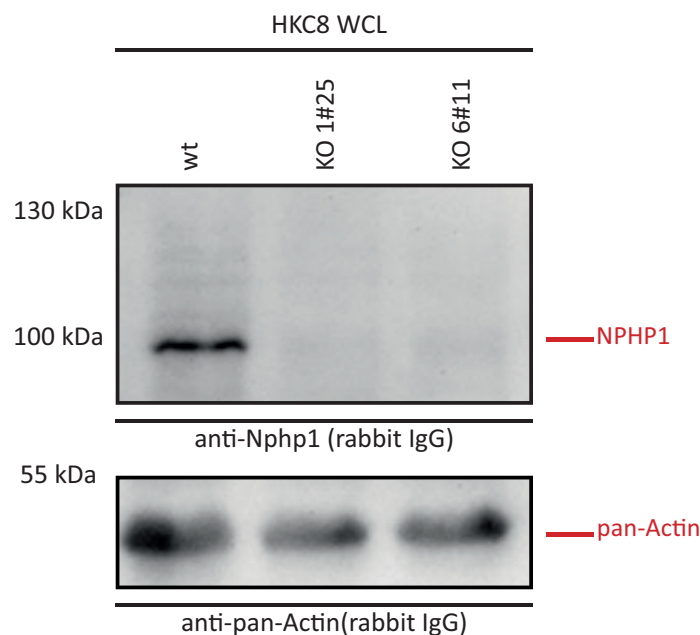


Abbildung 4: Nachweis der fehlenden NPHP1 Expression in den HKC8 Knockout Zellen.

Es wurden jeweils Lysate (WCL) von wt Zellen sowie den KO Klonen 1#25 und 6#11 angefertigt und der entsprechende Westernblot mit einem anti-NPHP1 AK (rabbit IgG) angefärbt. Das Lysat der wt Zellen (Spur 1) zeigt eine deutliche Bande für NPHP1 bei 100 kDa. Die KO Klone 1#25 und 6#11 (Spur 2-3) zeigen keine Banden für NPHP1, sodass der KO von NPHP1 auch auf Proteinebene als bestätigt angesehen werden kann. Es wurde ein Restain des Westernblots mittels anti-pan-Actin AK (rabbit IgG) durchgeführt. Sowohl für das wt Lysat (Spur 1) als auch für die KO Zellen 1#25 und 6#11 (Spur 2-3) zeigen sich deutliche Banden für pan-Actin auf Höhe von ca. 42 kDa.

4.3 Analyse des Proteoms in NPHP1 defizienten Zellen

Um die Bedeutung des NPHP1 Expressionsverlustes zu analysieren und zu verstehen, wurde nach erfolgreicher Validierung der KO Zellen ein Protein-Expressionsprofil erstellt.

Abbildung 9 zeigt eine Übersicht der Proteomanalyse von HKC8 NPHP1 KO Zellen verglichen HKC8 wt Zellen. Die KO Zelllinien wurden während der Analyse (vor dem t-Test) gepoolt, um zu verhindern, dass zu sehende Veränderungen durch off target effects entstanden sind. Eine hierarchische Clusteranalyse zur Feststellung der Ähnlichkeit der Proben zeigt hier keine deutliche Clusterbildung. Sechs der KO Zelllinien clustern zusammen, während 2 Linien zwischen den wt Zellen clustern (Abbildung 5A). Um die Signifikanz veränderter Proteine darzustellen, wurde ein Students t-Test durchgeführt. Der Scatterplot (Abbildung 5B) zeigt alle veränderten Proteine, hiervon signifikant verändert sind alle Proteine mit einem $-\log p\text{-value} > 1,3$. Insgesamt waren somit 201 Proteine signifikant in ihrer Aktivität in den KO Zellen verändert (Tabelle 1). 68 Proteine waren im Vergleich zu den wt Zellen in Ihrer Aktivität runter reguliert, 133 hoch reguliert. Die signifikant regulierten Proteine wurden mit den Proteinen der Cilia Carta Datenbank verglichen. Hier zeigt sich, dass es sich bei zehn der regulierten Proteine um bekannte ziliäre Proteine handelt. 6 Proteine mit den dazugehörigen Genen *ATG3*, *CLASP1*, *CSNK1D*, *ENAH*, *HAUS8*, und *HK1* sind hoch reguliert und 4 Proteine mit den entsprechenden Genen *ARL3*, *CETN2*, *DPYSL2*, *MYO5A* sind runter reguliert [52]. Ein Vergleich der regulierten Proteine mit den Daten des NPHP1 Interaktoms von Sang et al brachte keine Übereinstimmung [27]. Die GO-Termanalyse zeigt, dass NPHP1 u.a. in Cytokin vermittelten Signalwegen und weiteren immunmodulativen Prozessen involviert sein könnte (Abbildung 5C).

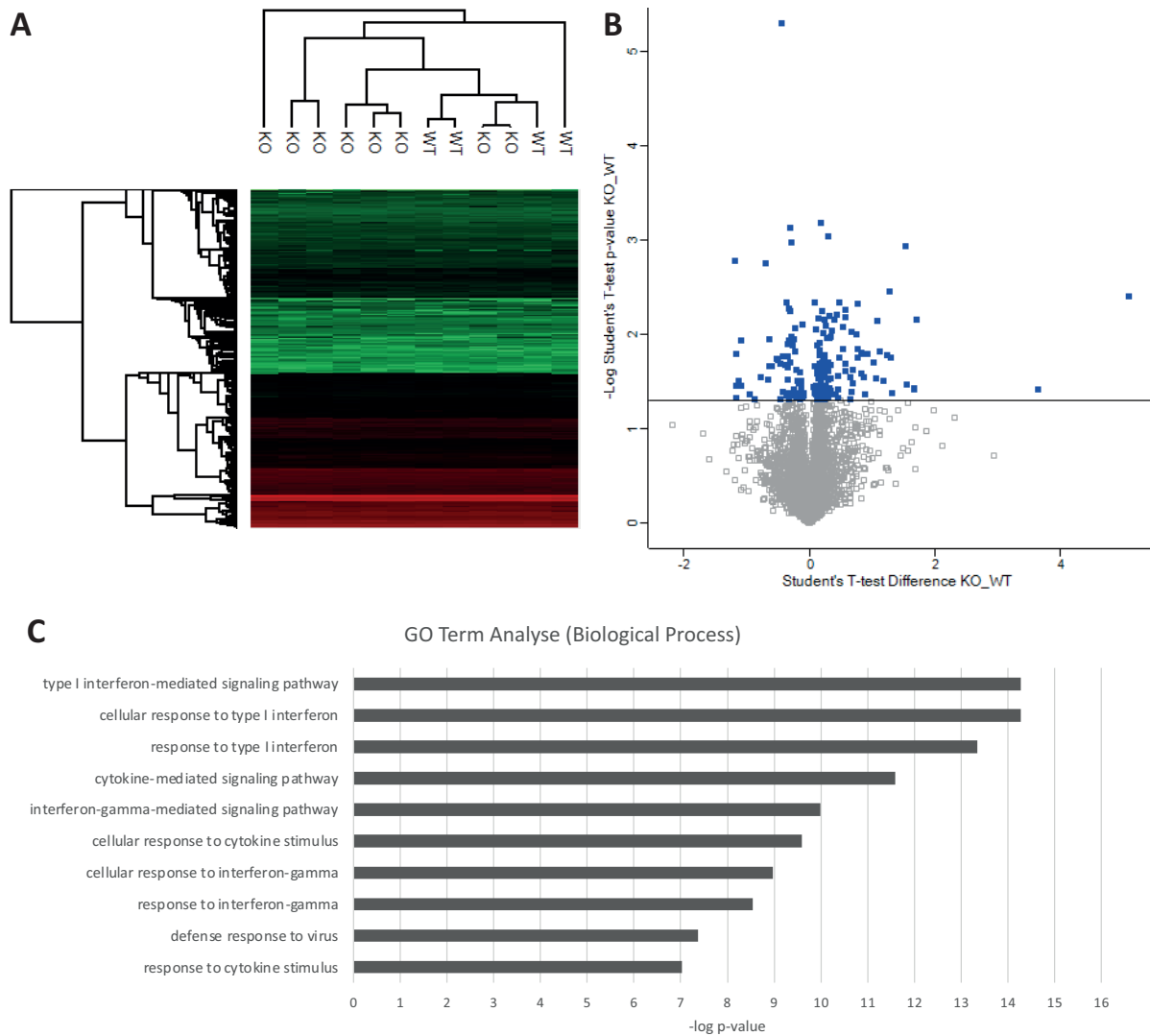


Abbildung 5: Mapping des NPHP1 Proteoms von HKC8 wt und NPHP1 KO Zellen.

A. Die hierarchische Cluster Analyse zeigt senkrecht die verwendeten Proben (HKC8 wt und HKC8 NPHP1 KO Zellen) und waagerecht die korrelierenden Proteine. Hohe Intensitäten werden in rot, niedrige Intensitäten werden in grün abgebildet. **B.** Vergleichende Analyse der angereicherten Proteine in HKC8 wt und HKC8 NPHP1 KO Zellen. Der Scatterplot zeigt die Abweichung im Students t-test von KO vs. wt (x-Achse) geplottet gegen den negativen Logarithmus des Students t-test (y-Achse). Gene mit einem log p-value > 1,3 gelten hier als signifikant. **C.** Graphische Darstellung der GO-Termanalyse (biologische Prozesse), in denen NPHP1 involviert ist (sortiert nach log p-value).

Gene Name	-Log Student's T-test p-value KO_WT	Student's T-test Difference KO_WT
GPHN	5,290165633	-0,438522339
PPA1	3,177428087	0,193265438
ANXA4	3,119298081	-0,296875715
PEA15	3,033544921	0,297589302
DPYSL3	2,964230331	-0,286006927
CNN1	2,926530118	1,540418863
TIMM23;TIMM23B	2,780632773	-1,179307938
ALDH3B1	2,753273427	-0,700963974
THBS2	2,45062544	1,276578188
MX1	2,404234406	5,101042032
LMO7	2,336003767	0,480561256
TACC1	2,335113572	-0,366921663
NUP133	2,332941903	0,093913555
HLA-B	2,322724654	0,777563334
EPB41L1	2,274475861	-0,332130194
C1orf198	2,256673128	0,57498765
CETN2	2,238155407	-0,304271698
PAPSS2	2,236231352	0,200369835
MYO6	2,204691834	0,440363407
CALD1	2,196292172	0,323385477
GBP1	2,177471168	0,572999239
FAM136A	2,158832367	0,139974594
CTPS1	2,155643606	0,245442867
MRPS17;hCG_1984214	2,146995167	1,706289291
NEK7	2,145598014	0,404074669
YIPF4	2,141001055	1,086364746
SUPT5H	2,097984199	-0,115635872
METTL16	2,087547388	0,258000851
ARFIP1	2,075780411	0,53273201
EPB41L3	2,055502134	-0,233292341
NAA15	2,052128546	0,107160091
TFIP11	2,037211301	0,354680538
RABL3	2,02583436	0,676230907
LIMA1	2,00238863	0,21884346
TPRKB	1,996598181	0,762125015
NUDT16	1,974653805	-0,285327196
CAMK2D	1,971495396	0,33750844
HEATR3	1,960500454	0,329507113
CSNK1D	1,95392427	0,274372578
GALC	1,942072494	-0,63071537

Fortsetzung auf nächster Seite

Gene Name	-Log Student's T-test p-value KO_WT	Student's T-test Difference KO_WT
GLG1	1,938961284	-0,239672661
HMG3	1,927516201	-1,083048105
SSH3	1,9252887	-0,321267843
PSMG1	1,904748307	0,171442509
MFI2	1,890479254	-0,313923597
GNPAT	1,887571851	-0,335963011
MFAP1	1,880469328	0,135997057
ATE1	1,877492489	-0,255835533
HLA-A	1,846226872	0,530302525
TIMM9	1,843149725	0,773611784
KATNB1	1,821956458	0,162398577
PRKCDBP	1,809205948	1,131335735
DPYSL2	1,809086222	-0,22127986
UBA7	1,798799193	0,829161644
STX10	1,791768477	0,934344053
PRPF18	1,791736962	0,878425121
TMEM192	1,785208499	-1,160419703
HSPB2	1,779264863	1,235655308
RAB32	1,778810162	0,235343456
EMC8	1,773672955	0,171147585
MYO5A	1,766214671	-0,348273039
PDLIM7	1,765859686	0,220542431
ALDH2	1,759661567	-0,423912048
MTR	1,752368947	0,247683764
NTMT1	1,751223071	0,243809462
PARP10	1,748170188	1,29921627
TLK2	1,745343704	0,769649267
CASP7	1,74488204	0,476624966
WAPAL	1,742302306	0,226704836
CLIC3	1,734393736	-0,527266026
PBX2;PBX4	1,722113754	-0,506254911
CEP55	1,703077267	-0,29522419
PUS7	1,702436112	0,223100901
CISD1	1,702198481	0,300867081
AKAP10	1,701045257	1,028591871
ENAH	1,694304744	0,207074881
HLA-B	1,688686524	0,586564541
CSNK2A1;CSNK2A3	1,685182743	0,167063951
PEG10	1,682782348	-0,452399015
FAM160B1	1,67876768	0,304052353

Fortsetzung auf nächster Seite

Gene Name	-Log Student's T-test p-value KO_WT	Student's T-test Difference KO_WT
VTI1B	1,675534425	-0,375448942
PNPT1	1,672127126	0,343373775
LSM4	1,663347787	0,21614027
HSPA4	1,658737407	0,081437588
MSH3	1,656221444	-0,592763662
ENPP4	1,653727009	-0,635272026
NUP85	1,652900097	0,186582565
ELP5	1,652605229	0,288711071
TPMT	1,640563492	-0,335258007
MAGOHB	1,633304069	0,207110167
CYR61	1,622586719	0,686751842
IKBIP	1,621078783	-0,196719408
TPM1	1,608672691	0,303582191
EIF2AK2	1,608182935	0,582987547
HK1	1,607257696	0,122973919
GBA	1,592316378	0,210204363
ACTN1	1,591987858	0,133886814
CAPNS1	1,588996999	-0,137738466
RLTPR	1,581492155	0,823988676
SUCLA2	1,578242942	0,133434772
PRMT7	1,569374302	0,15879178
PNP	1,564603016	0,143884182
TPM1	1,556579042	0,459176302
UAP1	1,550256992	0,217727184
LOXL2	1,542462683	0,655830383
STX4	1,541920607	0,864606142
P4HA1	1,539334792	0,2348454
GULP1	1,536633847	-0,76962018
XAB2	1,53213016	0,14867115
ATXN7L3B	1,52979546	1,067910194
FHL2	1,524616182	0,350688457
SULT1A4;SULT1A3	1,518938582	-0,65493989
MRPL23	1,517050172	0,298303843
NR3C1	1,510825582	-0,347571135
TPD52-MRPS28	1,508050497	-0,176797867
MRPS9	1,50744324	-0,129551172
MRPL17	1,505015183	-0,158370972
SIGMAR1	1,501362385	1,186355352
SERPINA1	1,498222942	-1,116747141
SELO	1,492855562	0,1860075

Fortsetzung auf nächster Seite

Gene Name	-Log Student's T-test p-value KO_WT	Student's T-test Difference KO_WT
VDAC1	1,482205478	0,19010663
ANXA7	1,480108046	-0,169052362
HDAC7	1,471667385	0,687697649
OAS3	1,465387361	1,548482895
ATG3	1,452975192	0,160479546
COX19	1,452463293	-1,15449357
HNRNPDL	1,452372942	0,162646294
CKMT1A;CKMT1B	1,45232666	0,246039629
GTF3C2	1,449333165	0,264581203
STAU1	1,448569601	0,232871771
DYNC1L1	1,446630817	0,099825382
FBXW8	1,444864774	-1,079440832
EIF3L	1,437085952	-0,127988577
CRTAP	1,436811385	0,212017775
01. Sep	1,430821831	0,071410418
ISG15	1,426389776	1,670872211
MTA3	1,418488754	0,327103615
HYOU1	1,412414584	0,161562443
MED15	1,411085822	0,458683729
HAUS8	1,410983102	1,676617384
LSM6	1,408672512	0,25652051
ACBD6	1,408490004	0,328566313
TBC1D22A	1,40844304	-0,244204044
IFIT1	1,408387838	3,656189203
SPTBN1	1,403246018	0,117238045
ADD2	1,403106912	0,350633621
DARS	1,391370516	0,096015453
GNB2L1	1,391114759	0,157297134
TAGLN3	1,386809595	-0,421796083
UBE2L6	1,383543451	0,68292141
CLASP1	1,38218586	0,108420372
PLS3	1,378396417	0,100283623
ABR	1,378130634	0,184726238
OSTF1	1,37619787	0,345176697
COL4A3BP	1,37590013	-0,105401754
MRPL20	1,375362543	-0,299898386
ARHGAP5	1,374901364	-0,289968491
DARS2	1,374507952	-0,199062586
POLR2A	1,374392102	-0,082486629
GLDC	1,373710854	-0,34001565

Fortsetzung auf nächster Seite

Gene Name	-Log Student's T-test p-value KO_WT	Student's T-test Difference KO_WT
PRPF40A	1,371391294	-0,097417831
PARP9	1,371236156	1,320933819
NUP205	1,370520614	0,081990004
MRPS27	1,370469351	-0,122970581
LAMP2	1,369600385	0,175982952
FN3KRP	1,368744875	-0,370791197
SRP14	1,36834499	-0,187284231
AP1G2	1,366296581	0,258535624
ZC3H11A	1,365018936	-0,942476749
SNX2	1,363761159	0,099203825
FAF1	1,360985193	0,121044159
AGRN	1,358758169	0,427500486
PEX19	1,358714616	0,399247169
IXL;MED29	1,358108558	0,318353653
HLA-C	1,354759374	0,892250299
RAB18	1,352605581	0,180249214
TAX1BP3	1,350437043	0,214099884
ACO1	1,350157614	-0,368767738
RSU1	1,348670037	-0,083899736
LTN1	1,348445823	0,293031216
ATP6V0A1	1,347161669	-0,259061575
COX17	1,344254423	-0,329549313
PYGL	1,341130159	0,148844242
FOXRED1	1,339263648	-0,196592093
SPATA5	1,338180178	0,284444332
ARL3	1,333858642	-0,204601049
TAP1	1,325381281	0,303112268
ODR4	1,32459495	-1,167055607
SWAP70	1,324124079	0,144488096
FAM83H	1,322365691	0,45666647
PATL1	1,319534544	0,128729105
PDXK	1,31811487	-0,116608381
PELP1	1,314727803	0,146558523
ZFAND1	1,311046462	0,658294678
CDK2	1,310139211	0,136630058
EPHX2	1,30783693	-0,459846735
LUZP1	1,307724333	0,239953518
CRIP1	1,304149247	-0,319126368
NUPR1	1,301356604	-0,861297369
SPG20	1,301348684	0,16523385
NIPBL	1,301082492	-0,154345751

Tabelle 1: Regulierte Proteine in NPHP1-defizienten Zellen

4.4 Eine mittels CRISPR/Cas9 generierte *Nphp1* defiziente Mauslinie zeigt keinen offensichtlichen renalen Phänotyp

Für die Generierung des KO von *Nphp1* in Mäusen (C57BL/6) wurde eine für Exon 1 spezifische sgRNA verwendet (Abbildung 6A). Anhand der Tabelle (Abbildung 6B) ergibt sich eine zunächst eine Geburtenrate von 14% und eine prozentualer Anteil der tatsächlich aufgezogenen Tiere der F₀-Generation (1. genmodifizierte Generation als Ausgangsgeneration für Verpaarungen untereinander) an der Gesamtzahl injizierter Embryonen von 5,9%. Es wurde unter anderem ein KO von *Nphp1* in Exon 1 durch eine 74 bp Deletion generiert, die das Start-Codon mit einschließt. Die Sequenzierung (Abbildung 6C) zeigt den KO auf DNA Ebene. Im weiteren wurde der KO auf Proteinebene verifiziert. Für einen Westernblot wurden Nierenlysate geladen. Es zeigt sich für die *Nphp1*^{+/+} Maus eine Bande für Nphp1 bei ca. 100 kDa, wohingegen eine solche Bande bei der *Nphp1*^{-/-} Maus fehlt (Abbildung 6D).

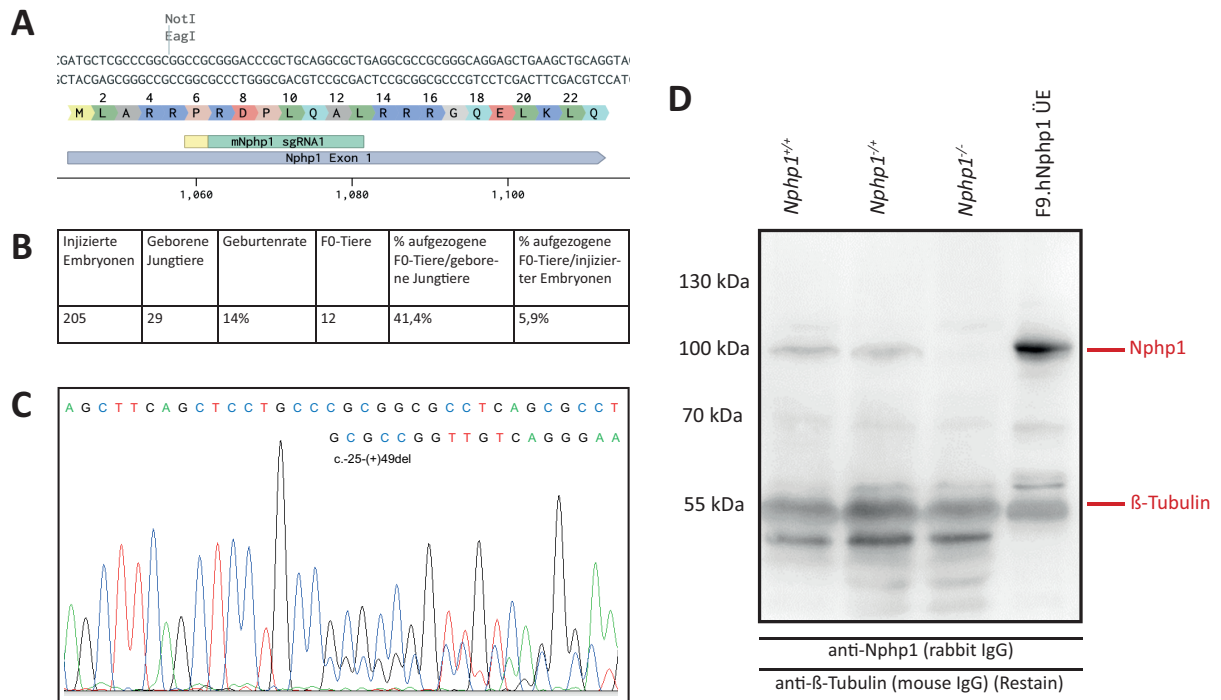


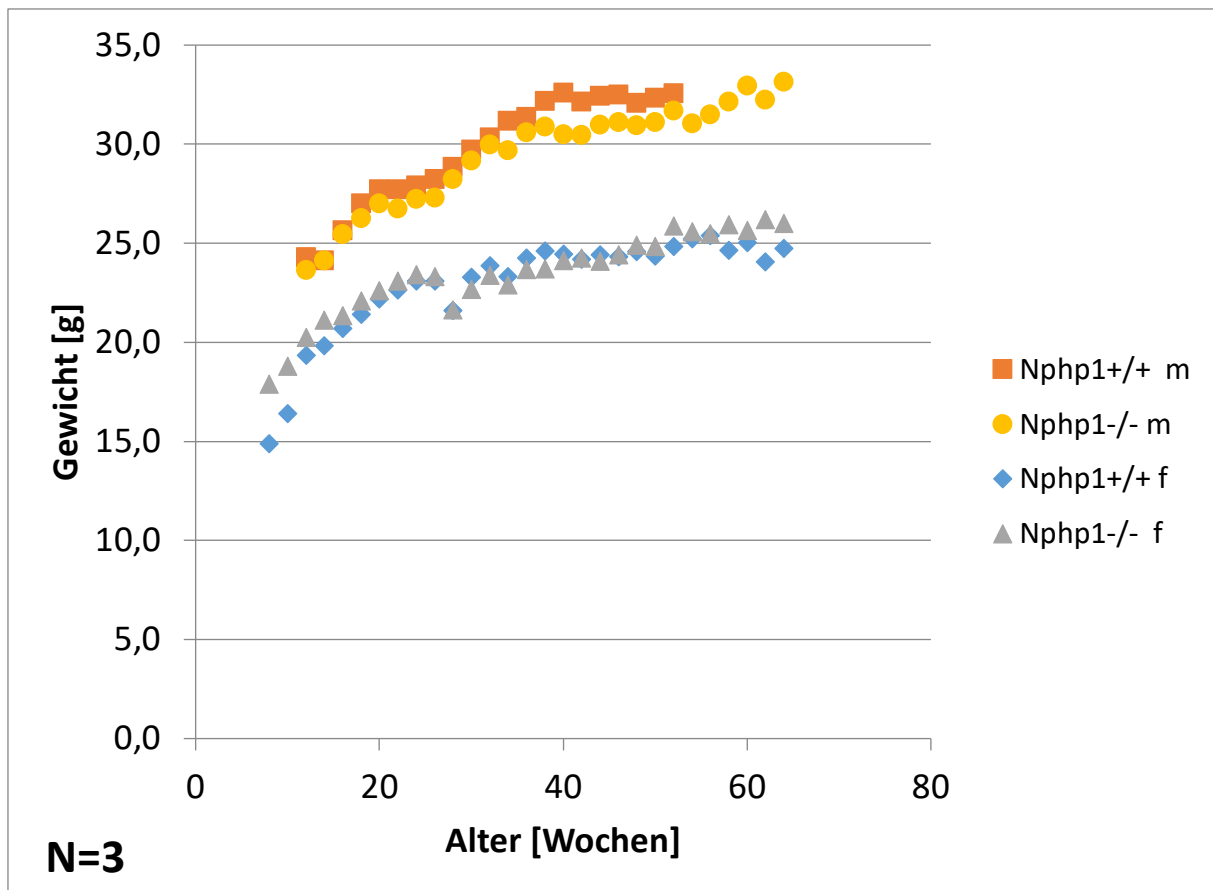
Abbildung 6: Bestätigung des *Nphp1* KO auf DNA und Proteinebene in der Maus.

A. Design der sgRNA für den Crispr/Cas9 induzierten KO in Exon 1 von *Nphp1*. **B. 5,9 % der injizierten Embryonen werden zur F₀-Generation.** Für die Generierung der *Nphp1* defizienten Mauslinie wurde eine für Exon 1 spezifische sgRNA wie unter 4.15.2 aufgeführten Bedingungen injiziert. Insgesamt wurden 205 Embryonen injiziert, woraus 29 Jungtiere hervorgingen (Geburtenrate 14%). Von den geborenen Jungtieren, konnten 41,4 % als F₀-Generation aufgezogen werden, was einer absoluten Zahl von 12 F₀-Tieren entspricht. Damit wurden 5,9% der injizierten Embryonen zu Tieren der F₀-Generation. **C. Der KO von *Nphp1* in Exon 1 in Mäusen wird auf DNA Ebene bestätigt.** Die Generierung der *Nphp1* KO Mauslinie erfolgte mit einer für Exon 1 spezifischen sgRNA (4.15.1/2.). Abgebildet ist die *Nphp1*^{+/+} Sequenz im Vergleich zur Sequenzierung einer der *Nphp1*^{-/-} F₀ Mäuse. Die 74 bp Deletion schließt das Start-Codon ein und führt somit zum KO von *Nphp1*. **D. Die *Nphp1* Defizienz dieser Mauslinie wird auf Proteinebene bestätigt.** Nierenlysate von *Nphp1*^{+/+}, *Nphp1*^{+/-} und *Nphp1*^{-/-} Tieren wurden mittels Westernblot analysiert. Als Kontrolle diente das Lysat von F9.hNPHP1 überexprimierenden HEK 293T Zellen. Der Westernblot wurde zunächst mit anti-Nphp1 AK (rabbit IgG) angefärbt. Die F9.hNPHP1 HEK 293T Zellen zeigen eine starke Bande für NPHP1 bei 100 kDa (Spur 4). Für die *Nphp1*^{+/+} Maus (Spur 1) und die *Nphp1*^{+/-} Maus zeigen sich ebenfalls jeweils schwächere Banden bei 100 kDa. Für die *Nphp1*^{-/-} Maus (Spur 3) zeigt sich keine Bande. Im Restain mit einem anti-β-Tubulin AK(rabbit IgG) zeigen sich in allen Spuren deutliche, gleichmäßige Banden für Tubulin bei 55 kDa, sodass technische Fehler und signifikante Proteinverluste ausgeschlossen werden können. Der KO von *Nphp1* in der Maus ist somit auf Proteinebene bestätigt.

4.5 Die *Nphp1* KO Mauslinie entwickelt keinen Phänotyp

Um ggf. ein Korrelat des klinischen Phänotyps der NPH zu zeigen, wurde die *Nphp1*^{-/-} Mauslinie auf einen möglichen makroskopischen und mikroskopischen Phänotyp untersucht (Generation F3 und folgende). Abbildung 7 zeigt, den Gewichtsverlauf der *Nphp1*^{+/+} und der *Nphp1*^{-/-} Mäuse über einen Zeitraum von 12 bis 62 Wochen. Hier zeigt sich, dass es keinen deutlichen Unterschied innerhalb der Geschlechtergruppen von *Nphp1*^{+/+} und der *Nphp1*^{-/-} Mäusen gibt. Für die Zeitpunkte 14, 36 und 52 Wochen wurden jeweils der Mittelwert, die Varianz und basierend darauf ein zweiseitiger t-Test zum alpha Niveau 0,05 durchgeführt. Hier zeigt sich, dass ausgehend von der Null-Hypothese („Es gibt keinen Gewichtsunterschied“), sowohl bei den weiblichen, als auch bei den männlichen Tieren, diese nicht verworfen werden kann, und somit kein signifikanter Gewichtsunterschied besteht (p-Wert > 0,05).

Zur weiteren Charakterisierung wurden PAS-Färbungen von Nieren- und Lebergewebe der ältesten Versuchstiere angefertigt. Die Tiere weisen im Alter von 29,5 Monaten keinen histologischen Phänotyp auf. Sowohl die Nieren, als auch die Leber sind frei von zystischen und fibrotischen Veränderungen. Zudem zeigen die Nieren eine normal konfigurierte Tubuli und Glomeruli (Abbildung 8 u. 9)



Alter [Wochen]	14				36				52			
	f		m		f		m		f		m	
	Nphp1+/+	Nphp1-/-	Nphp1+/+	Nphp1-/-	Nphp1+/+	Nphp1-/-	Nphp1+/+	Nphp1-/-	Nphp1+/+	Nphp1-/-	Nphp1+/+	Nphp1-/-
Mittelwert [g]	19,8	21,1	24,1	24,1	24,3	23,7	31,4	30,6	24,8	25,9	32,6	31,7
Varianz	1,3	0,6	1,0	1,3	0,1	0,6	3,9	0,9	0,4	0,4	3,7	2,7
P-Wert	0,087		0,500		0,142		0,288		0,059		0,293	

Abbildung 7: Die *Nphp1* KO Mäuse zeigen keinen Gewichtsunterschied.

Auf der y-Achse wurde das Gewicht in g gegen das Alter in Wochen aufgetragen. Verglichen wurden jeweils 3 weibliche und männliche *Nphp1^{+/+}* Mäuse mit jeweils 3 männlichen und weiblichen *Nphp1^{-/-}* Mäusen. Aus der Berechnung der P-Werte in einem zweiseitiger T-Test zum Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ geht hervor, dass in allen Fällen (exemplarisch die Wochen 14, 36 und 52) kein signifikanter Gewichtsunterschied besteht, da der P-Wert $> 0,05$ beträgt.

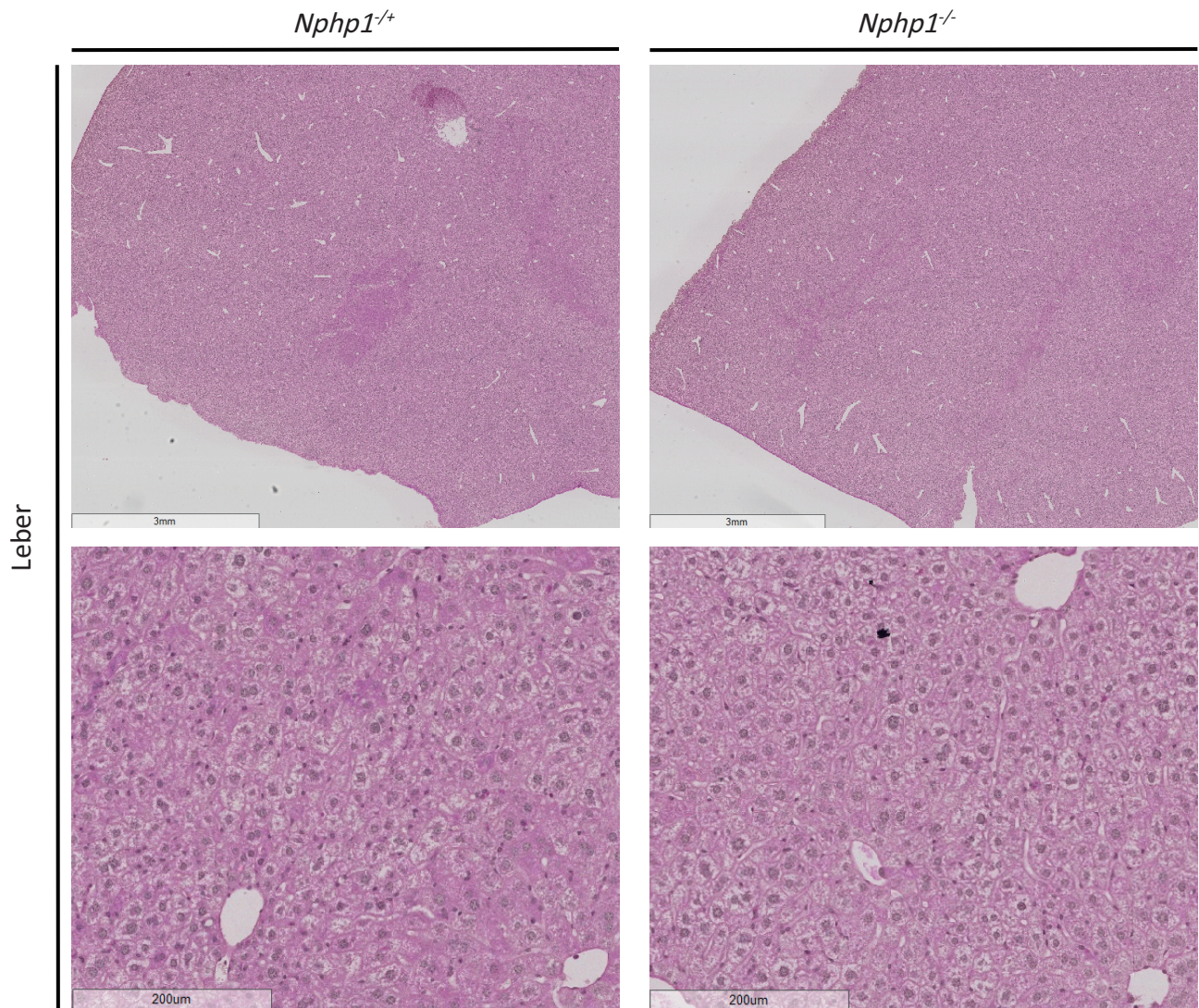


Abbildung 9: Die Leber von *Nphp1*^{-/-} und *Nphp1*^{+/+} Mäusen zeigen eine normale Morphologie.

Es wurden PAS-Färbungen der Leber einer *Nphp1*^{-/-} Maus und einer *Nphp1*^{+/+} Maus angefertigt. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Organentnahme jeweils 29,5 Monate alt. In der Übersicht zeigen sich keine zystischen Veränderungen der Leber. Die Vergrößerung der Leber zeigt die normale Leberzellmorphologie und keinen Hinweis auf Fibrosierung.

4.6 Die Aufreinigung und Quantifizierung monoklonaler anti-Nphp1 AK

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden Überstände von Hybridomazellen dreier Klone, die anti-Nphp1 AK produzieren, aufkonzentriert und aufgereinigt. Die Elution von den Protein-G Beads erfolgte dabei in verschiedenen Fraktionen. Für die Verwendung in den folgenden Experimenten musste zunächst deren Konzentration näherungsweise bestimmt werden. Dazu wurden die Antikörper mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Coomassiefärbung visualisiert. Auf den drei Gelen A, B und C (Abbildung 10) sind jeweils in den Referenzspuren mit je 1 µg und 5 µg BSA die Banden wie zu erwarten auf Höhe von ca. 70 kDa erkennbar. BSA dient nur zur quantitativen Abschätzung. Daneben wurden für den anti-Nphp1 #62 AK 11 Fraktionen geladen (Abbildung 10A), für den anti-Nphp1 #30 AK 9 Fraktionen (Abbildung 10B) und für den anti-Nphp1 #19 AK 9 Fraktionen (Abbildung 10C). Die Anzahl der Fraktionen variiert dabei mit der Konzentration des jeweiligen Produktes aus der Antikörperfällung. Auf allen 3 Gelen zeigen sich Banden auf Höhe von ca. 55 kDa, welche den Heavy Chains der Antikörper entsprechen. Für die Light Chains zeigen sich jeweils bei 25 kDa die entsprechenden Banden. Die schwächere Bande bei ca. 60kD entspricht höchstwahrscheinlich IgG vom Rind und stammt aus dem FBS des Überstands. Die Stärke der Banden ist hierbei von der Konzentration des AK in der jeweils geladenen Probe abhängig.

Die Abschätzung der ungefähren Konzentration jeder Antikörper Fraktion erfolgte dann anhand des Vergleichs zwischen den Referenzbanden BSA und den Banden auf Höhe von 55 kDa jeder einzelnen Fraktion. Für die Berechnung war zu berücksichtigen, dass jeweils 10 µl je Probe geladen wurden (5 µl jeder Fraktion + 5 µl Laemmli). Es ergaben sich folgende näherungsweise bestimmte Konzentrationen (Tabelle 2).

Konzentration in µg/µl											
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11
anti-Nphp1 #19	0,05	0,1	0,5	0,1	0,08	0,05	0,05	<0,05	<0,05	-	-
Anti-Nphp1 #30	0,05	0,1	0,5	0,1	0,08	0,05	0,05	0,05	<0,05	-	-
Anti-Nphp1 #62	0,05	0,05	0,05	0,1	1	1	0,5	0,5	0,1	0,1	0,05

Tabelle 2: Näherungsweise bestimmte Konzentrationen der anti-Nphp1 AK

Wie schon durch die Anzahl der Fraktionen und durch die Stärke der Banden zu erkennen, hatte der anti-Nphp1 #62 AK die höchste Konzentration. Für die weiteren Experimente wurden jeweils 3-4 Eluate mit dem höchsten Gehalt an AK gepoolt.

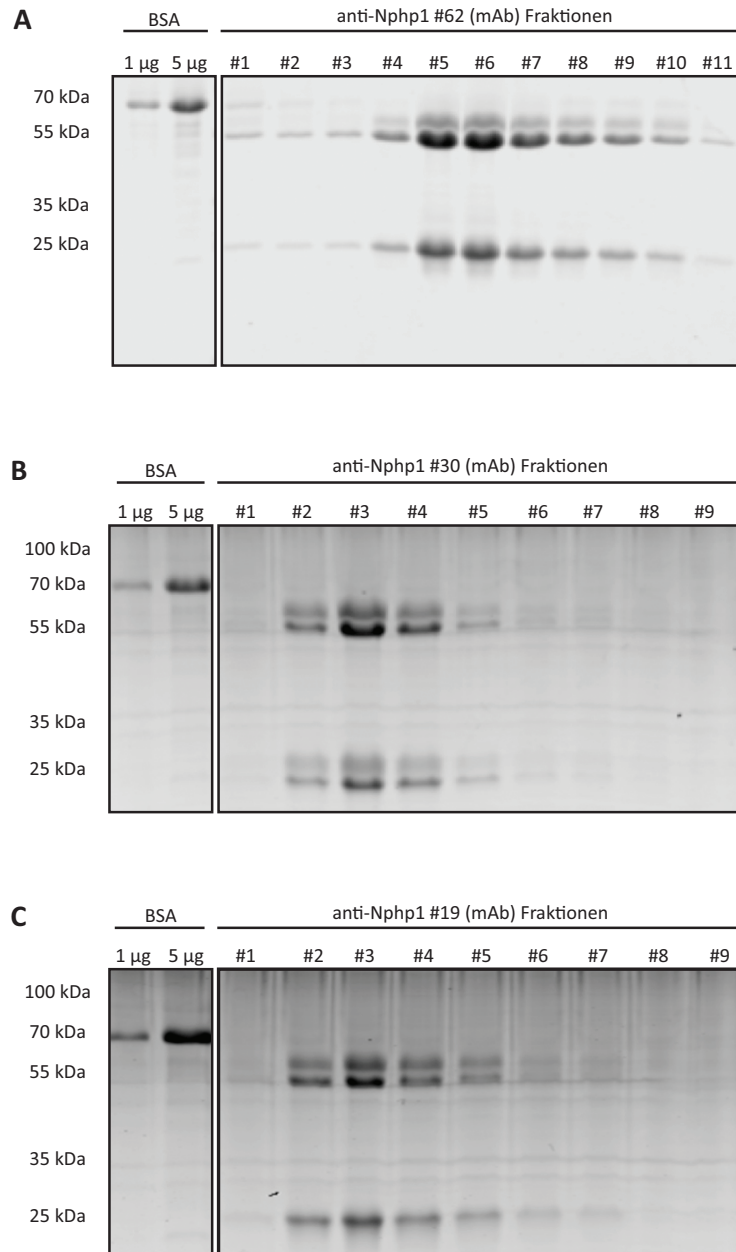


Abbildung 10: In der Quantifizierung der anti-Nphp1 AK zeigen sich für die Subklone #19, #30 und #62 jeweils unterschiedlich starke Konzentrationen.

A. Der aufgereinigte anti-Nphp1 #62 AK zeigt die stärkste Konzentration. Es wurden 11 Fraktionen des anti-Nphp1 #62 AK neben zwei Referenzproben BSA (je 1 µg und 5 µg) auf ein PAA Gel geladen und mittels Coomassie Blue gefärbt. Die Referenzspuren zeigen sich bei ca. 70 kDa (Spur 1-2). Daneben wurden 11 Fraktionen des anti-Nphp1 #62 AK geladen (Spur #1-#11). Bei ca. 25 kDa zeigt sich jeweils die leichte Kette, die schwere Kette, die als Grundlage für die geschätzte Quantifizierung dient, zeigt sich bei ca. 55 kDa. **B. Der anti-Nphp1 #30 AK zeigt eine geringere Konzentration.** Von dem anti-Nphp1 #30 AK wurden 9 Fraktionen (Spur #1-#9) neben zwei Referenzproben (Spur 1-2) (s.o.) geladen. Die zu sehenden Banden sind entsprechend wie in Abbildung 10A zu werten. **C. Der anti-Nphp1 #19 AK zeigt ebenfalls eine geringere Konzentration.** Von dem anti-Nphp1 #19 AK wurden ebenfalls 9 Fraktionen (Spur #1-#9) neben zwei Referenzproben (Spur 1-2) (s.o.) geladen. Es zeigt sich eine geringere Konzentration des anti-Nphp1 #19 AK und eine höhere Konzentration im Vergleich zu #30.

4.7 Positive Testung der anti-Nphp1 AK für Immunopräzipitation in Zellen bei überexprimiertem und endogenem Nphp1

Die gereinigten anti-Nphp1 AK #19, #30 und #62 wurden auf ihre Wirksamkeit für IP und zu Anfärbung im Westernblot getestet. Die Testung erfolgte zunächst in HEK 293T Zellen, die F9.hNPHP1 überexprimierten. Die anti-Nphp1 AK #19, #30 und #62 wurden jeweils für die IP verwendet und der Westernblot anschließend mit dem anti-Nphp1 #19 AK angefärbt. Es zeigt sich zunächst die Wirksamkeit des für die Anfärbung verwendeten anti-Nphp1 #19 AK, sowohl für endogenes NPHP1 und überexprimiertes NPHP1 (Lysat) als auch bei immunopräzipitiertem NPHP1. Darüberhinaus zeigt sowohl der anti-Nphp1 #19 AK, als auch der anti-Nphp1 #30 und #62 AK eine gute Interaktion mit überexprimiertem NPHP1 in der IP. Die Banden für NPHP1 bei ca. 100 kDa zeigen gegenüber dem Lysat und der Negativkontrolle eine deutlichere Anreicherung. Das Lysat zeigt gegenüber der Negativkontrolle ebenfalls eine deutliche Bande (Abbildung 11A).

Im Vergleich zeigt sich in der IP mit dem anti-Nphp1 #62 AK die deutlichste Anreicherung, sodass für die weiteren IP-Experimente der Antikörper anti-Nphp1 #62 ausgewählt wurde. Mit diesem wurde dann die IP in HKC8 Zellen durchgeführt. Hier wurden immer jeweils zwei 10 cm Schalen mit Zellen eingesetzt (HEK 293T je eine 10 cm Schale).

Als Negativkontrolle dienten bei den HKC8 Zellen *NPHP1* KO Zellen. In der IP wurde je eine Zelllinie mit einem KO in Exon 1 (1#25) und Exon 6 (6#11) verwendet (wie 5.1.2), sowie HKC8 wt Zellen. In den Lysaten der wt und KO Zellen zeigen sich keine Banden bei 100 kDa (Abbildung 11B). In der wt IP zeigt sich jedoch eine deutliche Bande für NPHP1 bei 100 kDa. In den KO IPs zeigen sich keine klaren Banden. Die bandenähnlichen Strukturen werden in diesem Fall eher als Hintergrund gewertet. Die Wirksamkeit der gereinigten anti-Nphp1 AK wird aufgrund der Ergebnisse sowohl für überexprimiertes, als auch für endogenes NPHP1 in IP und Westernblot als bestätigt angesehen. Darüberhinaus haben die Experimente gezeigt, dass die murinen anti-Nphp1 AK humanem (HEK 293T/HKC8) NPHP1 gut interagieren.

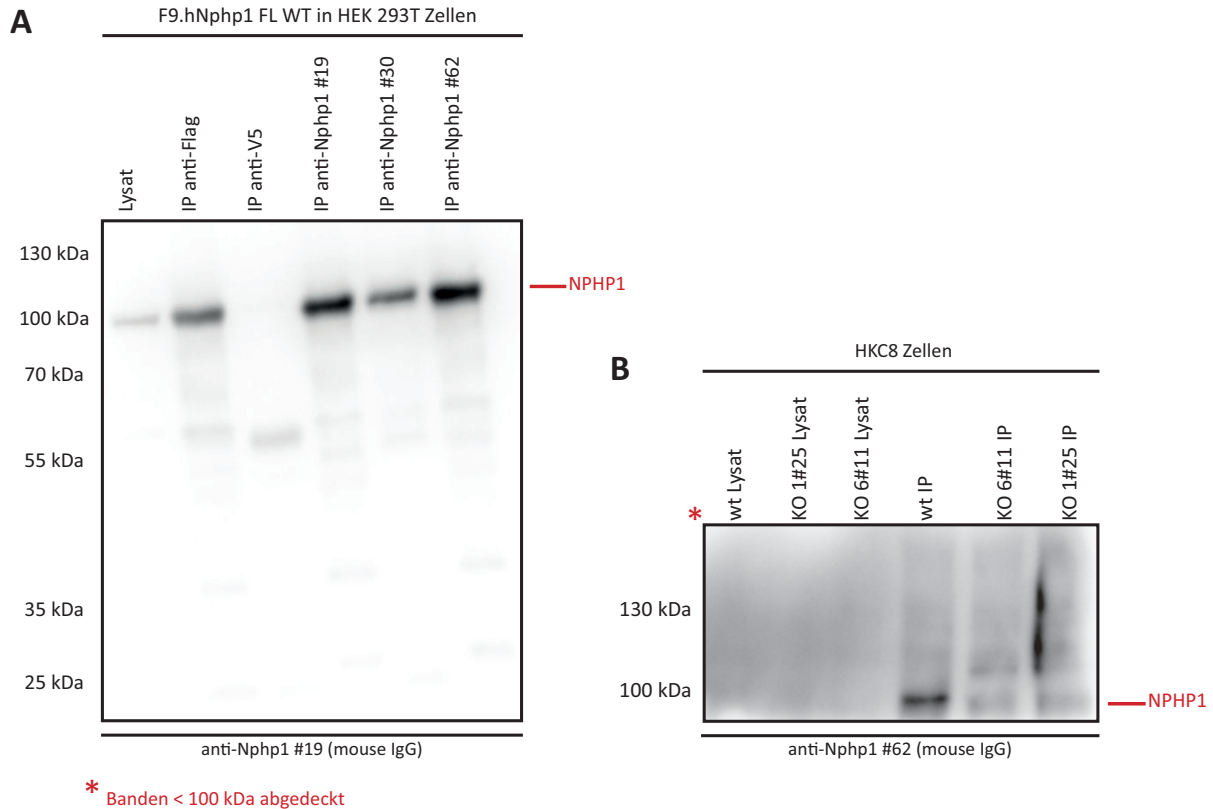


Abbildung 11: Die aufgereinigten anti-Nphp1 AK immunopräzipitieren überexprimiertes und endogenes NPHP1.

A. Die anti-Nphp1 #19/30/62 AK immunopräzipitieren überexprimiertes NPHP1. HEK 293T Zellen wurden mit F9.hNPHP1 transfiziert und die IP mit den anti-Nphp1 #19/30/62 AK, einem anti-Flag AK als Positivkontrolle und einem anti-V5 AK als Negativkontrolle durchgeführt. Die Anfärbung des Westernblots erfolgte mit anti-Nphp1 #19 IgG. Im Lysat (Spur 1) und der IP mit dem anti-Flag AK (Spur 2) zeigen sich Banden für NPHP1 bei ca.100 kDa. Die mit anti-V5 durchgeführte IP (Spur 3) zeigt keine Bande für NPHP1. Die IPs mit den anti-Nphp1 #19/30/62 AK zeigen Banden für NPHP1 bei 100 kDa (Spur 4-6) sodass von einer guten Interaktion der AK mit überexprimiertem NPHP1 ausgegangen werden kann. **B. Die anti-Nphp1 #62 AK immunopräzipitieren mit endogenem NPHP1 in HKC8 Zellen.** Es wurde eine IP mit den anti-Nphp1 #62 AK in HKC8 wt Zellen und zwei KO Linien durchgeführt. Die Anfärbung des Westernblots erfolgte mit anti-Nphp1 #62 AK und Banden < 100 kDa abgedeckt. In den Lysaten (Spur 1-3) zeigen sich keine Banden. Die wt IP (Spur 4) zeigt eine deutliche Bande für NPHP1 bei 100 kDa. Die KO IPs (Spur 5 u. 6) zeigen ebenfalls ein schwaches Signal bei 100 kDa, jedoch keine eindeutige Bande.

4.8 Der anti-Nphp1 #62 Antikörper bestätigt die Lokalisation von NPHP1 an der Zilienbasis von HKC8 Zellen

Um die Lokalisation von NPHP1 in den Zellen von HKC8 Zellen zu zeigen und diese mit den KO Zellen zu vergleichen, um die Spezifität zu zeigen, wurde der anti-Nphp1 #62 AK zusätzlich für Immunfluoreszenzfärbungen getestet und konnte die erwartete Lokalisation von NPHP1 an der ziliären Basis zeigen. Abbildung 12 zeigt für die HKC8 wt Zellen NPHP1 als Punkt an der Zilienbasis, welcher bei den HKC8 NPHP1 KO Klonen 1#25 und 6#11 nicht zu sehen ist.

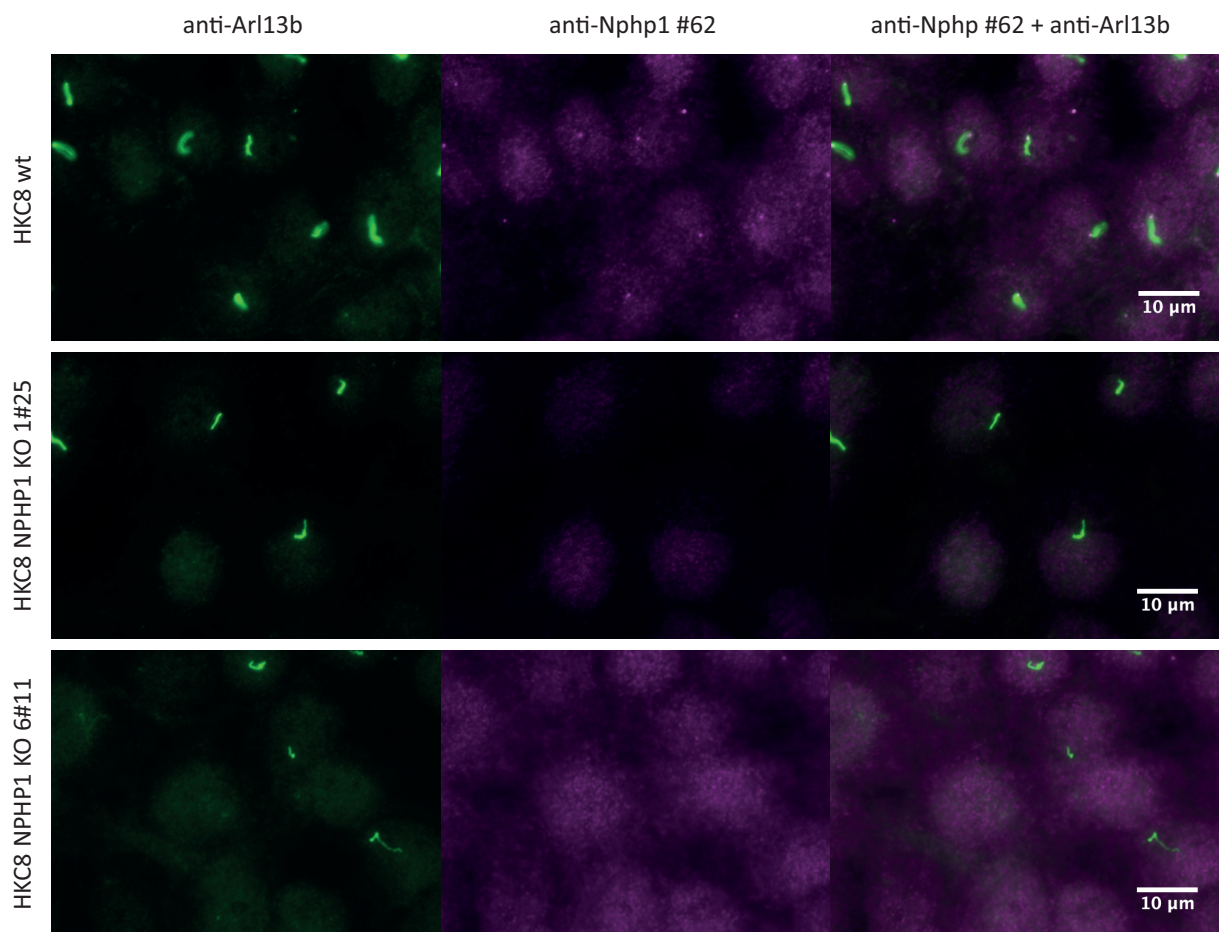


Abbildung 12: Der anti-Nphp1 AK weist NPHP1 an der Zilienbasis in HKC8 Zellen nach.

Es wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit den HKC8 wt Zellen und den beiden NPHP1 KO Klonen 1#25 und 6#11 durchgeführt. Die Anfärbung erfolgte jeweils mit anti-Arl13b+Alexa Fluor 488 (grün) zur Markierung der Zilien und anti-Nphp1 #62+Cy3 (magenta). Das Staining der wt Zellen zeigt sowohl Zilien, als auch NPHP1 als Punkt an der Zilienbasis. Bei den Stainings der KO Zellen zeigen sich ebenfalls Zilien, jedoch bleibt der Nachweis von NPHP1 aus.

4.9 Austestung der IP Konditionen mit anti-Nphp1 #62 AK an Mausgewebe zeigt gute Immunopräzipitation von Nphp1 in Hoden und Nieren

Für die geplanten Gewebeanalysen Nphp1 defizienter Mäuse mittels nLC-MS/MS wurden zunächst die für Zellen (5.5) bereits etablierten IP-Konditionen mit Hoden und Nieren von jeweils 8 Wochen alten Mäusen (*Nphp1^{+/+}*, *Nphp1^{-/+}*, *Nphp1^{-/-}*) getestet. Die Ergebnisse der entsprechenden Westernblots sind in Abbildung 13 dargestellt.

In den Ergebnissen des Experiments mit den Mäusehoden zeigen die Lysate zunächst keine Banden für Nphp1. Die *Nphp1^{+/+}* und *Nphp1^{-/+}* IPs zeigen bei längerer Belichtung jeweils schwache Banden für Nphp1 bei 100 kDa (Abbildung 13A). Im anschließend durchgeführten Restain des Westernblots mit einem kommerziellen anti-Nphp1 AK zeigen sich in den Lysaten der *Nphp1^{+/+}* und *Nphp1^{-/+}* Mäusehoden jeweils schwache Banden und in den entsprechenden IPs der *Nphp1^{+/+}* und *Nphp1^{-/+}* Hoden zeigen sich deutliche Banden für Nphp1 (Abbildung 13A). Die IP wurde unter gleichen Konditionen zusätzlich mit Mäusenieren durchgeführt und der Westernblot ebenfalls zunächst mit anti-Nphp1 #62 AK angefärbt. Hier zeigt sich lediglich bei längerer Belichtung eine schwache Bande für Nphp1 im *Nphp1^{+/+}* Lysat. Die übrigen Lysate, sowie die IPs zeigen keine eindeutigen Banden (Abbildung 13B). Zusätzlich zur Bande im *Nphp1^{+/+}* Lysat zeigen sich nun schwache Banden in den *Nphp1^{+/+}* und *Nphp1^{-/+}* IPs (Abbildung 13B).

Die Experimente zeigen somit, dass es mittels des aufgereinigten anti-Nphp1 #62 AK möglich ist Nphp1 aus Mausgewebe zu präzipitieren. Vergleicht man die Westernblots von Hoden und Nieren miteinander fällt auf, dass die Banden für Nphp1 in der IP mit den Hoden deutlich stärker sind. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass der kommerziell erhältliche anti-Nphp1 AK (rabbit IgG) dem aufgereinigten anti-Nphp1 #62 AK in der Anfärbung des Westernblots in seiner Wirksamkeit deutlich überlegen ist.

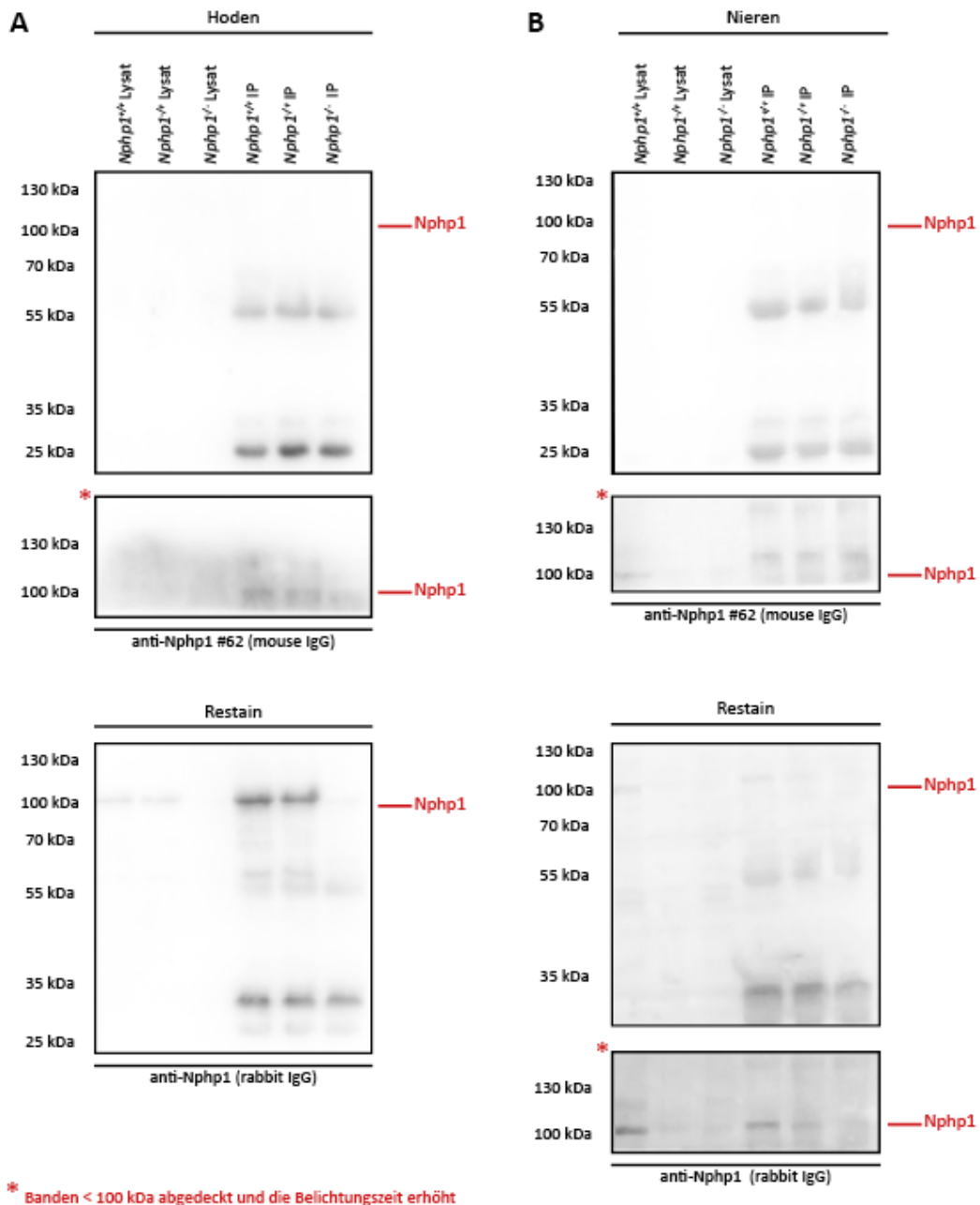


Abbildung 13: Der anti-Nphp1 #62 AK immunopräzipitiert Nphp1 aus Nieren und Hoden von Mäusen.

A. Der anti-Nphp1 #62 AK zeigt schwache Wirkung im Westernblots der IP mit Mäuse Hoden. Die IP mit Hoden von *Nphp1*^{+/+}, *Nphp1*^{+/-} und *Nphp1*^{-/-} Mäusen wurde mit dem anti-Nphp1 #62 AK durchgeführt und der Westernblot mit diesem angefärbt. In den Lysaten (Spur 1-3) sind jeweils keine Banden für Nphp1 zu sehen. Die *Nphp1*^{+/+} und *Nphp1*^{+/-} IP (Spur 4-5) zeigen jeweils schwache Banden für Nphp1(100 kDa) nach Abdeckung der Banden <100 kDa. Die *Nphp1*^{-/-} IP zeigt keine. In den IPs sind jeweils bei 55 kDa/25 kDa die Heavy/Light Chains der Antikörper sichtbar. Der Restain mit dem anti-Nphp1 AK (rabbit IgG) zeigt in den *Nphp1*^{+/+} und *Nphp1*^{+/-} Lysaten (Spur 1-2) jeweils schwache Banden und in den entsprechenden IPs (Spur 4-5) jeweils deutliche Banden für Nphp1. Die *Nphp1*^{-/-} Lysat und IP bleiben ohne Bande für Nphp1. **B. Der anti-Nphp1 #62 AK zeigt schwache Wirkung in der Anfärbung des Westernblots der IP mit Mäuse Nieren.** Die IP mit den Nieren von *Nphp1*^{+/+}, *Nphp1*^{+/-} und *Nphp1*^{-/-} Mäusen wurde wie in 3A durchgeführt. Hier zeigt sich nur im *Nphp1*^{+/+} Lysat (Spur 1) nach Abdeckung der Banden <100 kDa eine leichte Bande für Nphp1. In den restlichen Lysaten (Spur 2-3) und IPs (Spur 4-6) zeigen sich keine Banden für Nphp1. In den IPs zeigen sich wieder die Antikörperbanden (s. 3A). Der Restain mit dem anti-Nphp1 AK (rabbit IgG) zeigt im Vergleich zu 3A im *Nphp1*^{+/+} Lysat (Spur 1) und den *Nphp1*^{+/+} und *Nphp1*^{+/-} IPs (Spur 4-5) jeweils schwache Banden für Nphp1. Nach Abdeckung der Banden <100 kDa werden diese deutlicher.

4.10 Nphp1 lässt sich in den Hoden der *Nphp1*^{-/-} Mäuse mittels Massenspektrometrie nicht nachweisen

Aufbauend auf den IPs aus 5.7 wurde zu gleichen Konditionen erneut eine IP mit Hoden von *Nphp1*^{-/-} und *Nphp1*^{+/+} Mäusen durchgeführt und diese im Anschluss mittels Massenspektrometrie analysiert. Da nach dem in Gel Digest (SDS Page Gel) jeweils knapp unter der 100 kDa Bande eine weitere Bande sichtbar war, wurden jeweils beide einzeln analysiert. Zur Quantifizierung wurde der iBAQ (engl.: intensity Based Absolute Quantification) errechnet. Für den iBAQ wird die Summe aller Intensitäten eines Proteins durch die Anzahl der theoretisch möglichen Peptide nach dem Verdau geteilt, sodass der Wert nicht durch die Größe der jeweiligen Proteine beeinflusst wird. Die Ergebnisse zeigen, dass Nphp1 deutlich in den Hoden der *Nphp1*^{+/+} Mäuse nachweisbar ist (höhere Anreicherung in der 100 kDa Bande), wohingegen in den Hoden der *Nphp1*^{-/-} Mäuse keine Expression nachweisbar war. Ausgehend von dem ersten Testlauf lässt sich sagen, dass die IP Konditionen mit dem anti-Nphp1 #62 AK für die Analyse mittels Massenspektrometrie geeignet sind.

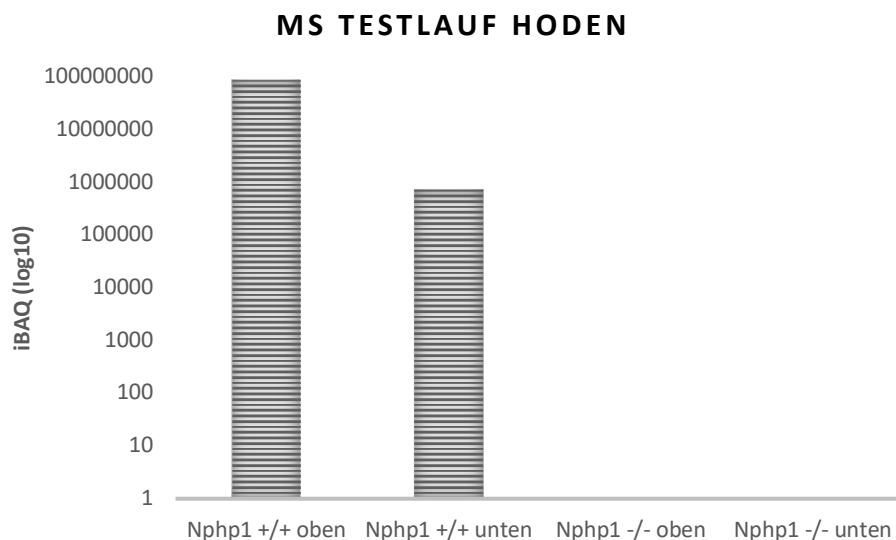


Abbildung 14 Kein Nachweis von Nphp1 mittels MS in den Hoden der *Nphp1*^{-/-} Mäuse.

Mit den Hoden einer *Nphp1*^{-/-} und einer *Nphp1*^{+/+} Maus wurde die IP wie für 5.7 durchgeführt und mittels In gel Digest für die MS-Analyse aufbereitet. Es wurden die Banden bei 100 kDa („oben“) und knapp darunter („unten“) ausgeschnitten. Das Diagramm zeigt jeweils die iBAQ Werte für Nphp1 von den *Nphp1*^{+/+} und *Nphp1*^{-/-} Mäusen. Nphp1 ist mit Werten von 8.5371.000 und 730.810 in den beiden Banden der *Nphp1*^{+/+} Maus deutlich nachweisbar, in der *Nphp1*^{-/-} Maus ist kein Nphp1 im Hoden nachweisbar.

4.11 Das Nphp1 Interaktom aus Mausnieren

Um molekulare Funktionen von Nphp1 besser zu verstehen, wurde basierend auf den vorherigen Tests (5.7 und 5.8) ein endogenes *in vivo* Interaktom erstellt. Hierzu wurden die Nieren der *Nphp1^{+/+}* und *Nphp1^{+/-}* Mäuse als Nphp1 exprimierend (s. Abbildung 13) gegenüber *Nphp1^{-/-}* Mäusen verwendet. Vier Nieren pro Gruppe wurden entsprechend aufbereitet (s. 4.11.3) und mittels MS analysiert. Für die Analyse wurden LFQ (engl. Label free quantification) Intensitäten verwendet. Die Daten wurden nach drei aus vier gültigen Werten in mindestens einer Gruppe gefiltert. In Abbildung 14A wird zunächst die hierarchische Clusteranalyse dargestellt, welche eine deutlich Clusterbildung von *Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}* und *Nphp1^{-/-}* zeigt. Um signifikante Interaktoren zu bestimmen, wurde ein zweiseitiger Students t-Test zum p-Level 0,05 durchgeführt. Im Scatterplot (Abbildung 14B) sind alle signifikanten Interaktoren (-log p-value >1.3, difference >0) in blau markiert. Insgesamt konnten so 154 signifikante mögliche Interaktoren von Nphp1 identifiziert werden. Ein Vergleich der Interaktoren mit den Proteinen der CiliaCarta Datenbank zeigt eine Übereinstimmung bei 6 Proteinen mit den dazugehörigen Genen *ARL6*, *DCTN3*, *DSTN*, *PFN2*, *RUVBL2*, *SLIRP* [52]. Zudem besteht mit dem Protein Lamin-A/C eine Übereinstimmung zwischen den hier gezeigten Interaktoren (s. Tabelle 3) und dem Interaktom von Sang et al [52]. Die GO-Termanalyse zeigt, dass NPHP1 über seine Interaktoren in vielfältige Signalwege involviert ist, z.B. Calcium-vermittelte Signalwege oder auch in das Spleißen von mRNA mittels Spleißosom (Abbildung 14C).

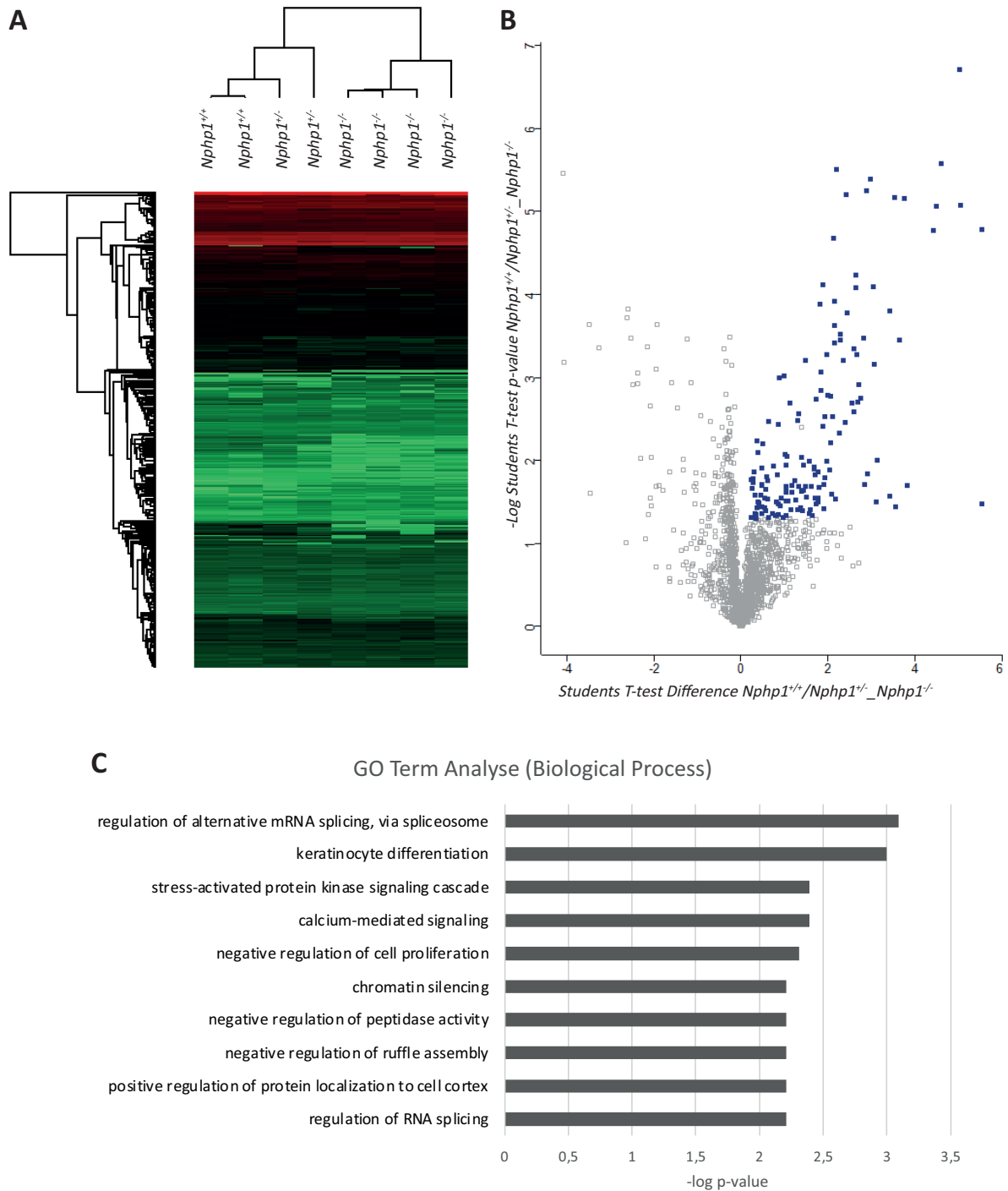


Abbildung 15: Interaktom von Nphp1 in Mäusen.

Verwendet wurden *Nphp1*^{+/+} und *Nphp1*^{+/-} Mäuse als *Nphp1* exprimierend gegenüber *Nphp1*^{-/-} Mäusen. **A.** Die hierarchische Cluster Analyse zeigt senkrecht die verwendeten Proben *Nphp1*^{+/+}/*Nphp1*^{+/-} und *Nphp1*^{-/-} und waagrecht die korrelierenden Proteine. Hohe Intensitäten werden in rot, niedrige Intensitäten werden in grün abgebildet. **B.** Vergleichende Analyse der Interaktoren in *Nphp1*^{+/+}/*Nphp1*^{+/-} und *Nphp1*^{-/-} Mäusen. Der Scatterplot zeigt die Abweichung im Students t-test von *Nphp1*^{+/+}/*Nphp1*^{+/-} vs *Nphp1*^{-/-} (x-Achse) geplottet gegen den negativen Logarithmus des p-values (y-Achse). Proteine mit einem log p-value > 1,3 gelten hier als signifikant, also als Interaktor. **C.** Graphische Darstellung der GO-Termanalyse (biologische Prozesse), in denen NPHP1 involviert ist (sortiert nach log p-value).

Gen Name	-Log Student's T-test p-value Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}	Student's T-test Difference Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}
Prdx4	1,48112	5,54655
Sfn	4,78219	5,53882
Mtnd4	5,07375	5,0509
Cstb	6,71279	5,03177
Fam151a	5,58023	4,59216
Plcg2	5,06305	4,50032
Psme4	4,77144	4,41659
Cox7a2	1,69696	3,83155
Dock8	5,15845	3,75151
H1f0	3,44893	3,63966
Cnpy2	1,44157	3,54978
Rpl23a	5,17238	3,53585
Srsf3	3,79844	3,42782
Npc2	1,5653	3,42035
Myl6	2,00384	3,13405
S100a10	1,49808	3,10836
Srsf5	3,16056	3,06763
Cox17	4,08841	3,053
Ap1m2	5,3884	2,97788
Cryab	1,84011	2,90285
Naga	5,24815	2,8798
Sypl1	1,70586	2,8335
Ahsa1	3,47726	2,81063
Fhit	2,74505	2,76058
Clint1	2,91638	2,71769
Crip1	2,70753	2,68122
Spink3	3,27899	2,65929
Pfn2	4,08059	2,64645
Snrnp70	4,23607	2,63355
Eif2s2	2,58904	2,60098
Pdcd5	3,34321	2,59959
Coa7	2,68753	2,54967
Wars	3,778	2,44271
Slc23a1	5,19849	2,4075
Ppat	2,45952	2,38756
Dad1	3,20849	2,34254
Dcaf8	3,44898	2,29148
Uck1	3,52185	2,2814
Nav3	2,32659	2,26536
Nagk	5,50072	2,20623

Fortsetzung folgt auf nächster Seite

Gen Name	-Log Student's T-test p-value Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}	Student's T-test Difference Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}
Fgb	1,53358	2,18298
Sec11a	3,41327	2,15914
Nhlrc2	3,92299	2,15807
Sft2d2	3,62255	2,14455
Ncstn	4,6795	2,13962
Hpcal1;Hpca	2,52966	2,10506
S100g	1,59357	2,07744
Uchl3;Uchl4	2,777	2,07241
Atp5j	2,20601	2,05848
Mrpl12	1,88146	2,05017
Lbr	2,78233	1,99236
Vbp1	3,27154	1,9765
Pvalb	1,99487	1,96969
Rbm25	2,52411	1,93771
Hnrnpm	1,79463	1,93014
Tpd52l2	1,70831	1,90841
Dek	1,4193	1,90084
Epb41l2	4,11056	1,89232
Map2k1	2,41132	1,87954
Smarca4	3,06476	1,84248
Rfk	2,83656	1,83684
Aimp2	3,87885	1,81506
Dynll2	1,67643	1,80072
Ruvbl2	1,49367	1,77709
Clmn	1,85742	1,76857
Fgf1	1,54429	1,7664
Cyp2d9	1,47127	1,72361
Cmas	2,73705	1,71845
S100a11	1,82469	1,70718
Psme2	1,55124	1,70417
Ogfr	1,91371	1,68434
Fars2	1,89873	1,68097
Ppp1r12a	1,33814	1,6378
Timm10	1,68185	1,60529
Ppp3ca	1,40926	1,60049
Slirp	1,98557	1,58091
Msrb2	1,98777	1,56525
Calml3	1,35282	1,5633
Ociad1	1,55268	1,50819
Tmco1	1,6799	1,49328

Fortsetzung folgt auf nächster Seite

Gen Name	-Log Student's T-test p-value Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}	Student's T-test Difference Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}
Fam136a	3,20889	1,48313
Epb41	1,94726	1,43525
Sec62	1,64371	1,42852
Luc7l3	1,39744	1,4197
Akr1b1	1,62627	1,39642
Wdfy1	2,39827	1,38952
Pcyt1a;Pcyt1b	2,04129	1,38422
Aldoc	1,4312	1,37444
Mrpl37	1,68955	1,32504
Arl6	2,56671	1,32205
Nudt4;Nudt11	2,47516	1,31096
Ptma	1,40411	1,30727
Lnpep	1,52438	1,24986
Cox6a1	1,75246	1,24824
Cecr5	1,69346	1,1789
Sprr1a	1,61434	1,16349
Cd2ap	1,40087	1,15063
Rab3gap1	2,69191	1,1276
Purb	1,51236	1,07983
Hspa1a;Hspa1b	2,04565	1,05514
Pnpt1	1,62708	1,04067
Cnbp	1,6206	1,04024
Fth1	1,34085	1,03437
Pfkip	1,69026	1,03064
Cdc42bpb	1,94661	1,02635
Hsdl2	1,51558	1,02635
FAM120A	2,06936	1,01203
Tacstd2	3,01944	0,981333
Srrt	1,31309	0,974769
Dctn3	1,54276	0,931792
Tpt1	1,45253	0,911149
Rufy3	2,99677	0,882434
Uap1	2,42955	0,849
Nccrp1	1,35214	0,848878
Tpm4	1,47224	0,848245
Arih1	1,82241	0,831159
Wls	1,5016	0,81895
Akr1c13	1,33024	0,817103
Myh11	1,33385	0,786025
Rufy1	1,93601	0,736176

Fortsetzung folgt auf nächster Seite

Gen Name	-Log Student's T-test p-value Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}	Student's T-test Difference Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}_Nphp1^{-/-}
Ndufa4	1,35804	0,725187
Arpc3	1,31629	0,62779
Hnrnph1	2,46415	0,624472
Gsto1	1,52858	0,610363
Ctnnd1	1,75204	0,603076
Eftud1	1,79675	0,593024
Ptbp1	1,65371	0,563953
Letm1	1,39814	0,558388
Klk1	1,54434	0,548963
Arfgef1	1,42837	0,546835
Ccdc51	2,20425	0,509521
Hmgb1	1,70682	0,487887
Fis1	1,70159	0,483845
Bcam	1,9124	0,481236
Nudt9	1,35376	0,47256
Ctsd	1,70899	0,468849
Oxsr1	1,43575	0,468421
Hnrnpl	1,57667	0,460979
Letmd1	1,48798	0,412306
Dstn	1,49579	0,390805
Uroc1	2,09036	0,387434
Ppic	1,43444	0,364158
Lmna	2,24047	0,362009
Tpr	1,30146	0,343387
Sugt1	1,3458	0,340749
Ghitm	1,5767	0,329246
Ctsb	1,36421	0,328847
Anxa4	1,85898	0,311906
Emc8	1,31268	0,290524
Fam129b	1,73221	0,285896
Pygb	1,78013	0,283003
Gna13	1,66632	0,266147
Capn2	1,76376	0,244348
Sep11	1,31286	0,234587

Tabelle 3: Potentielle Nphp1 Interaktoren

5. Diskussion

5.1 Einfluss von NPHP1 auf die Ziliogenese und die Morphologie primärer Zilien

Primäre Zilien spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Zellpolarität, welche wiederum einen entscheidenden Einfluss auf die Struktur und Funktion von epithelialen Geweben hat. Darüber hinaus ist bekannt, dass ziliäre NPH Proteine zum Teil große Proteinkomplexe an der Zilienbasis bilden, so wurde dort auch der Komplex NPHP1-4-8 nachgewiesen. Es stellen sich auch hier Fragen nach dem Einfluss von NPHP1 auf die Ziliogenese und die korrekte Funktion primärer Zilien [5, 15, 22, 27, 53]. Zilien finden sich in der Niere auf der apikalen Seite von Tubulus- und Sammelrohrzellen, wo sie u.a. die Urinosmolalität beeinflussen [1, 3].

Für diese Arbeit wurden daher die zilientragenden HKC8 Zellen verwendet. Nach erfolgreichem knockout von *NPHP1* mittels CRISPR/Cas9 konnten wir die wt Zellen gegenüber den KO Zellen zur Testung der anti-Nphp1 AK aus Hybridomazellen genutzt werden (s.u.).

Anhand der durchgeführten Stainings der HKC8 Zellen (Abbildung 12) lässt sich zunächst sagen, dass wie durch vorangegangene Studien zu erwarten, NPHP1 an der Zilienbasis nachgewiesen werden konnte. Da die IF Stainings zur Testung der Antikörper dienten, wurden die Zilienzahl und Zilienlänge nicht quantitativ bestimmt. Nebenbefundlich führte der nachgewiesene Verlust von NPHP1 in den HKC8 KO Zellen subjektiv zu einer leichten Verringerung der Zilienzahl, sowie einer Verringerung der Zilienlänge.

5.2 Proteom der NPHP1 KO Zellen

Um die Rolle von *NPHP1* in einen globalen Zusammenhang setzen zu können, ist es notwendig auch den Einfluss der NPHP1 Defizienz auf die Expression anderer Proteine zu untersuchen. Es ist bereits bekannt, dass Ziliopathien eine Gruppe von Erkrankungen mit einem breiten Spektrum an klinischen Symptomen sind. Insbesondere bei den drei rezessiven Erkrankungen, der NPH, dem Joubert-Syndrom und dem Meckel-Gruber-Syndrom zeigen sich phänotypische Überlappungen.

Da beispielsweise Mutationen von *NPHP1*, sowohl bei Patienten mit NPH als auch JBS beobachtet wurden, und Mutationen von *NPHP3*, *NPHP6* und *NPHP8* zum klinischen Bild aller drei Erkrankungen führen können, ist anzunehmen, dass der Ausfall von NPHP1, sowie weiterer Ziliopathiegene einen Defekt in wichtigen zellulären/ziliären Mechanismen verursacht [27, 54]. Insbesondere die Auswirkung einer Mutation auf die Expression anderer

Proteine ist hier interessant. Sang et al. konnten bereits zeigen, dass NPHP1 Interaktionsmodule mit anderen NPHP Proteinen bildet (NPHP1-4-8, NPHP5-6) [27].

Vergleicht man die 201 signifikant veränderten Proteine unseres Proteoms mit den Interaktomdaten von Sang et al. zeigt sich allerdings, dass keiner der bei Sang et al. gefundenen Interaktionspartner in unserem Proteom hoch/runter reguliert ist. Die Ergebnisse zu NPHP1 von Sang et al. basieren jeweils auf murinen Zellen (NIH 3T3 und IMCD3), wohingegen unser Proteom auf humanen Zellen basiert.

Der Abgleich des Proteoms mit den CiliaCarata Proteinen hat u.a. Myosin5A als Übereinstimmung gezeigt. Die Expression von Myosin5A in den KO Zellen unserer Proteoms ist reduziert. Myosin-5A ist ein actin-basiertes Motorprotein, das am Zentrosom Makromoleküle, sowie Zellbestandteile transportiert. Zudem ist es besonders an der Zilienbasis zu finden [48, 55]. In IMCD Zellen mit einem CRISPR/Cas9 basierten KO konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust von Myosin-5A zu einer signifikanten Reduktion der Zilien führt [48]. Hier wäre nun interessant inwiefern sich die Aktivität von NPHP1 und Myosin-5A möglicherweise gegenseitig beeinflussen.

5.3 Die Rolle von NPHP1 im Hinblick auf immunmodulative Prozesse

Die GO-Term Analyse unseres NPHP1 Proteoms zeigt eine erhöhte Anreicherung von NPHP1 in verschiedenen immunmodulativen Prozessen, insbesondere der zellulären Reaktion auf Interferon I und davon beeinflussten Signalwegen, sowie der zellulären Antwort auf Cytokinausschüttung. Anhand des Phänotyps der NPH zeigt sich bereits, dass neben der Zystenbildung vor allem inflammatorische Prozesse und Fibrosierung eine große Rolle spielen [15, 56, 57]. Hier stellt sich nun die Frage in welcher Verbindung Zilien, Zysten und das Immunsystem den Phänotyp der NPH bedingen und in wie weit ggf. immunmodulatorisch eingegriffen werden kann.

Viau et al. konnten 2018 bereits zeigen, dass Zilien in der Niere die Anzahl peritubulärer Makrophagen über die Steuerung der Expression des Chemokins CCL2 regulieren können bzw. aktiv zu einer inflammatorischen Reaktion beitragen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass, der Komplex aus LKB1, sowie NPHP1, PKD1, ANKS3 und NEK7 die zilieninduzierte Inflammation herunter reguliert. Gezeigt wurde zudem, dass sowohl der Verlust von LKB1, als auch von PKD1 innerhalb des Komplexes ausreicht, um über eine inflammatorische Reaktion die Morphologie der Niere und ihre Funktion zu stören und einen NPH ähnlichen Phänotyp hervorzurufen [58]. CCL2 konnte zudem im Urin bei ADPKD Patienten bereits als Prognosemarker identifiziert werden [59], sodass interessant wäre hier weitere Untersuchungen zur Expression von CCL2 bei Patienten mit NPH anzuschließen. Ebenso wäre es interessant ein Mausmodell zu entwickeln, indem zusätzlich zu einem Nphp1 KO ein weiteres Protein aus dem CCL2 regulierenden Komplex herunter reguliert wurde. Die

immunmodulatorischen und inflammatorischen Prozesse scheinen im Hinblick auf die Entstehung und Progression der NPH eine wesentliche Rolle zu spielen, sodass sich im weiteren Verlauf ggf. auch neue therapeutische Ansätze auf Ebene des Immunsystems herausstellen.

5.4 Die *Nphp1* defizienten Mäuse zeigen keinen Phänotyp

Das klinische Bild der NPH ist im Allgemeinen durch kortikomedulläre Zysten, tubulointerstitielle Nephritis und Verdickung der tubulären Basalmembran gekennzeichnet [13]. Anhand von phänotypischen Modellorganismen lassen sich bestenfalls Rückschlüsse auf die genaue Rolle des Gens während der Pathogenese ziehen. Für einige zystische Nierenerkrankungen wie die ADPKD oder auch die rezessive ARP KD, sowie das Bardet-Biedl-Syndrom wurden in der Vergangenheit bereits erfolgreich Knockout Mauslinien etabliert [60]. Für die NPH wurde durch Jiang et al. im Jahr 2008 eine Mauslinie mit einer homozygoten Deletion des Exons 20 mittel Cre-Loxp-System generiert. Hierzu wurde zunächst eine Maus mit gefloxtem Exon 20 (loxp) und Neomycin Resistenz generiert und mit einer E-2a-Cre Maus (Deleter-Cre) gepaart. Folge der Deletion war eine trunkierte und geringer exprimierte Version von *Nphp1*. Phänotypisch zeigten die Mäuse u.a. eine gestörte Spermatogenese und degenerative Veränderungen der Retina. Einen renalen Phänotyp entwickelten die Mäuse bis zum Alter von 18 Monaten jedoch nicht. Als Ursache wurde hier u.a. eine möglicherweise noch ausreichende Funktion der trunkierten *Nphp1* Variante diskutiert. [61, 62].

Da es zu Beginn dieser Arbeit keinen publizierten renalen Phänotyp gab, wurde für weitergehende Untersuchungen eine *Nphp1*^{-/-} Mauslinie mit CRISPR/Cas9 generiert, deren Knockout auf einer das Start-Codon einschließenden Deletion im Exon 1 von *Nphp1* basiert. Die Charakterisierung und Analyse der Mauslinie zeigte zum Teil unerwartete Ergebnisse. Zunächst konnten wir bestätigen, dass das korrelierende Protein Nephrocystin-1 in der *Nphp1*^{-/-} Maus nicht mehr exprimiert ist (Abbildung 6D). Die im Folgenden durchgeführte IP mit Nieren und Hoden der *Nphp1* defizienten Tiere hat dieses Ergebnis weiter bestätigt (Abbildung 13). Zusätzlich erfolgte die Validierung der *Nphp1*^{-/-} Maus mittels MS (Abbildung 14). Histologische Untersuchungen der Nieren von 29,5 Monate alten Mäusen zeigen sowohl bei den *Nphp1*^{-/-} Mäusen, als auch bei den *Nphp1*^{-/-} Tieren eine normale Struktur der Niere mit regulär ausgebildeten Nierentubuli. Auch die Lebern der entsprechenden Tiere weisen keinerlei histologische Veränderungen im Sinne einer Fibrosierung als extrarenaler Manifestation der NPH auf (Abbildung 8 u. 9). Es ist uns daher nicht gelungen durch einen alleinigen homozygoten Knockout von *Nphp1* einen nephronophthiseähnlichen Phänotyp der Niere *in vivo* in der Maus zu generieren.

Trotz der bisherigen Erkenntnis, dass es sich bei der NPH um eine monogenetische Erkrankung handelt, stellt sich aufgrund der Ergebnisse die Frage, ob für die Entstehung der

NPH eine zusätzliche Mutation eines NPH Genes oder ggf. eines bisher nicht ursächlich beschriebenen Gens vorliegen muss. Insbesondere unter der Berücksichtigung, dass NPHP1 bekanntermaßen mit NPHP4 und NPHP8 interagiert und einen Komplex bildet, wäre zu diskutieren, ob diese eine fehlende Funktion von NPHP1 ggf. kompensieren können.

Ebenso denkbar als Ursache wären die genetischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass NPHP1 im Menschen eine essenziellere Rolle in der Entwicklung der Nieren einnimmt als bei Mäusen. Zum anderen könnten aber auch genetische Unterschiede dafür verantwortlich sein, dass eine fehlende Funktion von *Nphp1* bei Mäusen im Gegensatz zum Menschen kompensiert wird.

Nach Abschluss der Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde 2021 erstmals durch Li et al. und Garcia et al. ein *Nphp1*^{-/-} Mausmodell publiziert, welches einen renalen Phänotyp der NPH entwickelt [63, 64]. Li et al verwendeten für den Knockout von Exon 2-20 sowohl eine sgRNA, mit der Cas9 vor Exon 2 schneidet, als auch eine sgRNA, die hinter Exon 20 bindet. Es resultierte ein Knockout, welcher sich auf DNA und Proteinebene bestätigen ließ [63]. Es stellt sich nun die Frage, warum das Mausmodell von Li et al einen Phänotyp entwickeln konnte und unser Mausmodell nicht, obwohl in beiden Fällen ein Knockout unmittelbar hinter bzw im Exon 1 generiert werden konnte. Zur Generierung der Mauslinie wurde ebenso bei beiden Modellen ein C57BL/6 Background verwendet, sodass hierüber die Unterschiede im Phänotyp nicht zu erklären sind. Hinsichtlich der Tierhaltung bestanden ebenfalls keine Unterschiede (12h hell/12h dunkel, 50-55% Luftfeuchtigkeit, 21 °C, Futter und Wasser frei verfügbar). Möglicherweise ist also eine komplette Gendeletion notwendig, um einen Phänotyp zu entwickeln. Es könnte sein, dass intronische oder andere nichtkodierende Sequenzen dabei wichtig sind.

Das Mausmodell, welches durch Garcia et al publiziert wurde basiert ebenfalls auf einem C57BL/6 Background. Hier wurde, wie in unserem Fall mittels CRISPR/Cas9, eine sgRNA verwendet, welche spezifisch in Exon 1 zu einer Deletion mit Wegfall des Start-Codons und somit zu einem kompletten Verlust von *Nphp1* führt. Dies wurde mittels Westernblot nachgewiesen. Die Mäuse entwickelten zum einen eine schwere Retinopathie mit Verlust der Photorezeptoren und zum anderen einen renalen Phänotyp mit dilatierten Tubuli im Bereich der Nierenrinde. Dilatiert war der Übergang zwischen proximalen und distalen Tubuli, sowie die distalen Tubuli selbst. Die Dilatation zeigte sich bereits im Alter von 2 Monaten mit deutlicher Progredienz im Alter von 5 Monaten. Die Nierenfunktion blieb jedoch unbeeinflusst [64]. Zusammenfassend lässt sich hier sagen, dass die publizierten Mausmodell mit NPH ähnlichem Phänotyp alle auf dem gleichen Background basieren wie unser Mausmodell und der Knockout wie auch bei uns durch einen Verlust des Startcodons induziert wurde, sodass hierüber und ebensowenig über die Tierhaltungsbedinugnen, der fehlende Phänotyp unseres Mausmodells erklärt werden kann. Trotz des bereits publizierten phänotypischen Mausmodells

lässt sich letztendlich auch ein grundsätzlicher Unterschied in der Entstehung der NPH zwischen Maus und Mensch nicht ausschließen. Aus genetischen Analysen bei Patienten ist bekannt, dass in der Mehrzahl der Fälle eine homozygote Deletion von NPHP1 zu einer Nephronophthise führt. Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen eine heterozygote trunkierende Mutation zur Entstehung eines Phänotyps ausreicht [22, 65, 66]

5.5 Das Nphp1 Interaktom in der Maus

Um die Rolle von Nphp1 innerhalb zellulärer Prozesse und Signalwege besser einordnen zu können, ist es neben dem Wissen über den Einfluss auf andere Proteine (s. 6.2) notwendig, die Interaktoren von Nphp1 zu kennen.

Wie bereits unter 6.2 erwähnt sind Interaktionen von Nphp1 mit Nphp4 und Nphp8 bekannt.

Unser Interaktom aus den Nieren von *Nphp1^{+/+}/Nphp1^{+/-}* Mäusen erbrachte 154 potenzielle Interaktoren von Nphp1. Vergleicht man die 154 Interaktoren mit den Interaktoren von Nphp1, welche durch Sang et al auf Basis muriner Zellen (NIH 3T3 und IMCD3) publiziert wurden [27], zeigt sich lediglich eine geringfügige Überschneidung. Hier lässt sich mutmaßen, dass eine spezifische Zellpopulation wie z.B. Zellen des Sammelrohrs (IMCD3) andere Interaktoren oder Zusammensetzung von Interaktoren aufweisen, als z.B. das gesamte Nierengewebe und dass daher in den Proben aus IMCD3 Zellen Interaktoren als signifikant identifiziert wurden, die im gesamten Nierengewebe nicht signifikant waren. Zudem handelt es sich bei dem hier vorliegenden Interaktom um ein Interaktom von endogenem Protein, wohingegen bei Sang et al das Interaktom mit exogenem getagtem Protein in FLPin Zellen gemacht wurde.

Der gemeinsame Interaktor Lamin-A/C konnte sowohl bei Sang et al, als auch in den Daten dieser Arbeit gezeigt werden. Lamin-A/C wird durch das Gen *Lmna* kodiert und spielt unter anderem eine Rolle in der Zelldifferenzierung, im Zellzyklus und bei der Zellpolarität- und Integrität [67].

Der erweiterte Vergleich der in unserem Datensatz gefundenen Interaktoren von Nphp1 mit den Daten von Sang et al zeigt darüberhinaus, dass Nphp1 u.a. gemeinsame Interaktoren mit Nphp2 (*Lmna, Sfn, Myl6*), Nphp4 (*Cryab, Nav3, Ndufa4*), Nphp5 (*Hnrmp1, Hnrmpm, Ndufa4, Psme4, Ruvbl2*), Nphp6 (*Cryab*) und Nphp8 (*Aldoc, Cd2ap, Cryab, Fth1, Hnrmp1, Hnrmpm, Ndufa4, Purb, Rpl23a*) hat. Diese Überschneidungen können als Hinweis gesehen werden, dass Nphp Proteine nicht nur direkt miteinander interagieren [27], sondern auch indirekt über gemeinsame Interaktoren Proteinkomplexe bilden.

Das Nphp1 Interaktom dieser Arbeit wurde des Weiteren mit der CiliaCarta verglichen. Sechs der Nphp1 Interaktoren sind bekannte ziliäre Proteine (*ARL6, DCTN3, DSTN, PFN2, RUVBL2, SLIRP*) [52].

Interessant ist hier u.a. die Interaktion mit Arl6 (ADP-ribosylation factor-like protein 6). Arl6 gehört zu einer großen Gruppe GTP-bindender Proteine, die für verschiedene

membranassoziierte intrazelluläre Transportprozesse verantwortlich sind und wird für den intraflagellaren Transport in primären Zilien benötigt. Eine Mutation in *Arl6/Bbs3* ist für das Bardet-Biedl-Syndrom verantwortlich. Die genaue Rolle von *Arl6* in der Entstehung des BBS, sowie von Ziliopathien allgemein ist ebenso unverstanden wie die Rolle von *Nphp1*. Die gefundenen Interaktoren müssen nun ebenso wie die Rolle der Proteinkomplexe weiter untersucht werden.

5.6 Ausblick

Die Entstehung der NPH und anderer Ziliopathien verbleibt auch heute noch weitestgehend unverstanden, sodass hier weiterer Forschungsbedarf besteht. Insbesondere die zentrale Rolle der primären Zilien gilt es zu entschlüsseln.

Wir konnten zeigen, dass durch einen *NPHP1* KO die Zilienzahl in HKC8 Zellen verringert wurde. Dies gilt es zukünftig zu quantifizieren. Zudem ist es uns gelungen ein Proteom-Profil zu erstellen, welches 201 signifikant veränderte Proteine in den *Nphp1* KO Zellen gegenüber den wt Zellen zeigt. Anknüpfend hieran, sollten die entsprechenden Proteine zunächst strukturiert analysiert werden. Ein Kandidat im Zusammenhang mit Ziliopathien wäre z.B. Myosin5A, für welches bereits gezeigt werden konnte, dass ein KO ebenfalls zum Verlust von Zilien führt [48].

Auf Grundlage der GO-Termanalyse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass *NPHP1* über immunmodulatorische Mechanismen zur Inflammation und Fibrose bei der NPH beitragen könnte. Weitere Untersuchungen von *NPHP1* und möglicher Interaktionspartner des Immunsystems könnten neue Ansatzpunkte für eine Therapie zystischer Nierenerkrankungen bieten.

Leider ist es uns nicht gelungen einen NPH ähnlichen Phänotyp in der Maus zu generieren. Da in unserer Arbeit lediglich die Nieren und Leber auf eine Manifestation der NPH untersucht wurden, könnten in Folgeexperimenten histologische Untersuchungen von weiteren Organen wie Gehirn oder Augen, weitere Aufschlüsse bringen. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wäre vor allem interessant, ob es gelingen kann durch eine zweite Mutation einen Phänotyp in Mäusen zu generieren. Vorstellbar wäre dies zum einen durch eine Mutation eines weiteren Gens aus dem NPH Komplex wie z.B. *NPHP4* oder *NPHP8* oder auch basierend auf der Arbeit von Viau et al. durch eine Mutation bzw. einen Knockout von *LKB1* [58]. Das Interaktom basierend auf der KO Mauslinie hat insbesondere im Vergleich mit den Daten von Sang et al bestätigt, dass Interaktoren von *Nphp1* auch mit anderen *Nphp* Proteinen interagieren und mutmaßlich Proteinkomplexe bilden. Zudem konnte diese Arbeit zeigen, dass *Nphp1* mit *Arl6* interagiert, dem verantwortlichen Protein des BBS. Weitere Untersuchungen dieser Proteinkomplexe könnten helfen die Entstehung von Ziliopathien besser zu verstehen und zukünftige Therapien möglich zu machen

6. Literaturverzeichnis

1. Kagan, K.O., A. Dufke, and U. Gembruch, *Renal cystic disease and associated ciliopathies*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2017. **29**(2): p. 85-94.
2. Watnick, T. and G. Germino, *From cilia to cyst*. *Nat Genet*, 2003. **34**(4): p. 355-6.
3. Mitchison, H.M. and E.M. Valente, *Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes*. *J Pathol*, 2017. **241**(2): p. 294-309.
4. Ma, S. and K.L. Guan, *Polycystic kidney disease: a Hippo connection*. *Genes Dev*, 2018. **32**(11-12): p. 737-739.
5. Hildebrandt, F., T. Benzing, and N. Katsanis, *Ciliopathies*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(16): p. 1533-43.
6. Lemos, F.O. and B.E. Ehrlich, *Polycystin and calcium signaling in cell death and survival*. *Cell Calcium*, 2018. **69**: p. 37-45.
7. Muller, R.U. and T. Benzing, *Cystic Kidney Diseases From the Adult Nephrologist's Point of View*. *Front Pediatr*, 2018. **6**: p. 65.
8. Bergmann, C., *ARPKD and early manifestations of ADPKD: the original polycystic kidney disease and phenocopies*. *Pediatr Nephrol*, 2015. **30**(1): p. 15-30.
9. SMITH, C.H. and J.B. GRAHAM, *Congenital medullary cysts of the kidneys with severe refractory anemia*. *American Journal of Diseases of Children*, 1945. **69**(6): p. 369-377.
10. Fanconi, G., et al., *[Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]*. *Helv Paediatr Acta*, 1951. **6**(1): p. 1-49.
11. Simms, R.J., L. Eley, and J.A. Sayer, *Nephronophthisis*. *Eur J Hum Genet*, 2009. **17**(4): p. 406-16.
12. Hildebrandt, F. and W. Zhou, *Nephronophthisis-associated ciliopathies*. *J Am Soc Nephrol*, 2007. **18**(6): p. 1855-71.
13. Hildebrandt, F., M. Attanasio, and E. Otto, *Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(1): p. 23-35.
14. Salomon, R., S. Saunier, and P. Niaudet, *Nephronophthisis*. *Pediatr Nephrol*, 2009. **24**(12): p. 2333-44.
15. Wolf, M.T., *Nephronophthisis and related syndromes*. *Curr Opin Pediatr*, 2015. **27**(2): p. 201-11.
16. Oud, M.M., et al., *Early presentation of cystic kidneys in a family with a homozygous INVS mutation*. *Am J Med Genet A*, 2014. **164A**(7): p. 1627-34.
17. Castori, M., et al., *NPHP1 gene deletion is a rare cause of Joubert syndrome related disorders*. *J Med Genet*, 2005. **42**(2): p. e9.
18. Omran, H., *NPHP proteins: gatekeepers of the ciliary compartment*. *J Cell Biol*, 2010. **190**(5): p. 715-7.
19. Bergmann, C., et al., *Loss of nephrocystin-3 function can cause embryonic lethality, Meckel-Gruber-like syndrome, situs inversus, and renal-hepatic-pancreatic dysplasia*. *Am J Hum Genet*, 2008. **82**(4): p. 959-70.
20. Wolf, M.T., et al., *Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis*. *Kidney Int*, 2007. **72**(12): p. 1520-6.
21. Baala, L., et al., *Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome*. *Am J Hum Genet*, 2007. **81**(1): p. 170-9.
22. Braun, D.A. and F. Hildebrandt, *Ciliopathies*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2017. **9**(3).
23. Wheway, G., L. Nazlamova, and J.T. Hancock, *Signaling through the Primary Cilium*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 8.
24. Shi, X., et al., *Super-resolution microscopy reveals that disruption of ciliary transition-zone architecture causes Joubert syndrome*. *Nat Cell Biol*, 2017. **19**(10): p. 1178-1188.
25. Szymanska, K. and C.A. Johnson, *The transition zone: an essential functional compartment of cilia*. *Cilia*, 2012. **1**(1): p. 10.
26. Reiter, J.F., O.E. Blacque, and M.R. Leroux, *The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization*. *EMBO Rep*, 2012. **13**(7): p. 608-18.

27. Sang, L., et al., *Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways*. Cell, 2011. **145**(4): p. 513-28.
28. Hildebrandt, F., et al., *A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1*. Nat Genet, 1997. **17**(2): p. 149-53.
29. Fliegau, M., et al., *Nephrocystin specifically localizes to the transition zone of renal and respiratory cilia and photoreceptor connecting cilia*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(9): p. 2424-33.
30. Mollet, G., et al., *Characterization of the nephrocystin/nephrocystin-4 complex and subcellular localization of nephrocystin-4 to primary cilia and centrosomes*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(5): p. 645-56.
31. Olbrich, H., et al., *Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 455-9.
32. Otto, E.A., et al., *Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination*. Nat Genet, 2003. **34**(4): p. 413-20.
33. Mollet, G., et al., *The gene mutated in juvenile nephronophthisis type 4 encodes a novel protein that interacts with nephrocystin*. Nat Genet, 2002. **32**(2): p. 300-5.
34. Benzing, T. and B. Schermer, *Clinical spectrum and pathogenesis of nephronophthisis*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(3): p. 272-8.
35. Jiang, F. and J.A. Doudna, *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. Annu Rev Biophys, 2017. **46**: p. 505-529.
36. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
37. Paix, A., et al., *High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in Caenorhabditis elegans Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes*. Genetics, 2015. **201**(1): p. 47-54.
38. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. Nat Protoc, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
39. Lackner, D.H., et al., *A generic strategy for CRISPR-Cas9-mediated gene tagging*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 10237.
40. Richardson, C.D., et al., *Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(3): p. 339-44.
41. Mullis, K.B., *Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction*. Ann Biol Clin (Paris), 1990. **48**(8): p. 579-82.
42. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
43. Lee, P.Y., et al., *Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments*. J Vis Exp, 2012(62).
44. Lehman, I.R., *DNA ligase: structure, mechanism, and function*. Science, 1974. **186**(4166): p. 790-7.
45. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol, 1983. **166**(4): p. 557-80.
46. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
47. Loyter, A., et al., *Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy*. Exp Cell Res, 1982. **139**(1): p. 223-34.
48. Kohli, P., et al., *The ciliary membrane-associated proteome reveals actin-binding proteins as key components of cilia*. EMBO Rep, 2017. **18**(9): p. 1521-1535.
49. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
50. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.

51. Chu, V.T., et al., *Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes*. BMC Biotechnol, 2016. **16**: p. 4.
52. van Dam, T.J.P., et al., *CiliaCarta: An integrated and validated compendium of ciliary genes*. PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0216705.
53. Michgehl, U., H. Pavenstadt, and B. Vollenbrocker, *Cross talk between the Crumbs complex and Hippo signaling in renal epithelial cells*. Pflugers Arch, 2017. **469**(7-8): p. 917-926.
54. Parisi, M.A., et al., *Joubert syndrome (and related disorders) (OMIM 213300)*. Eur J Hum Genet, 2007. **15**(5): p. 511-21.
55. Assis, L.H., et al., *The molecular motor Myosin Va interacts with the cilia-centrosomal protein RPGRIP1L*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 43692.
56. Slaats, G.G., M.R. Lilien, and R.H. Giles, *Nephronophthisis: should we target cysts or fibrosis?* Pediatr Nephrol, 2016. **31**(4): p. 545-54.
57. Hildebrandt, F., et al., *Molecular genetic identification of families with juvenile nephronophthisis type 1: rate of progression to renal failure*. APN Study Group. Arbeitsgemeinschaft fur Padiatrische Nephrologie. Kidney Int, 1997. **51**(1): p. 261-9.
58. Viau, A., et al., *Cilia-localized LKB1 regulates chemokine signaling, macrophage recruitment, and tissue homeostasis in the kidney*. EMBO J, 2018.
59. Zheng, D., et al., *Urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in autosomal dominant polycystic kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2588-95.
60. Ko, J.Y. and J.H. Park, *Mouse models of polycystic kidney disease induced by defects of ciliary proteins*. BMB Rep, 2013. **46**(2): p. 73-9.
61. Jiang, S.T., et al., *Targeted disruption of Nphp1 causes male infertility due to defects in the later steps of sperm morphogenesis in mice*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(21): p. 3368-79.
62. Jiang, S.T., et al., *Essential role of nephrocystin in photoreceptor intraflagellar transport in mouse*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(9): p. 1566-77.
63. Li, D., et al., *An Nphp1 knockout mouse model targeting exon 2-20 demonstrates characteristic phenotypes of human nephronophthisis*. Hum Mol Genet, 2021. **31**(2): p. 232-243.
64. Garcia, H., et al., *Agonists of prostaglandin E(2) receptors as potential first in class treatment for nephronophthisis and related ciliopathies*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(18): p. e2115960119.
65. Konrad, M., et al., *Large homozygous deletions of the 2q13 region are a major cause of juvenile nephronophthisis*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(3): p. 367-71.
66. Halbritter, J., et al., *Identification of 99 novel mutations in a worldwide cohort of 1,056 patients with a nephronophthisis-related ciliopathy*. Hum Genet, 2013. **132**(8): p. 865-84.
67. Andres, V. and J.M. Gonzalez, *Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization*. J Cell Biol, 2009. **187**(7): p. 945-57.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Designbeispiel für sgRNA	31
Abbildung 2: Aufreinigung der anti-Nphp1 AK mittels Protein G beads	37
Abbildung 3: Spezifische sgRNAs induzieren den KO von <i>NPHP1</i> in Exon 1 und Exon 6 in HKC8 Zellen.	49
Abbildung 4: Nachweis der fehlenden <i>NPHP1</i> Expression in den HKC8 Knockout Zellen.	50
Abbildung 5: Mapping des <i>NPHP1</i> Proteoms von HKC8 wt und <i>NPHP1</i> KO Zellen.	52
Abbildung 6: Bestätigung des <i>Nphp1</i> KO auf DNA und Proteinebene in der Maus.	59
Abbildung 7: Die <i>Nphp1</i> KO Mäuse zeigen keinen Gewichtsunterschied.	61
Abbildung 8: Nieren von <i>Nphp1</i> ^{-/-} und <i>Nphp1</i> ^{+/-} Mäusen zeigen eine normale Morphologie.	62
Abbildung 9: Die Leber von <i>Nphp1</i> ^{-/-} und <i>Nphp1</i> ^{+/-} Mäusen zeigen eine normale Morphologie.	63
Abbildung 10: In der Quantifizierung der anti-Nphp1 AK zeigen sich für die Subklone #19, #30 und #62 jeweils unterschiedlich starke Konzentrationen.	65
Abbildung 11: Die aufgereinigten anti-Nphp1 AK immunopräzipitieren überexprimiertes und endogenes <i>NPHP1</i> .	67
Abbildung 12: Der anti-Nphp1 AK weist <i>NPHP1</i> an der Zilienbasis in HKC8 Zellen nach.	68
Abbildung 13: Der anti-Nphp1 #62 AK immunopräzipitieren <i>Nphp1</i> aus Nieren und Hoden von Mäusen.	70
Abbildung 14 Kein Nachweis von <i>Nphp1</i> mittels MS in den Hoden der <i>Nphp1</i> ^{-/-} Mäuse.	71
Abbildung 15: Interaktom von <i>Nphp1</i> in Mäusen.	73

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Regulierte Proteine in <i>NPHP1</i> -defizienten Zellen	57
Tabelle 2: Näherungsweise bestimmte Konzentrationen der anti-Nphp1 AK	64
Tabelle 3: Potentielle <i>Nphp1</i> Interaktoren	77

7.3 Lebenslauf

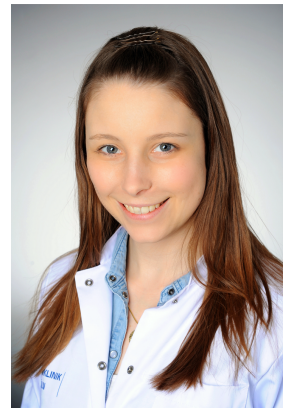
Persönliche Informationen

Kontakt Kringsweg 11
50931 Köln

Telefon +49 173 1647933

E-Mail lea.muenkner@googlemail.com

Geburtstag/-ort 04.12.1993/Wuppertal



Akademischer Werdegang

04/2013 – 11/2019 Studium der Humanmedizin, Universität zu Köln
M1 Physikum (03/2015)
M2 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (04/2018)
M3 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (11/2019)

Seit 02/2016 Doktorandin, Nephrolab Cologne, CECAD Research Center
Angestrebte Promotion
Universität zu Köln

11/2016 – 12/2017 Studentische Hilfskraft/Wissenschaftliche Mitarbeiterin,
Nephrolab Cologne, CECAD Research Center

02/2018 – 01/2019 Stipendiatin des Köln Fortune Programms für studentische
Forschungsförderung/Begabtenförderung der Universität zu
Köln

02/2018 Förderung durch PKD e.V. für ADPKD Grundlagenforschung
(PKD Grant 2018)

07/2020-heute Assistenzärztin für Innere Medizin und Nephrologie, Klinik für Innere Medizin, Nephrologie, Rheumatologie und Diabetologie der Uniklinik Köln

Praktika

08/2015 – 09/2015 Dr. Karin Satow, Fachärztin für Kinder- und Jugendheilkunde

02/2017 – 03/2017 Elisabeth Klinik Bigge, Klinik für Innere Medizin und Rheumatologie

03/2017 – 04/2017 Uniklinik Köln, Klinik II für Innere Medizin, Zentrale Notaufnahme
Famulatur

08/2017 Uniklinik Köln, Klinik II für Innere Medizin, Nieren- und Hochdruckambulanz
Famulatur

09/2017 – 10/2017 Heilig-Geist-Krankenhaus Köln-Longerich, Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin
Famulatur

11/2018 – 03/2019 Uniklinik Köln, Klinik für Kinder- und Jugendheilkunde
Praktisches Jahr (Wahlfach)
Kinderonkologie, Kinderneurologie, Notaufnahme

03/2019 – 06/2019 Uniklinik Köln, Innere Medizin
Praktisches Jahr
Nephrologie, ZNA

07/2019 – 10/2019

Uniklinik Köln, Chirurgie

Praktisches Jahr

Gefäßchirurgie,
/Thoraxchirurgie

Viszeral-/Tumorchirurgie,

Herz-

Sprachen

Deutsch (Muttersprache), Englisch

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

- 10/2016 EMBO Conference „CILIA 2016“, Amsterdam
Abstract: „Loss of the newly identified ciliary protein AATF in renal tubular epithelial cells results in a degenerative cystic kidney disease“ (Manaswita Jain et al.)
Poster: „Crispr/Cas9 mediated genome-engineering to study ciliopathies in mice and in human cells“ (Lena Ebert et al.)
- 10/2018 EMBO Conference „CILIA 2018“, Kopenhagen
Abstract: „Dynamic alterations of ciliary membrane-associated proteome“ (Lena Ebert et al.)
- 10/2019 11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Düsseldorf
Poster: „Analyse des NPHP1 Protein-Komplexes in vivo in der Mausnieren“ (Lea Münkner et al.)