

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. Thomas Benzing

# **Die Bedeutung des DNA Reparaturenzyms Ercc1 im distalen Tubulus der Maus**

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

vorgelegt von  
**Felix Seelemeyer**  
aus Recklinghausen

promoviert am 20. September 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023



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

1. Gutachter: Professor Dr. med. B. Schermer

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Schumacher

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.<sup>1</sup>

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

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.

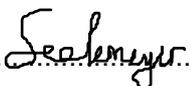
Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Frau Dr. Gisela Slaats und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Nephrolab Cologne 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 31. August 2022

(Unterschrift) 

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben.

Zuerst gebührt mein Dank Herr Prof. Bernhard Schermer und Frau Dr. Gisela Slaats, die meine Dissertation betreut und begutachtet haben. Für die hilfreichen Anregungen und die konstruktive Kritik bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Nephrolab Cologne, ohne die diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Abschließend möchte ich mich besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

**Meinen Eltern Martin und Claudia.  
Meinem Bruder Lukas.  
Meiner Tante Birgit.  
Mia.**

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>9</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
2.1. Nephronoptise und verwandte Ziliopathien	12
2.2. NPHP als renale Ziliopathie	14
2.2.1. Weitere polyzystische Nierenerkrankungen: ADPKD und ARPKD	14
2.2.2. Ziliopathien	14
2.3. NPHP-Gene kodieren für ziliäre Proteine	16
2.4. DNA-Damage-Response (DDR) als Netzwerk zellulärer Signalwege	17
2.5. DNA-Damage assoziiert mit Ziliopathien	18
2.6. Mechanismen der DNA-Reparatur	18
2.7. ERCC1 als Bestandteil des Nukleotidexzisionsreparatur (NER)	20
2.8. Errc1-Knockout-Mausmodelle	21
2.9. Zielsetzung der Arbeit	22
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1. Material	23
3.1.1. Chemikalien & Laborbedarf	23
3.1.2. Puffer und Lösungen	24
3.1.3. Kits und Verbrauchsmaterialien	24
3.1.4. Primer	25
3.1.5. Antiörper/Antiseren	25
3.2. Methoden	26
3.2.1. Generierung von Knockout-Mäusen	26
3.2.2. Analyse der Nierenfunktion d. er Knockoutmäuse	26
3.2.3. Genotypisierung	27

3.2.4.	Polymerase-chain-reaction (PCR)	27
3.2.5.	Agarosegelelektrophorese	28
3.2.6.	Paraffineinbettung und Schnittpräparation	28
3.2.7.	PAS-Staining	28
3.2.8.	Masson-Trichome-Färbung	29
3.2.9.	Pikro-Siriusrot-Färbung	29
3.2.10.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	30
3.2.11.	Immunhistochemie (ICH) an Paraffinschnitten	30
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>32</b>
4.1.	Generierung des konditionalen nierenspezifischen <i>Ercc1</i> -Knockout Mausmodells	32
4.2.	Phänotyp des <i>Ercc1</i> -Knockouts im Alter von 8 Wochen	33
4.3.	Effekt des <i>Ercc1</i> -Knockouts auf die Nierenfunktion im Alter von 8 Wochen	35
4.4.	Einfluss des <i>Ercc1</i> -Knockouts im Alter von 8 Wochen auf die DNA-Integrität und auf die Nierengewebe-Architektur	36
4.5.	Phänotyp des <i>Ercc1</i> -Knockouts im Alter von 21 Wochen	37
4.6.	Effekt des <i>Ercc1</i> -Knockouts auf die Nierenfunktion im Alter von 21 Wochen	39
4.7.	Renale Gewebearchitektur der <i>Ercc1</i> -Knockout-Mäuse im Alter von 21 Wochen	41
4.8.	Einfluss des <i>Ercc1</i> -Knockouts auf das Überleben der Versuchsmäuse	43
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>45</b>
5.1.	Einfluss des ERCC1-Defizits auf die Niere sowie der Lebensdauer	45
5.2.	Einfluss des ERCC1-Defizits auf die DNA-Reparatur und auf die Entstehung von Gewebeschäden	47
5.3.	Bedeutung eines ERCC1-Mangels für die renale Karzinogenese	48
5.4.	Verbindung zwischen DDR Signaling und NPH	49
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>58</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	58



## Abkürzungsverzeichnis

ADPKD	Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (autosomal dominant polycystic kidney disease)
ARPKD	Autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (autosomal recessive polycystic kidney disease)
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
CEP164	Centrosomal protein 164
CEP290	Centrosomal protein 290
CRE	Cre-Recombinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ERCC1	Excision repair cross-complementing 1
FANCD2	Fanconi anemia group D2
GFR	Glomerulären Filtrationsrate
IFT	Intraflagellärer Transport
JS	Joubert-Syndrom
KAP	Kinesin-associated protein
KIF	Kinesin family member
MGT	Masson Goldner Trichrom
MKS	Meckel-Gruber-Syndrom
MMEJ	Microhomology-mediated end-joining
NEK8	NIMA-related kinase 8
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Non- homologous end-joining
NPNP	Nephronophthise
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
RAD23B	UV excision repair protein
RPA	Replication protein A
SLS	Senior-Loken-Syndrom
SLX4	Structure-specific endonuclease subunit
TFIIH	Transcription factor II H
XPA	Xeroderma pigmentosum complementation group A

XPG	Xeroderma pigmentosum complementation group G
ZNF423	Zinc finger protein 423

## 1. Zusammenfassung

Die Nephronophthise (NPHP) gehört zur Krankheitsfamilie der zystischen Nierenerkrankungen und der Ziliopathien. Der renale Phänotyp der NPHP ist durch eine tubulointerstitielle Fibrose, tubuläre Zysten am kortikomedullären Übergang, eine tubuläre Atrophie und eine renale Insuffizienz gekennzeichnet. Ziliopathien sind hereditäre Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit eine Mutation in Genen darstellt, die für Proteine kodieren, die im primären Zilium oder dem Basalkörper lokalisiert sind oder an dort stattfindenden Signalwegen teilhaben. Damit haben die teilweise sehr unterschiedlichen Erkrankungen eine ähnliche Pathogenese auf Zellebene. Die NPHP gehört dabei zusammen mit der ADPKD und ARPKD und weiteren seltenen Syndromen zur Untergruppe der renalen Ziliopathien.

Zentrosome, Zilien und der Zellzyklus sind eng verbunden. Interessanterweise spielen verschiedene Proteine, die an Zilien und Zentrosome lokalisiert sind, auch eine Rolle bei der DNA Damage Repair-(DDR) Signalkaskade. Sie haben also offenbar auch nukleäre Funktionen. Zuletzt verdichteten sich die wissenschaftlichen Hinweise, dass die Akkumulation von DNA-Schäden bei der Pathogenese von Ziliopathien eine Rolle spielen könnte. Um dem weiter nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein nierenspezifisches *Ercc1*-Knockout-Mausmodell generiert. ERCC1 ist ein DNA-Reparaturenzym und Teil der Nukleotidexzisionsreparatur im DDR. Die Zielsetzung war die Auswirkung von DNA-Schäden durch den *Ercc1*-Knockout auf die Niere zu untersuchen. Außerdem sollten Erkenntnisse über den Einfluss von DNA-Schäden in der Pathophysiologie renaler Erkrankungen, insbesondere von renalen Ziliopathien, gewonnen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es in den *Ercc1*-Knockout-Mäusen vermehrt zu DNA-Schäden kommt. In der Untersuchung von älteren *Ercc1*-Knockout-Mäusen waren darüberhinaus auch histopathologischen Auswirkungen in Form von gestörter Nierenarchitektur und verschobener Kernplasmarelation nachweisbar. Zudem zeigte sich eine signifikante renale Fibrosebildung. Eine Zystenbildung wurde jedoch nicht festgestellt. Die Knockoutmäuse verloren signifikant an Körpergewicht und auch an Nierengewicht. Die Lebensspanne der Knockoutmäuse war im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduziert. Das Modell könnte die Grundlage für weitere Forschungen bilden, die idealerweise zu neuen Therapien der Nierenfibrose führen oder neue Einblicke in pathophysiologische Prozesse schafft.

## **2. Einleitung**

Die vorliegende Arbeit basiert auf der Hypothese, dass eine fehlerhafte Reparatur von DNA Schäden und dadurch fehlgeleitete Signaltransduktion ein wichtiger Faktor bei der Entstehung zystischer Nierenerkrankungen, speziell der pädiatrischen Nephronophthise (NPHP) sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurde ein Mausmodell generiert, bei dem ein wichtiger Faktor zur DNA Reparatur in Epithelzellen des distalen Nephrons ausgeschaltet ist und es dadurch zu einer Akkumulation von DNA Schädigungen kommt. In diesem Modell wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Nieren Aspekte der Pathologie der NPHP aufweisen.

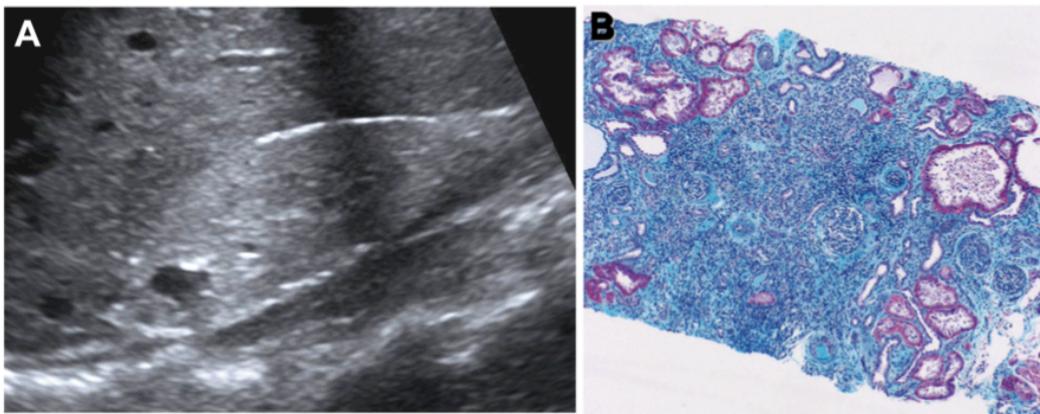
### **2.1. Nephronophthise und verwandte Ziliopathien**

Die NPHP beschreibt eine Gruppe autosomal-rezessiv vererbten Nierenerkrankungen, die durch eine tubulointerstitielle Fibrose, tubuläre Zysten am kortikomedullären Übergang, eine tubuläre Atrophie und eine renale Insuffizienz gekennzeichnet sind [1]. Die Inzidenz unterscheidet sich in Abhängigkeit vom Erhebungsland erheblich und beträgt in Kanada 1:50.000, in Finnland 1:60.000 und in den USA 1:1.000.000 [2]. Die NPHP ist die häufigste genetisch bedingte Ursache für ein terminales Nierenversagen in den ersten drei Lebensdekaden [3,4].

In Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Auftretens der terminalen Niereninsuffizienz werden vier Formen der NPHP unterschieden. Bei der infantilen Form entwickelt sich ein terminales Nierenversagen vor dem 3. Lebensjahr, bei der juvenilen durchschnittlich mit 13 Jahren, bei der adoleszenten Form mit durchschnittlich 19 Jahren und bei der adulten Form mit 30 Jahren [5-8]. Bei dem häufigsten Subtyp, der juvenilen NPHP [9], treten im Alter von ungefähr 6 Jahren zunächst mild ausgeprägte Symptome wie Polyurie, Polydipsie, sekundäre Enuresis, Anämie und Wachstumsretardierung auf [10]. Sonografisch (siehe Abbildung 1) sind kleine bis normal große, hyperechogene Nieren mit kortikomedullären Zysten erkennbar [11]. Histologisch zeigt sich eine charakteristische Trias bestehend aus kortikomedullären Zysten, gestörter Integrität der Basalmembran und tubulointerstitieller Fibrose [12]. Die adoleszente und adulte NPHP unterscheiden sich vor allem durch das spätere Manifestationsalter, ähneln aber der juvenilen Form im Hinblick auf die Symptomatik und die histologischen bzw. sonografischen Befunde [13]. Im Vergleich dazu nimmt die infantile NPHP eine Sonderstellung ein. Einerseits präsentieren sich die Nieren makroskopisch vergrößert, andererseits fehlen die typischen Veränderungen an der tubulären Basalmembran [14].

Treten bei einer NPHP extrarenale Symptome auf, werden diese Syndrome zu den „Nephronophthisis-related ciliopathies“ (NPHP-RC) gezählt. Mögliche extrarenale Symptome

umfassen eine retinale Degeneration, zerebelläre Hypoplasien, eine Leberfibrose, ein *Situs inversus* oder eine mentale Retardierung [4]. Das Auftreten einer juvenilen NPHP zusammen mit einer tapetoretinalen Degeneration wird als Senior-Loken-Syndrom (SLS) bezeichnet und betrifft etwa 10 % aller Patienten mit NPHP [15]. Das Joubert-Syndrom (JS) ist ebenfalls mit der juvenilen NPHP assoziiert. Diese autosomal-rezessive Erkrankung ist durch ein retinales Kolobom und eine Hypo- oder Aplasie des Kleinhirnwurms mit dem sogenannten „molar tooth sign“ im Magnetresonanztomogramm charakterisiert [16]. Eine noch schwerere Form der NPHP-RC ist das ebenfalls autosomal-rezessiv vererbte Meckel-Gruber-Syndrom (MKS). Das heterogene Krankheitsbild ist in den meisten Fällen bereits perinatal letal. Typisch sind neben der Bildung von Nierenzysten eine Enzephalozele, Leberzysten, kongenitale Herzfehler, pulmonale Hypoplasien oder eine Polydaktylie [17]. Das Bardet-Biedl-Syndrom (BBS) ist eine komplexe, multisystemische, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die klassischerweise durch polyzystische Nieren, mentale Retardierung, Retinitis pigmentosa, Hypogonadismus, Adipositas und Polydaktylie gekennzeichnet ist [18,19]. Darüber hinaus können auch Skelettmalformationen zusammen mit einer NPHP auftreten. Dazu zählt das Saldino-Mainzer-Syndrom, bei dem es zusätzlich zu Zapfenepiphysen der Metakarpalia, und einer *Retinitis pigmentosa* kommt [20].



**Abbildung 1: Morphologie der Nephronophthose [Abbildung aus Hildebrandt et al 2009]** A) Ultraschall der Niere mit erhöhter Echogenität, Verlust der kortikomedullären Differenzierung und kortikomedullären Zysten. B) Renale Histologie der NPHP. Die Biopsie zeigt tubuläre Nierenzysten, gestörte Integrität der Basalmembran und tubulointerstitielle Fibrose. [4]

## 2.2. NPHP als renale Ziliopathie

### 2.2.1. Weitere polyzystische Nierenerkrankungen: ADPKD und ARPKD

Polyzystische Nierenerkrankungen unterscheiden sich im Manifestationsalter, in der Schwere der Erkrankung, in der Progredienz, in der Lokalisation der Zysten und in den extrarenalen Symptomen. Neben der NPHP gehören zu den genetisch bedingten Formen die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) und die autosomal-rezessive polyzystische Nierenerkrankung (ARPKD) [21]. Die ADPKD ist mit einer Inzidenz von etwa 1:1000 die häufigste vererbte zystische Nierenerkrankung [22]. Im Gegensatz zur NPHP sind die Nieren vergrößert und zeigen über die gesamte Niere verteilte Zysten in typischerweise wesentlich größerer Zahl [23]. Die meist im Erwachsenenalter auftretende ADPKD weist neben renalen Zysten außerdem Leber- und Pankreaszysten, eine arterielle Hypertension, eine Nephrolithiasis und ein erhöhtes zerebrovaskuläres Risiko durch Aneurysmenbildung auf. In etwa 80 % der Fälle lassen sich die ursächlichen Mutationen im *PKD1*-Gen, das für das transmembranäre Protein Polycystin-1 kodiert, und in etwa 20 % in dem für Polycystin-2 kodierenden *PKD2*-Gen nachweisen [24].

Die ARPKD betrifft mit einer Inzidenz zwischen 1:10.000 und 1:40.000 deutlich weniger Patienten [25]. Die meist durch eine Mutation im *PKHD1*-Gen auf Chromosom 6 ausgelöste Erkrankung führt zu überwiegend von den Sammelrohren ausgehenden Nierenzysten [26]. Das *PKHD1*-Gen kodiert für das Protein Fibrocystin, das im primären Zilium lokalisiert ist [27]. Die ARPKD wird meist am Ende der Schwangerschaft oder bei der Geburt diagnostiziert. 30–50 % der betroffenen Kinder versterben kurz nach der Geburt, vor allem an einer ausgeprägten Lungenhypoplasie. Außerdem zeigt das Krankheitsbild typischerweise eine kongenitale Leberfibrose, sowie stark vergrößerte Nieren mit Einengung des Thorax, Leber- und Pankreaszysten und weitere schwere extrarenale Manifestationen [28].

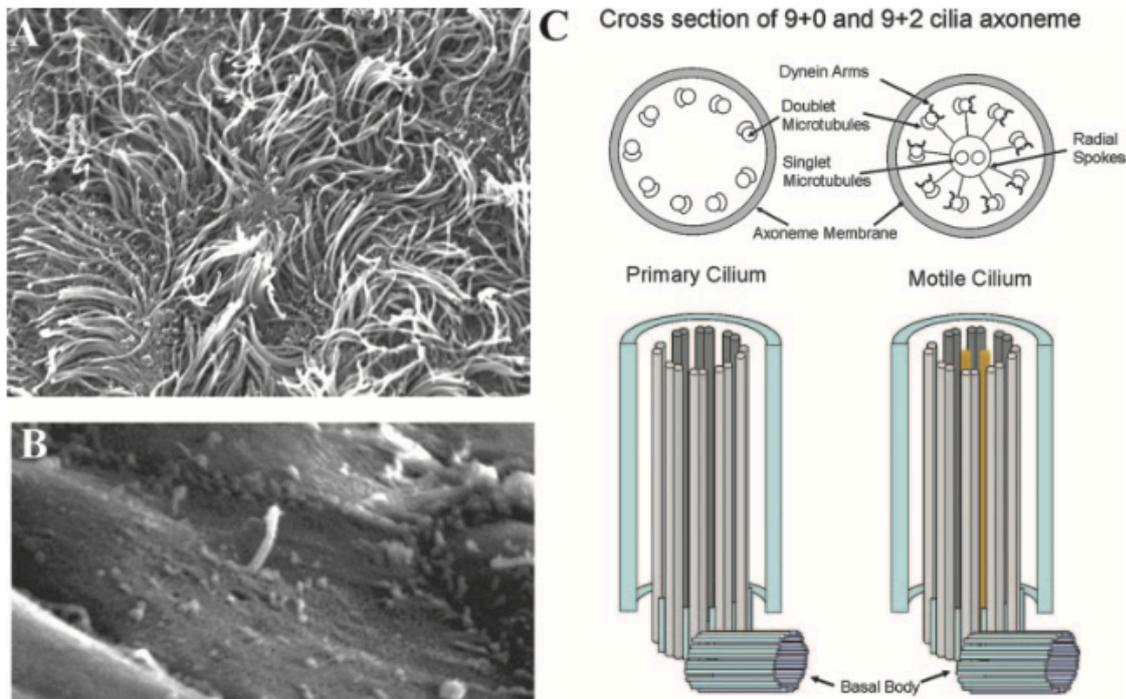
### 2.2.2. Ziliopathien

Fast alle bei den (poly-) zystischen Nierenerkrankungen mutierten, krankheitsauslösenden Gene (*PKD1*, *PKD2*, *PKHD1*, *NPHP1-20*, ...) kodieren für Proteine, die im primären Zilium oder dem Basalkörper (modifizierte Zentriole) lokalisiert sind oder an dort stattfindenden Signalwegen teilhaben. Damit haben die teilweise sehr unterschiedlichen Erkrankungen eine ähnliche Pathogenese auf Zellebene [29]. Zilien sind antennenartige Ausstülpungen der Zelle, die ein Skelett aus Mikrotubuli haben und von der Plasmamembran bedeckt sind.

Im Allgemeinen werden Zilien in motile und nicht-motile (primäre) Zilien unterteilt (siehe Abbildung 2). Motile Zilien werden von Zellen meist als Bündel vieler Einzelzilien ausgebildet und spielen bei physiologischen Prozessen wie der Clearance der Atemwege oder dem Liquorfluss eine Rolle. Flagellen von Spermien zählen ebenfalls zu den motilen Zilien. Eine

Dysfunktion motiler Zilien führt folglich u.a. zu einer respiratorischen Dysfunktion, Sterilität oder einem Hydrozephalus [30]. Primäre Zilien sind evolutionär konservierte sensorische Organellen, die von der apikalen Membran fast aller Zelltypen in den Extrazellulärraum ausgehen und optische, osmotische, chemische, olfaktorische sowie mechanische Stimuli detektieren [29]. Außerdem spielen primäre Zilien bzw. deren Proteine eine zentrale Rolle im Wnt-Signalweg [31], im Hedgehog-Signalweg [32], im Hippo-Signalweg [33] sowie im Zellzyklus und in der Zelldifferenzierung [34]. Die Zilien bestehen aus einem Mikrotubulus-Zytoskelett, das am Basalkörper verankert ist und von einer ziliären Membran umgeben ist. Das Mikrotubulus-Skelett der primären, nicht motilen Zilien beinhaltet neun äußere Mikrotubuli-Doublers, während die motilen zusätzlich noch ein inneres Mikrotubulus-Doublet aufweisen [35]. In den Zilien findet keine Proteinsynthese statt. Zur Versorgung des Ziliums notwendige Substanzen müssen zunächst die sogenannte Transitionszone (Bereich zwischen dem Basalkörper und dem ziliären Axonema) passieren und gelangen dann mittels intraflagellarem Transport zur Zilienspitze [29,36]. Die Transitionszone fungiert als Barriere, indem sie die Passage ziliärer Proteine reguliert [37]. Der anterograde Transport in Richtung Zilienspitze wird durch das heterotrimere Kinesin-2, bestehend aus den Motoruntereinheiten Kinesin family member 3A und 3B (KIF3A und KIF3B) und dem Kinesin-associated protein (KAP) vermittelt, während der retrograde Transport von dem zytoplasmatischen Dynein 1b abhängt [38].

Die Entdeckung der Lokalisation von Nephrocystin-1 und Inversin an primären Zilien renaler Tubuluszellen und die Mutation im Transportprotein Intraflagellar Transport Protein 88 (IFT-88/Polaris) als Auslöser einer zystischen Nierenerkrankung waren um die Jahrtausendwende mit die ersten Hinweise für die Theorie der renalen Ziliopathien, zu denen auch die NPHP zählt [5,39].



**Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Bilder und Struktur der motilen und nicht-motilen (primären) Zilien.**

Elektronenmikroskopische Aufnahme von motilen Zilien in den lateralen Ventrikeln (A) und eines einzelnen primären Ziliums auf der Extremitätsknospe eines Mäuseembryos (B).

Aufbau der Zilien. Motile Zilien (*rechts*) bestehen aus 9 Mikrotubuli-Doublets, die 2 innere Single-Mikrotubuli umgeben. Bei den primären Zilien (*links*) fehlen die inneren beiden Mikrotubuli, sowie die radialen Speichen und die Dyneinarme (C). [21]

### 2.3. NPHP-Gene kodieren für ziliäre Proteine

Die NPHP gehört zusammen mit der ADPKD und ARPKD und weiteren seltenen Syndromen zu den hereditären zystischen Nierenerkrankungen und renalen Ziliopathien. 1951 wurde die NPHP erstmalig beschrieben. 1998 wurde die Mutation im *NPHP1*-Gen auf Chromosom 2q13 als Auslöser für die Entwicklung der juvenilen Form der NPHP benannt. Inzwischen wurden weitere Gene mit der Pathogenese anderer NPHP-Subtypen in Zusammenhang gebracht [23,40,41]. Wie ADPKD und ARPKD wird auch die NPHP monogenetisch vererbt, sodass bereits die Mutation in nur einem Gen zur vollen Ausprägung der Krankheit führt [1,4]. Die Mutation im *NPHP1*-Gen führt zu einem Funktionsverlust des kodierten Nephrocystin-1, das in der ziliären Transitionszone lokalisiert ist und bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Signalübertragungen eine wichtige Rolle spielt [4,42,43]. Lokalisiert an Zell-Zell-Kontakten und in der ziliären Transitionszone erfüllt Nephrocystin-1 eine Ankerfunktion für weitere NPHP Proteine [44].

Bis heute wurden 20 mutierte NPHP-verursachende Gene entdeckt (siehe Tabelle 1). Auch ihre Funktion und Lokalisation ist in Teilen erforscht.

**Tabelle 1: Mutierte Gene bei der isolierten Nephronophthise [45]**

<b>Gen</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Protein</b>	<b>Lokalisation im Nukleus</b>
<i>NPHP1</i>	2q12.3	Nephrocystin-1	Nein
<i>NPHP2/INVS</i>	9q21-22	Inversin	Nein
<i>NPHP3</i>	3q22.1	Nephrocystin-3	Nein
<i>NPHP4</i>	1p36.31	Nephroretinin	Nein
<i>NPHP5/IQCB1</i>	3q13.33	IQ motif containing B1	Nein
<i>NPHP6/CEP290</i>	12q21.32	Centrosomal protein 290	Ja
<i>NPHP7/GLIS2</i>	16p13.3	GLI similar 2	Ja
<i>NPHP8/RPGRIP1L</i>	16q12.2	RPGRIP1-like	Nein
<i>NPHP9/NEK8</i>	17q11.2	NIMA-related kinase 8	Ja
<i>NPHP10/SDCCAG8/SLSN7</i>	1q43-q44	Serologically defined colon cancer antigen 8	Ja
<i>NPHP11/TMEM67/MKS3</i>	8q22.1	Transmembrane protein 67	Nein
<i>NPHP12/TTC21B/JBTS11</i>	2q24.3	Intraflagellar transport protein 139	Nein
<i>NPHP13/ WDR19</i>	4p14	WD repeat domain	Nein
<i>NPHP14 /ZNF423</i>	16q12.1	Zinc finger protein 423	Ja
<i>NPHP15/ CEP164</i>	11q23.3	Centrosomal protein 164	Ja
<i>NPHP16/ ANKS6</i>	9q22.33	ANKS6	Nein
<i>NPHP17/ IFT172</i>	2p23.3	IFT protein 172	Nein
<i>NPHP18 /CEP83</i>	12q22	Centrosomal protein 83	Nein
<i>NPHP19/ DCDC2</i>	6p22.3	Doublecortin domain-containing protein 2	Nein
<i>NPHP20/ MAPKBP1</i>	15q15.1	Mitogen-activated protein kinase binding protein 1	Ja

#### **2.4. DNA-Damage-Response (DDR) als Netzwerk zellulärer Signalwege**

In jeder der etwa  $10^{13}$  Zellen im menschlichen Körper kommt es immer wieder zu DNA-Läsionen. Mit dem DDR-Signalweg verfügt der Mensch über einen Mechanismus, mit dessen Hilfe Zellen Veränderungen ihrer DNA-Struktur beseitigen und die Integrität des Genoms erhalten können. DNA-Schäden entstehen unter anderem durch Nebenprodukte

des Metabolismus (z. B. reaktive Sauerstoffspezies), bei der DNA-Replikation oder bei Exposition gegenüber Umweltfaktoren (z. B. Zigarettenrauch, UV-Licht) .

Die DDR ist ein komplexes Netzwerk zellulärer Prozesse, das die Erkennung der DNA-Schäden, die DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrollpunkte beinhaltet [46]. Werden DNA-Schäden nicht adäquat repariert, kommt es zu Sequenzänderung der DNA (Mutationen) und möglicherweise zu einer Instabilität des Genoms und fehlerhaften Proteinen. Die möglichen Folgen sind Krankheiten (z. B. Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, Immundefizite oder ein frühzeitiges Altern) [47].

## **2.5. DNA-Damage assoziiert mit Ziliopathien**

Die DDR ist eine multisystemische Signalkaskade im Nukleus. Zentrosome, Zilien und Zellzyklus sind eng verbunden und verschiedene Proteine, die für den DDR erforderlich sind, sind auch an den Zentrosomen lokalisiert und nehmen somit eine Doppelrolle ein. Eine Mutation an dieser Stelle führt daher nicht nur auf ziliärer Ebene, sondern auch im DDR zu Veränderungen. Sieben von 20 der NPHP-assoziierten ziliären Proteinen (siehe Tabelle 1), das heißt NIMA-related kinase 8 (NEK8), Zinc finger protein 423 (ZNF423), Centrosomal protein 164 (CEP164), Centrosomal protein 290 (CEP290), SDCCAG8 (PMID: 24722439), MAPKB1 (PMID: 28089251) und GLIS2 (PMID: 27181777), beeinflussen den DDR-Signalweg. Allerdings ist das Zusammenspiel zwischen DDR und Ziliopathien noch nicht vollständig klar. Beispielweise bleibt bisher unklar, ob und in welchem Ausmaß der veränderte DDR zu renalen Zysten und Fibrose beiträgt [48-51].

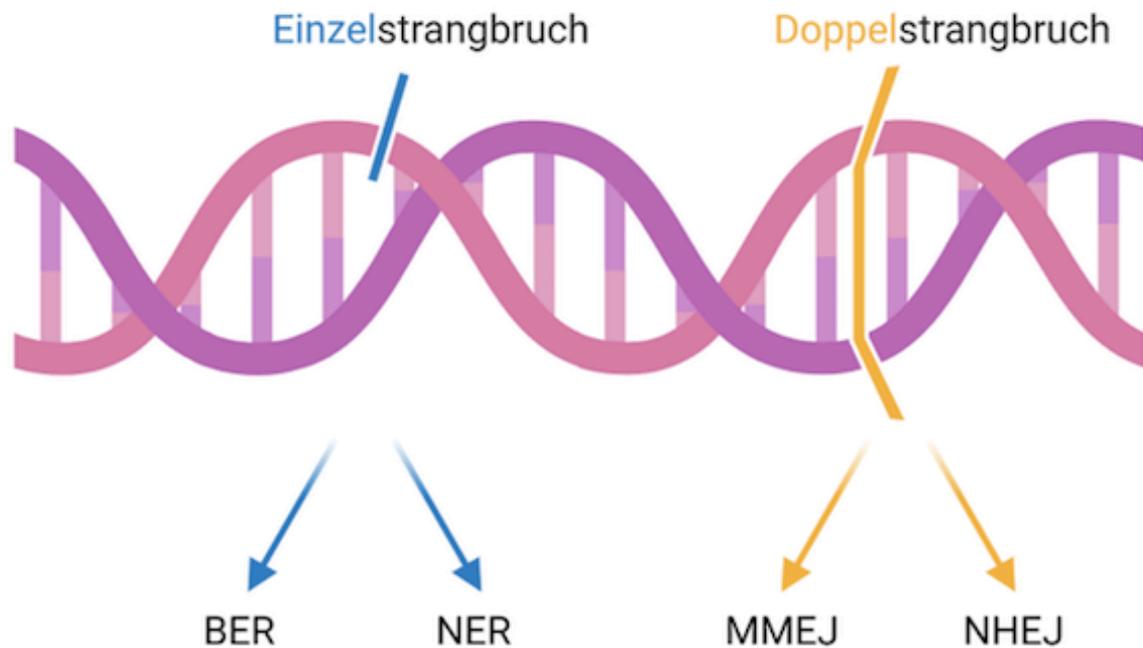
## **2.6. Mechanismen der DNA-Reparatur**

Die Diversität der DNA-Schäden erfordert multiple Reparaturmechanismen (siehe Abbildung 3). Bei den meist aufwendigen Reparaturvorgängen interagieren verschiedenste Proteine miteinander [47]. Allerdings werden nicht alle DNA-Schäden repariert, sondern können während der DNA-Replikation durch spezielle Polymerasen mit weniger stringenter Basenpaarung umgangen werden und zu einer Veränderung der Basenabfolge der DNA führen [52].

Bei der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden „bulky lesions“ in der DNA-Struktur erkannt, die die Helixstruktur der doppelsträngigen DNA verändern und die Replikation oder Transkription erschweren. Die transkriptionsgekoppelte NER und die globale NER unterscheiden sich lediglich im Mechanismus der Schadenserkenung. Bei der NER wird der Schaden als 24–30 Basen langes Oligonukleotid herausgeschnitten. Der Abschnitt wird anschließend neusynthetisiert und ligiert. Vererbte autosomal-dominante Defekte in der Signalkaskade der NER sind ursächlich für Erkrankungen wie Xeroderma pigmentosum, Cockayne-Syndrom oder die Trichothiodystrophie [53,54].

Durch Oxidation, Desaminierung oder Alkylierung hervorgerufene DNA-Basenveränderungen werden durch die Basenexzisionsreparatur behoben [55]. Die Mismatch-Reparatur schneidet falsch kombinierte Basen („mismatches“) und Insertions- und Deletionsschleifen mit Hilfe eines Einzelstrangsnitts aus der DNA heraus. Anschließend wird der Abschnitt resynthetisiert und ligiert [56].

DNA-Doppelstrangbrüche gelten als besonders schädlich für die genomische Integrität, da sie zur Umstrukturierung des Genoms führen können. Die Reparatur der Doppelstrangbrüche kann durch homologe (Microhomology-mediated end-joining, MMEJ) oder nicht-homologe (non-homologous end-joining, NHEJ) Reparaturmechanismen erfolgen [57]. Die einzelnen Reparatursysteme arbeiten nicht streng voneinander getrennt, sondern interagieren untereinander [56].



**Abbildung 3: DNA-Reparaturmechanismen bei Einzel- und Doppelstrangbrüchen** [Eigene Darstellung, Created with BioRender.com]

BER = Basenexzisionsreparatur, NER = Nukleotidexzisionsreparatur, NHEJ = non-homologous end-joining, MMEJ = Microhomology-mediated end-joining).

Die obige Abbildung zeigt schematisch die verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen für DNA-Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche. Einzelstrangbrüche werden vorrangig durch die BER und NER repariert, während bei Doppelstrangbrüchen die Mechanismen des MMEJ und NHEJ aktiv werden.

### 2.7. ERCC1 als Bestandteil des Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Das humane „Excision repair cross-complementing 1“ (*ERCC1*) war 1984 das erste durch positionelle Klonierung entdeckte DNA-Reparaturenzym [58]. Das für *ERCC1* kodierende Gen, das aus 10 Exons besteht und 15 Kilobasen (kb) umfasst, befindet sich beim Menschen auf Chromosom 19q13.32 [59]. Zusammen mit der DNA repair endonuclease XPF (*ERCC4*) bildet *ERCC1* den *ERCC1*-XPF-Enzymkomplex. Diese zweiteilige Nuklease erkennt spezifisch die Kreuzung einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA und schneidet die DNA an einer solchen Kreuzung an der 5'-Seite [60]. XPF führt bei dem Prozess den Schnitt durch, während *ERCC1* die DNA bindet und XPF stabilisiert [61].

Der *ERCC1*-XPF-Komplex spielt bei der NER eine zentrale Rolle. Dabei kooperiert er mit anderen Proteinen wie excision repair protein RAD23 homolog B (*RAD23B*), xeroderma

pigmentosum complementation group A (XPA), *replication protein A* (RPA), *transcription factor II H* (TFIH) und *xeroderma pigmentosum group G* (XPG) [62]. Während der ERCC1-XPF-Komplex den 5'-Schnitt durchführt, ist XPG für den 3'-Schnitt zuständig. Der entfernte Schaden wird danach durch eine neusynthetisierte, fehlerfreie Sequenz ersetzt [63]. ERCC1-XPF-defiziente Zellen sind anfälliger gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen, was die Rolle des Komplexes auch bei der Doppelstrang-Reparatur belegt [64]. ERCC1-XPF entfernt hierbei die nicht-homologen 3'-Reste der DNA-Enden vor der Strangverknüpfung, was sowohl bei der homologen Reparatur als auch der nicht-homologen Reparatur von Bedeutung ist [65,66]. Außerdem ist der ERCC1-XPF-Komplex bei der Reparatur vernetzter DNA relevant, bei der gegenüberliegende Nukleotide eine kovalente Bindung eingehen und die Replikation und Transkription behindern. Wichtig ist der Komplex in diesem Kontext für den initialen „aushakenden“ (unhooking) Schritt, aber auch für nachgeschaltete Prozesse der Reparatur der vernetzten DNA [67]. Der ERCC1-XPF-Komplex interagiert dabei mit dem Protein Structure-Specific Endonuclease Subunit (SLX4) in Abhängigkeit von der Ubiquitinierung von Fanconi anemia group D2 (FANCD2) [68]. ERCC1-XPF-defiziente Zellen sind besonders sensitiv gegenüber Reagenzien, die eine Vernetzung der DNA verursachen. Dazu zählen die Medikamente Cisplatin, Psoralen und Mitomycin C [69].

Weder in Mäusen noch in Menschen scheint eine komplette Deletion des *ERCC1*-Gens mit dem Leben vereinbar [63]. Einige vererbte Erkrankungen sind mit Mutationen in den für den ERCC1-XPF-Komplex kodierenden Genen assoziiert. Dazu zählen eine Form der *Xeroderma pigmentosa*, das Cockayne-Syndrom und die Fanconi-Anämie [70]. Punktmutationen im *ERCC1*-Gen können zu einem früh beginnenden Cockayne-Syndrom oder dem Cereo-Oculo-Facio-Skelett-(COFS)-Syndrom führen [71]. Weiter wird ERCC1 mit der Karzinogenese und mit dem Therapieerfolg von DNA-Vernetzungen verursachenden Chemotherapeutika (z. B. Cisplatin) in verschiedenen Tumorentitäten in Verbindung gebracht. Eine fehlende Expression von ERCC1 im Tumor erweist sich als prognostisch günstiger Marker [72-74]. *Erc1*-defiziente Mäuse altern schneller und leben kürzer, wie im folgenden Abschnitt erläutert wird [75].

## 2.8. *Erc1*-Knockout-Mausmodelle

*Erc1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mausmodelle wurden von verschiedenen Laborteams generiert [76]. McWhir et al. schufen einen Knockout, indem sie das Exon 5 des *Erc1*-Gens veränderten und somit eine stark verkürzte messenger Ribonukleinsäure (mRNA) ohne die Sequenzen der Exons 5–10 generierten [77]. Weeda et al. etablierten einen weiteren Knockout (*Erc1*<sup>Δ/Δ</sup>), indem sie eine Neomycin-Resistenzkassette in das Exon 7 inserierten. Ausserdem wurde eine hypomorphe Allel generiert mit einem Stoppcodon an Position 292, das zu einer C-terminalen Trunkation des Proteins führt (auch Delta 7 genannt). Der

Nachweis der mRNA sprach für eine normale Expression des verkürzten Proteins. Allerdings ist seine Funktion als DNA-Reparaturenzym beeinträchtigt, da der entfernte C-terminale Bereich für die Interaktion mit XPF essenziell ist [78]. Dollè et al. entwickelten einen Hybrid-Genotyp, indem sie die *Ercc1*<sup>-/-</sup> und *Ercc1*<sup>\*292</sup> Mäuse kreuzten und Mäuse mit dem Genotyp *Ercc1*<sup>-/292</sup> generierten. Bei den *Ercc1*<sup>-/292</sup>-Mäusen war die mittlere Lebenspanne, das Körpergewicht sowie das Gewicht verschiedener Organe, unter anderem der Niere, reduziert. Außerdem konnten charakteristische histopathologische altersabhängige Veränderungen an der Niere (Anikaryose, tubuläre Degeneration) beobachtet werden [79].

Bei dem in der vorliegenden Studie genutzten Mausmodell von Doig handelt es sich um einen konditionalen (gefloxten) Knockout (siehe Abbildung 4), der ursprünglich zur Analyse der Entwicklung von UV-induzierten Hauttumoren generiert wurde. Die Expression der Cre (causes-recombination)-Rekombinase stand dabei unter der Kontrolle des Keratin 5 (K5) Promotors. Die Inaktivierung des *Ercc1*-Gens erfolgte in diesem Modell durch die Entfernung der von LoxP-Sequenzen flankierten Exons 3–5 durch die Cre-Rekombinase. Dabei kommt es zu keinem Frameshift, da die loxP-Stellen allesamt in den Introns lagen. Der Knockout wurde von Doig et al. auf der DNA-Ebene bewiesen, indem Southern Blot mit dem Gewebe durchgeführt wurde, in dem Cre aktiv ist. Eine Validierung auf der Protein-Ebene wurde nicht durchgeführt [80].

Ein weiterer konditionaler *Ercc1*-Knockout von Selfridge et al. unter der Kontrolle des Tyrosinase-Promotors dient der Analyse des malignen Melanoms. Die Mäuse zeigen einen Funktionsverlust von ERCC1 in den Melanozyten [81].

## 2.9. Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, in welchem Maße die Akkumulation von DNA-Schäden bei der Pathogenese von Ziliopathien eine Rolle spielen. Die Arbeit beschäftigt sich mit dem Protein *Ercc1*, das eine zentrale Rolle bei der NER im Rahmen des DDR-Signalwegs spielt [54]. Der DDR-Signalweg wurde auch mit der Pathogenese von Ziliopathien in Verbindung gebracht.

Bislang wurden komplette *Ercc1*-Knockouts, hypomorphe *Ercc1*-Varianten und gewebespezifische *Ercc1*-Knockouts generiert [79,80], allerdings fehlen Modelle mit einem spezifischen *Ercc1*-Knockout in den tubulären Epithelzellen des distalen Nephrons. Dieser spezifische Knockout würde eventuell Rückschlüsse auf eine Rolle des DDR-Signalweges bei der Entstehung von Zystennieren und/oder einer renalen Fibrose erlauben. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist daher, ein solches gewebspezifisches *Ercc1*-Knockout-Mausmodell zu generieren und die Folgen des *Ercc1*-Verlustes im renalen Tubulusepithel zu analysieren.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien & Laborbedarf

50-kb-DNA-Marker	PeqLab
0,9 % Perjodsäure	Sigma
0,9 % Schiffssches Reagenz	Merck
1 kb DNA Marker	PeqLab
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Thermoscientific
50 kb DNA Marker	BioLabs
Annilineblau	Roth
Avidin	Vector
Biotin	Vector
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Eindeckmedium Prolong Gold/Diamond mit DAPI	Thermofisher
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid 1 %	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Formalin	Braun
Glycerol	Roth
GoTaq Hot Start	Promega
Hämatoxylin	Sigma
Histomount	Thermofisher
Isopropanol	Roth
KOD Polymerase	Merck
Methanol	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Orange G	Roth
Phosphorwolframsäure	Sigma

Ponceau	Sigma
Säurefuchsin	Roth
Xylol	Roth
dNTP (Desoxyribonukleosid-Triphosphate)	Thermo Fisher

### 3.1.2. Puffer und Lösungen

5 x Green Flexi Buffer
Base Solution
Citrat-Puffer
Eosin-Lösung
HCL-Lösung
Neutralisationslösung
PBS Puffer
Permeabilitätslösung 0,1% Triton-X
Sirius-Red-Lösung
TAE-Puffer Ansatzlösung
TAE-Puffer Gebrauchslösung
TBS-Puffer 10 mM Tris/HCl, pH 7,4. 150 mM NaCl.

### 3.1.3. Kits und Verbrauchsmaterialien

ABC-Kit	Vectastain
Pipettenspitzen	Tip One
Falcon-Röhrchen	Greiner
Gelkassetten	Novex
Mikroreaktionsgefäß	Eppendorf
PAP Pen	Daido-Sangyo
SB Einwegklingen Typ 819	Leica
Silanisierte, adhäsive Objektträger	Labsolute
Sterile Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Stripetten (5 ml, 10 ml, 15 ml)	LMS (Corning)

Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann
--------------------------	----------

### 3.1.4. Primer

Primer	Zweck	Sequenz 5'-3'
ERCC1-432E	PCR	TGCAGAGCCTGGGGAAGAAGTTCGC
ERCC1-rp-460	PCR	GCAAGGGCTCTACCAATGAGCCAT
ERCC1-LP499	PCR	TCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCC
Beta-globin-fp	PCR	TGCTCACACAGGATAGAGAGGGCAGG
Beta-globin-rp	PCR	GGCTGTCCAAGTGATTCAGGCCATCG
CRE fp	PCR	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
CRE rp	PCR	GGACATGTTTCAGGATCGCCAGGCG

### 3.1.5. Antiörper/Antiseren

Antigen	Typ	Gewonnen aus	Hersteller	Katalognummer
$\gamma$ H2AX Y_545	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling	2577

Alle Antikörper wurden zur Anwendung gemäß Herstellerangaben in entsprechenden Puffern und versuchsabhängig in verschiedenen Konzentrationen verdünnt.

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Generierung von Knockout-Mäusen**

Mit Hilfe der Modifikation des Genoms über sequenzspezifische Rekombinationssysteme können Knockout-Mäuse generiert werden. Die bekanntesten Vertreter solcher Systeme sind das Flp/FRT-System und das Cre/LoxP-System, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Beide Systeme basieren auf der Funktion von Tyrosinrekombinasen.

Das Cre/LoxP-System wurde aus dem Bakteriophagen P1 isoliert. Das katalysierende Enzym ist die Rekombinase Cre, die keine Co-Faktoren benötigt. Das Enzym katalysiert die Rekombination zwischen zwei spezifischen DNA-Abschnitten, die sogenannten LoxP-Sequenzen. Der Ziel-DNA-Abschnitt wird von den beiden LoxP-Sequenzen eingerahmt. Die Art der Rekombination hängt von der Richtung der LoxP-Sequenzen ab. Gleichgerichtete LoxP-Sequenzen führen unter Verbleib einer intakten LoxP-Sequenz zur Exzision des dazwischenliegenden DNA-Abschnitts und damit zur Ausschaltung der Genfunktion. Bei entgegengesetzt orientierten LoxP-Sequenzen kommt es dagegen zu einer Inversion, das heißt zu einer Umkehrung der DNA-Sequenz.

Die permanente Ausschaltung einer Genfunktion kann letal für den Embryo sein, sodass Untersuchungen zur Auswirkung nicht mehr möglich sind. Beim sogenannten „konditionalen Gene Targeting“ werden Gene unter Verwendung spezifischer Rekombinationssysteme zeit- oder/und gewebespezifisch ausgeschaltet. Die Nutzung spezifischer Promotoren für die Cre-Expression erlaubt ein Abschalten des Zielgenes ausschließlich in bestimmten Zellen bzw. nach bestimmten Signalen. In anderen Zellen bzw. ohne diese Signale wird die Rekombinase nicht exprimiert und das Zielgen bleibt aktiv.

Bei der Generierung eines Mausmodells wird die DNA-Zielsequenz „gefloxt“, d.h. auf beiden Seiten der Zielsequenz werden LoxP-Sequenzen eingeführt. Diese Mäuse exprimieren die Zielsequenz unverändert. Erst bei Verpaarung mit transgenen Cre-exprimierenden Mäusen kommt es zur Exzision des Gens [82]. Die Generierung unseres konditionales *Ercc1*-Knockout Mausmodells wird unter 4.1. beschrieben.

### **3.2.2. Analyse der Nierenfunktion d. er Knockoutmäuse**

Um neben dem Phänotyp der Nieren auch die Funktion der Nieren zu beurteilen, wurden die Nierenparameter Kreatinin und Harnstoff im Blut der Mäuse im Alter von 8 Wochen und 21 Wochen bestimmt. Kreatinin ist ein wichtiger Nierenretentionsparameter, der Rückschlüsse auf eine etwaige Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zulässt [83]. Als Endprodukt des Aminosäuren-Stoffwechsels wird Harnstoff über die Niere im Urin ausgeschieden. Dieser Parameter dient zur Abschätzung der Nierenfunktion vor allem bei

stärker geschädigten Nieren. Die Laboranalysen wurden durch das Zentrallabor der Uniklinik Köln durchgeführt und erfolgten in unverdünntem Blutserum [84].

### 3.2.3. Genotypisierung

Zur Genotypisierung wurde den Mäusen ein etwa 2-3 mm langes Schwanzstück abgeschnitten. Das Mindestalter hierfür betrug 2 Wochen. Alternativ wurde Material von der Ohrmarkierung verwendet. Das Material wurde zur Vorbereitung der Genotypisierung in „Base solution“ bei 95 °C gekocht, für 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe einer Neutralisationslösung weiter auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde als DNA-Template bei der Polymerase-chain-reaction (PCR) eingesetzt. [85]

### 3.2.4. Polymerase-chain-reaction (PCR)

Die von Mullis et al. 1997 vorgestellte PCR ist eine Methode zur in vitro Amplifikation von spezifischen Nukleinsäure-Fragmenten. Die PCR besteht aus einer repetitiven Abfolge von bestimmten Schritten (siehe Tabelle 3). Zuerst erfolgt die thermische Denaturierung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge, danach die Hybridisierung spezifischer Oligonukleotide an die DNA und eine Elongation des neuen DNA-Stranges mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase. Durch zyklische Repetition dieses Vorgangs kommt es zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA [86]. Primersequenzen sind unter 2.4 aufgeführt.

**Tabelle 2: Polymerase-chain-reaktion (PCR) – Ansätze und Standardprotokoll**

	<b>Volumen CRE</b>	<b>ERCC1 (wt und tg)</b>	<b>Volumen</b>
DNA-Template	2,5 µg	DNA-Template	2 µg
Forward Primer	1,25 µg (2x)	Primer Mix 1 10 pM	1 µg
Reverse Primer	1,25 µg (2x)	Primer Mix 2 10 pM	1 µg
5 x GreenFlexiBuffer	5 µg	RedTaq	10 µg
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1,5 µg	ddH <sub>2</sub> O	6 µg
dNTP 25 mM	0,2 µg		
Taq Polymerase	0,2 µg		
ddH <sub>2</sub> O	10,6 µg		
Totale Volumen	25 µg	Totale Volumen	20 µg

	<b>CRE</b>	<b>ERCC1</b>
Denaturierung	95°C 3 min	95°C 5 min
Denaturierung	94 °C 45 s	95 °C 1 min
Hybridisierung	59 °C 1 min	60 °C 1 min
Elongation	72°C 45 s; 30 x repeat	72 °C 1,5 min; 30 x repeat
Elongation	72°C 10 min	72 °C 10 min
Kühlung	10 °C ∞	15°C ∞

### 3.2.5. Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR werden die amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese (2 %iges Agarosegel mit Ethiumbromid) analysiert. Als Marker diente ein 50-kb-DNA-Marker. 5 µl des PCR-Produktes wurden neben dem Marker in die Geltaschen aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem Puffer mit Ethidiumbromid. Die zwischen die Basen der DNA interkalierende Ethidiumbromid färbt die DNA im UV-Licht.

Bei der *CRE*-Genotypisierung zeigten homozygote *CRE*-positive Mäuse eine Bande bei 269 bp, Wildtyp-Tiere keine Bande und heterozygote Tiere eine Bande bei 494 bp. Bei der *ERCC1*-Genotypisierung zeigten Wildtyp-Tiere eine Bande bei 550 bp, homozygote Tiere ein Band bei 500 bp und heterozygote Tiere beide Banden. [86]

### 3.2.6. Paraffineinbettung und Schnittpräparation

Zur Herstellung der Gewebeschnitte wurden formalin-fixierte Mäusenieren verwendet. Für eine ausreichende Schnittfestigkeit wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet.

Vor der Einbettung wurden die Mäusenieren median mit einem Skalpell sagitalisiert. Die Nieren wurden anschließend in Metallförmchen mit Paraffin überschichtet. Nach der Aushärtung bei Raumtemperatur wurden die Paraffinblöcke zum Schneiden auf einer -20 °C Kälteplatte, die an dem Rotationsmikrotom befestigt war, gelegt. Die angefertigten Schnitte waren 1-2 µm dick. Um Verklebungen zu vermeiden, wurden die Schnitte in ein auf 40 °C temperiertes Wasserbad überführt. Abschließend wurden die Gewebsschnitte auf Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte getrocknet.

### 3.2.7. PAS-Staining

Das Prinzip der Perjodsäure-Schiff-Reaktion basiert auf der Darstellung von zwei benachbarter Aldehydgruppen mittels fuchsinschwefeliger Säure.

Davor werden die Kohlenhydrate mit Hilfe der Perjodsäure zu Aldehydgruppen hydrolysiert.

Diese histochemische Methodik färbt Kohlenhydrate wie etwa Glykoproteinen, Glykogen, Glykolipiden und Mukopolysaccharide magentarot, da die Aldehydgruppen mit dem

Schiff'schen Reagenz diesen Farbkomplex bilden, und die Zellkerne durch eine kontrastreiche Gegenfärbung blau.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst über Nacht bei 60°C inkubiert, damit sich das Paraffin erweicht. Anschließend werden die Schnitte durch Xylol, eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 100%, 96%, 70%) und schließlich Wasser rehydriert.

Hiernach färbten wir die Gewebsschnitte mit 0,9% Perjodsäure für 10 Minuten und wuschen sie mit destilliertem Wasser.

Nachfolgend beließen wir die Objektträger für 15 Minuten in Schiff'schem Reagenz.

Nach einer erneuten Waschung in destilliertem Wasser ließen wir die Schnitte für 10 Minuten in Hämatoxylin nach dem Prinzip der Kerngegenfärbung nach Mayer. Unter fließendem Leitungswasser färbten sich die zunächst rot gefärbten Zellkerne blau.

Schließlich, nach nochmaliger Spülung mit destilliertem Wasser, dehydrierten wir die Schnitte durch eine Alkoholreihe aufsteigender Konzentrationen (Ethanol 70%, 96%, 100%) und Xylol. Zuletzt deckelten wir die Gewebsschnitte mit Histomount ein. [87]

### **3.2.8. Masson-Trichrome-Färbung**

Die Masson Goldner Trichrom(MGT) Färbung ist eine Übersichtsfärbung, mit der sich Bindegewebe differenziert darstellen lässt.

Zur Kernfärbung im sauren Milieu wird Hämatoxylin nach Weigert verwendet, das sich an die negativen Phosphatgruppen des Kerns lagert. Diese Lösung beinhaltet zusätzlich Eisen-3-Chlorid 25% Salzsäure, wodurch die Kerne auch in den folgenden sauren Lösungen nicht wieder entfärbt werden. Das der Kernfärbung folgende Wässern in Leitungswasser dient dem Einstellen des pH-Wertes > 3 zur Stabilisierung der Färbung. Anschließend wird mit der Trichromfärbung in Form einer Kombinationslösung aus Säurefuchsin und Ponceau Xylidine begonnen. Dabei färbt der Farbstoff Ponceau die Muskulatur hellrot, während der azidophile Farbstoff Säurefuchsin das Zytoplasma und Bindegewebe langsam rot färbt und somit verhindert, dass der Farbstoff Ponceau das Bindegewebe anfärbt. Das in der nächsten Kombinationslösung enthaltene feindisperse Orange G färbt Erythrozyten orange-rot. Unterdessen entfärbt die Phosphorwolframsäure das Bindegewebe. Für die blaue Anfärbung der Kollagenfasern wurden die Schnitte in Anilineblau gelagert und kurz mit Aquadest gewaschen. Danach erfolgt die Dehydrierung mit einer in der Konzentration aufsteigenden Alkoholreihe [88].

### **3.2.9. Pikro-Siriusrot-Färbung**

Der Farbstoff Sirius Red färbt aufgrund seiner enthaltenen Sulfonsäuregruppen basische Gruppen im Kollagen rot an. Anfärbbar sind die Kollagen-Typen I und III. Die Färbung wird nicht nur lichtmikroskopisch betrachtet, sondern auch unter polarisiertem Licht, da sich unter Lichtmikroskopie auch andere Strukturen außer Kollagen die Färbung ansonsten

überschätzt würde. Unter polarisiertem Licht zeigt sich Kollagen I durch gelb-rötliche Doppelbrechungen und Kollagen III durch grüne Doppelbrechung.

Die renalen Gewebsschnitte werden mit einer absteigenden Alkoholreihe hydriert. Es folgt die Inkubation in 0,1% Sirius-Red-Lösung für 60 Minuten. Vor der Dehydratation mit einer aufsteigenden Alkoholreihe werden die Gewebeschnitte mit 0,01 M HCL-Lösung abgespült, um das nicht gebundene Sirius-Rot zu entfernen. Abschließend erfolgt die Eindeckung [89].

### **3.2.10. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine der bekannten immunhistochemischen Übersichtsfärbung, die aus zwei Einzelfärbungen besteht. Das basische Hämatoxylin färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, insbesondere die Zellkerne mit der enthaltenen DNA und Ribosomen. Das saure Eosin hingegen färbt alle basischen Strukturen rot, beispielsweise Zellplasmaproteine, Kollagen oder Keratin. Zunächst durchlaufen die Gewebeschnitte eine absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Schließlich wurden sie 5 Minuten in destilliertem Wasser rehydratisiert und dann 20 Minuten in Hämalaun gefärbt. Nachfolgend werden die Gewebeschnitte unter Leitungswasser gebläut, welches durch die Erhöhung des pH-Wertes erreicht wird. Die Zellkern schlagen dabei farblich von braun-rötlich in blau um. Anschließend wurde mit destilliertem Wasser gespült und im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit 0,1% Eosinlösung 10 Minuten lang gefärbt. Es folgt die Abspülung mit destilliertem Wasser und eine Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe [90].

### **3.2.11. Immunhistochemie (ICH) an Paraffinschnitten**

Die Gewebsschnitte wurden mit der indirekten Avidin-Biotin-Färbemethode (LSAB = labelled-(strepto)-avidin-biotin-method) angefärbt. Dazu wurden die Paraffinschnitte über Nacht bei 60 °C inkubiert, um das Paraffin zu verflüssigen. Durch die Inkubation in Xylol bei Raumtemperatur wurde das Paraffin vollständig abgelöst. In einer Alkoholreihe mit absteigenden Konzentrationen (Ethanol 100 %, 95 %, 70 %) wurden die Schnitte rehydriert und anschließend 3 x kurz in TBS gewaschen.

Für die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung wurden die Schnitte zuerst 5 min bei 700 W und anschließend für 10 min bei 330 W in 10 mM Zitrat-Puffer in der Mikrowelle gekocht und nach Abkühlung wiederum 2 x in TBS gewaschen. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität und damit zur Senkung des Hintergrundsignals wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 15 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol behandelt und anschließend wieder mit TBS gewaschen.

Um das Abfließen der nachfolgend applizierten Lösungen zu verhindern, wurde um das Nierengewebe auf dem Deckglas mit einem PAP-Pen ein wasserabweisender Kreis gezeichnet. Dann wurde das Nierengewebe jeweils 15 min mit einer Avidin- und Biotin-Lösung inkubiert, um nicht-spezifische Bindungsstellen des Biotin/Avidin-Bindesystems zu

blocken. Danach wurden das Gewebe über Nacht im Kälteraum bei -20 °C mit den Primärantikörpern in TBS mit 1 % BSA (Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen) inkubiert. Am folgenden Tag schlossen sich drei 2,5-minütige Waschschrte in TBS an. Die folgenden Schritte wurden aufgrund der Lichtsensibilität der Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper im Dunkeln durchgeführt. Die Gewebe wurden für eine Stunde mit den Biotin-konjugierten Sekundärantikörpern in TBS inkubiert und danach 3 x vorsichtig gewaschen.

Anschließend wurde für 60 min ein AB-Komplex (Avidin + biotinylierte Meerrettichperoxidase) zugefügt. Zur Detektion der Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte bei 37 °C für 10–20 min mit 3,3-Diaminobenzidin als Chromogen-Substrat inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der Intensität der Braunfärbung.

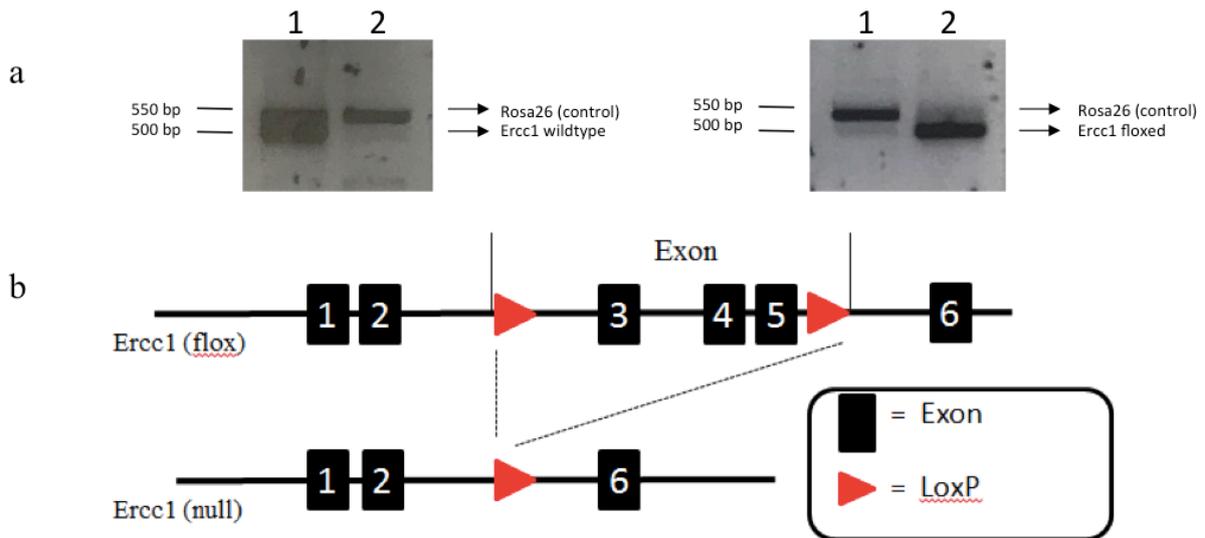
Die Färberreaktion wurde mit einer fünfminütigen Waschung mit destilliertem Wasser gestoppt. Mit einer Färbung nach Mayer mit Hämatoxylin wurden die Zellkerne rot dargestellt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte durch die Erhöhung des pH-Wertes gebläut.

Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 95 %, 100 %) und schlussendlich Xylol dehydriert und mit Histomount eingedeckelt. Zur Auswertung wurden die Gewebsschnitte mit dem SDN400 Slidescanner von Leica gescannt und digitalisiert. Die Analyse der Bilder erfolgte mit dem Aperio ImageScope.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Generierung des konditionalen nierenspezifischen *Ercc1*-Knockout Mausmodells**

Für die Generierung eines nierenspezifischen *Ercc1*-Knockouts wurde das Rekombinationssystem Cre/LoxP verwendet (Abbildung 4a). Dabei wurde eine Mauslinie mit dem geflochtenen *Ercc1*-Allel mit einer transgenen Ksp:Cre-Mauslinie verpaart [80,91]. Bei dem geflochtenen *Ercc1*-Gen sind die Exons 3–5 von LoxP-Sequenzen flankiert und werden in Cre-exprimierenden Zellen entfernt. Für die Cre-Expression wurde der Ksp-Cadherin16-Promotor verwendet. Ksp-Cadherin16 wird spezifisch in distalen tubulären Nierenepithelzellen und im Sammelrohr exprimiert [92]. Der genetische Hintergrund der Mäuse war eine Mischung aus den Mausstämmen CD1, FVB/N und C57BL/6N. Der Genotyp der nierenspezifischen *Ercc1*-Knockout-Mäuse wurde mittels PCR bestätigt (Abbildung 4b).



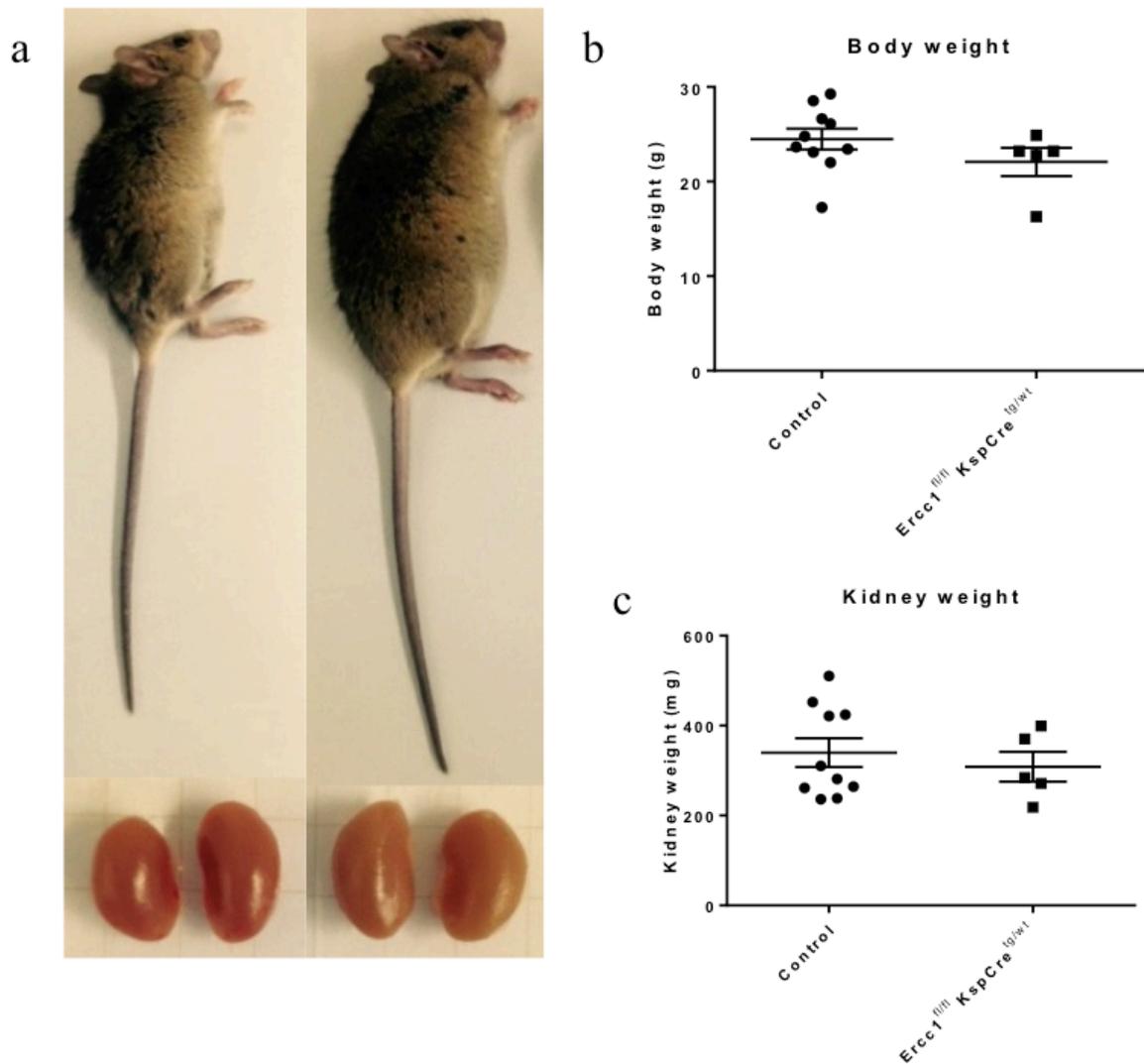
**Abbildung 4: Genotyping der *Ercc1*-floxed- und Wildtypmäuse**

(a) PCR-Genotypisierung der *Ercc1*-floxed- und Wildtyp-Mäuse (control): Die PCR-Produkte des *Ercc1*-Wildtyp-Allels und des ERCC1-floxed -Allels haben eine Größe von 500 bp und die der Kontroll-Allele *rosa\_26* jeweils von 550 bp. 1-2 = Versuchstiere.

(b) Schematische Darstellung des geflochten und rekombinierten *Ercc1*-Allels. Die *Ercc1*-Exons sind nummeriert. Die großen rote Pfeile kennzeichnen die LoxP-Sites, die kleinen schwarzen Pfeile zeigen die Primer für die PCR an. Im obigen Panel sind die Genotyping-Primers für das geflochte Allel sichtbar. Im unteren Panel sind die Exons 3,4 und 5 im Rahmen der Rekombination mit Cre verloren [80].

#### 4.2. Phänotyp des *Ercc1*-Knockouts im Alter von 8 Wochen

Bei einem Vergleich des Phänotyps zeigten *Ercc1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse ohne *Ercc1*-Knockout weder hinsichtlich ihrer Körpergröße noch bezüglich der Größe und Form der Nieren im Alter von 8 Wochen signifikante Unterschiede (Abbildung 5a). Tendenziell waren die *Ercc1*-Knockout-Mäuse aber kleiner und hatten auch kleinere Nieren (Abbildung 5b und 5c).

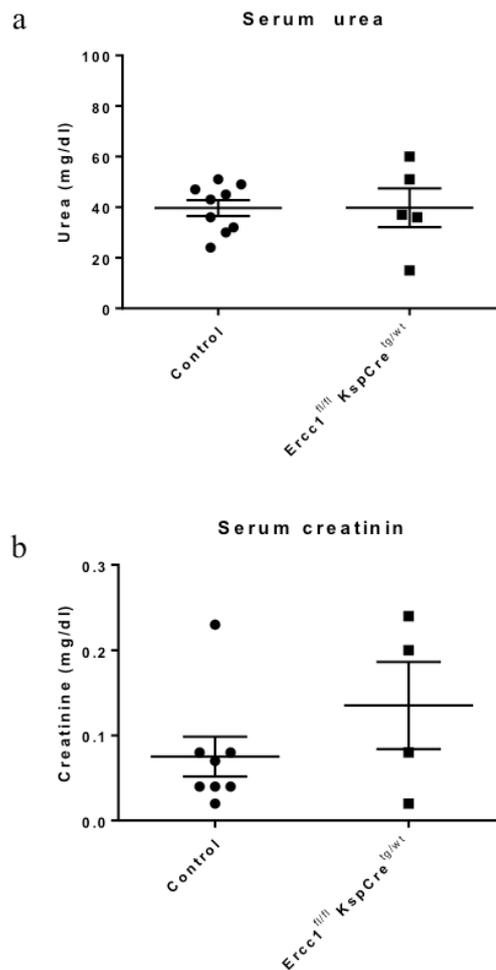


**Abbildung 5: Renaler Phänotyp der *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 8 Wochen.**

Weibliche, 8 Wochen alte Mäuse und ihre Nieren (links und rechts); links: *Ercc1*-Knockout-Maus; rechts: Wildtyp-Maus (b) Körpergewicht von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n=5) und Wildtyp-Mäusen (control) (n=10) im Alter von 8 Wochen. (c) Nierengewicht von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n=5) und Wildtyp-Mäusen (control) (n=10) im Alter von 8 Wochen (t-test:  $p > 0,05$ ).

#### 4.3. Effekt des *Ercc1*-Knockouts auf die Nierenfunktion im Alter von 8 Wochen

*Ercc1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Nierenfunktionsparameter (Abbildung 6). *Ercc1*-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen lediglich leicht erhöhte Kreatinin-Werte. Die Harnstoff-Werte waren in beiden Mausgruppen nahezu identisch.



**Abbildung 6: Nierenfunktionsparameter der *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 8 Wochen**

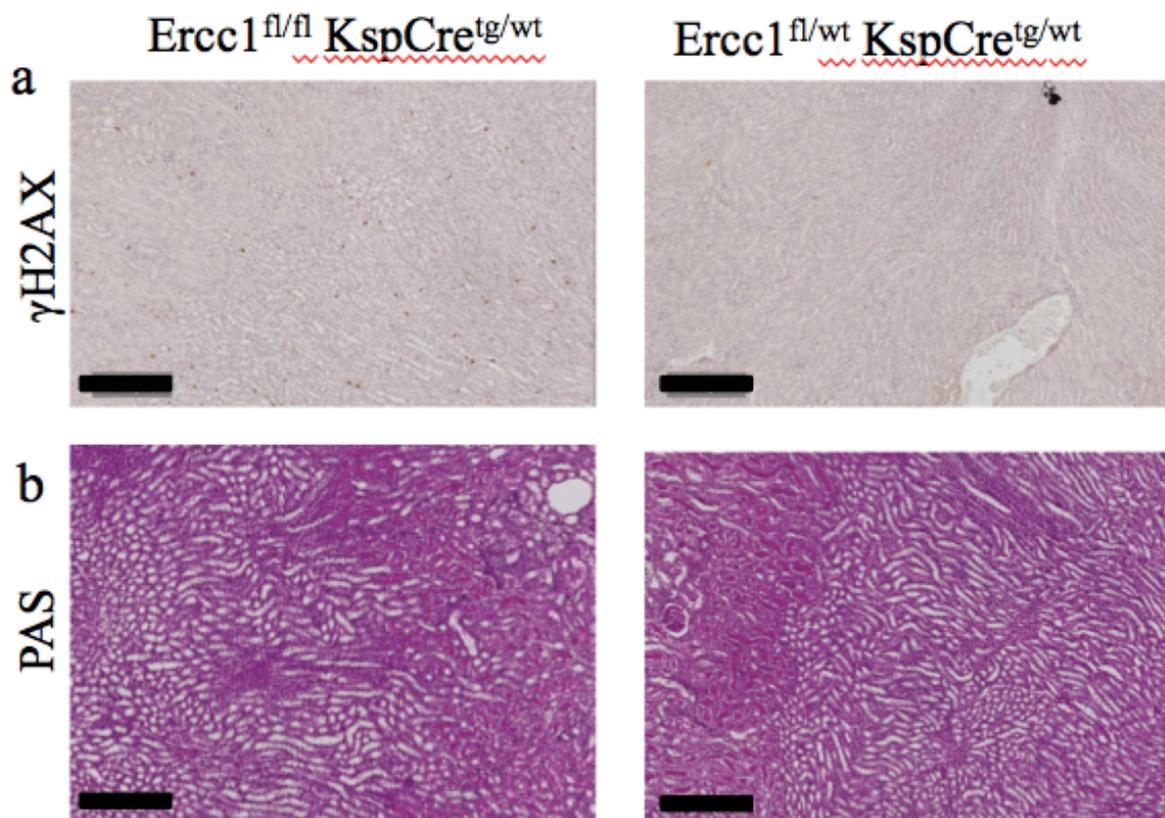
(a) Serumharnstoff von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (N=5) und Wildtyp-Mäusen (control) (N=9) im Alter von 8 Wochen (t-test:  $p > 0,05$ ). (b) Serumkreatinin von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (N=4) und Wildtyp-Mäusen (control) (N=8) im Alter von 8 Wochen (t-test:  $p > 0,05$ )

#### **4.4. Einfluss des *Ercc1*-Knockouts im Alter von 8 Wochen auf die DNA-Integrität und auf die Nierengewebe-Architektur**

Im Alter von 8 Wochen wurden die Mäuse geopfert. Die Nieren der *Ercc1*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse wurden histologisch aufbereitet und mikroskopisch auf Veränderungen analysiert. Als histochemische Verfahren kamen sowohl die Avidin-Biotin-Methode als auch die PAS-Reaktion zum Einsatz [93,94] (Abbildung 7a und 7b).

Zur immunhistochemischen Analyse wurde das paraffinierte murine Nierengewebe der *Ercc1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit einem  $\gamma$ H2AX-Antikörper angefärbt. Bei  $\gamma$ H2AX handelt es sich um das phosphorylierte Histon H2AX, das nach der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen entsteht. Als Folge der Akkumulation dieser phosphorylierten Proteinvariante sind sogenannte  $\gamma$ H2AX-Foci sichtbar. Diese subnukleären Strukturen korrelieren mit der Anzahl der Doppelstrangbrüche und ermöglichen eine Quantifizierung der DNA-Schäden [95]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese überprüft, ob *Ercc1*-Knockout-Mäuse vermehrt Doppelstrangbrüche aufweisen. Die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-positiven Foci war in Nierengewebe der *Ercc1*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren eindeutig erhöht (Abbildung 7a). Dieser Befund spiegelt eine vermehrte DNA-Schädigung beim Fehlen des DDR-Proteins ERCC1 wider. Eine Quantifizierung der Foci ist nicht erfolgt.

Die histologischen Färbungen mittels PAS-Technik zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Nierengewebe von *Ercc1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Somit war histopathologisch im Alter von 8 Wochen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen auszumachen. *Ercc1*-Knockout-Mäuse zeigten keine gestörte Architektur der Nierentubuli und die Zellkerne wiesen keine Auffälligkeiten in Form und Größe auf (Abbildung 7b).



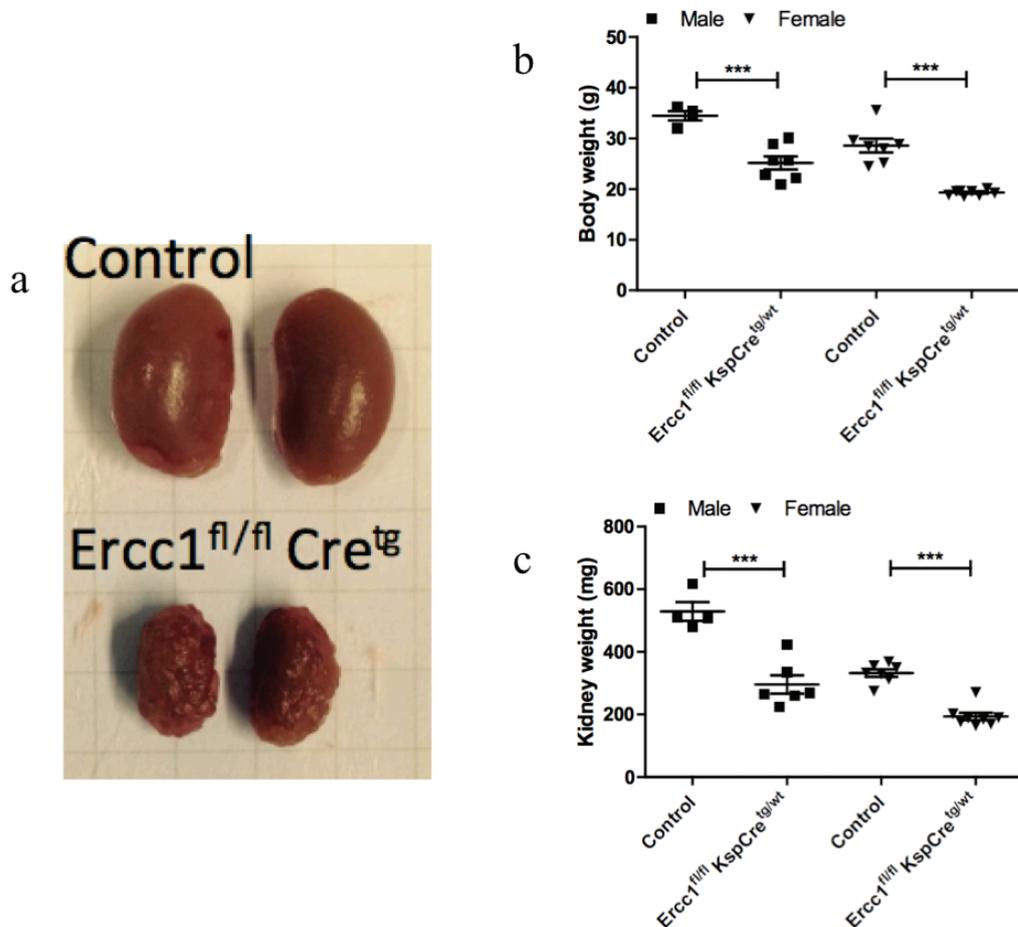
**Abbildung 7: DNA-Schäden und renale Histologie in *Ercc1*-Knockoutmäusen im Alter von 8 Wochen**

(a) Immunhistochemie mit anti- $\gamma$ H2AX-Antikörper in paraffiniertem Nierengewebe von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) im Alter von 8 Wochen. Scale Bar 300  $\mu$ m  
 (b) PAS-Staining von paraffiniertem Nierengewebe von *Ercc1*-Knockout-Mäusen (tg) und Wildtyp-Mäusen (wt) im Alter von 8 Wochen. Scale bar 200  $\mu$ m.

#### 4.5. Phänotyp des *Ercc1*-Knockouts im Alter von 21 Wochen

Während der Phänotyp der *Ercc1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse ohne *Ercc1*-Knockout im Alter von 8 Wochen weder hinsichtlich ihrer Körpergröße noch bezüglich der Größe und Form der Nieren signifikante Unterschiede zeigten, waren im Vergleich bei 21 Wochen alten Mäusen signifikante Unterschiede feststellbar (Abbildung 8). Phänotypisch zeigten sich deutlich kleinere und fibrotisch umgebaute Nieren bei den Knockoutmäusen. Die Oberfläche der Niere ist bei den Wildtypmäusen glatt und die Form ist abgerundet und keilförmig, während die Nieren der Knockoutmäuse gehöckert und inhomogen erscheinen (Abbildung 8a). Die Knockoutmäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtypmäusen einen signifikanten Körpergewichtsverlust von bis zu einem Drittel. Dabei war der Gewichtsverlust

bei den Geschlechtern gleich stark ausgeprägt (Abbildung 8b). Auch beim Nierengewicht zeigten die Knockoutmäuse einen signifikanten Gewichtsverlust von 50%, der ebenso bei beiden Geschlechtern gleich ausgeprägt war (Abbildung 8c).

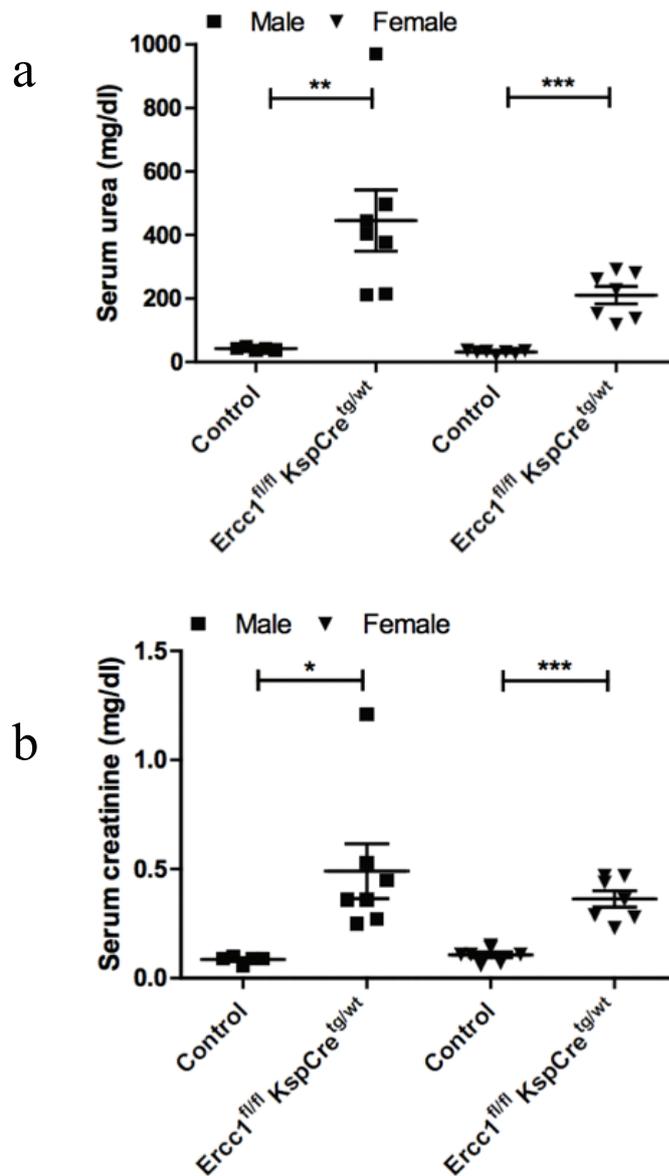


**Abbildung 8: Makroskopischer Phänotyp der *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 21 Wochen.**

(a) 21 Wochen alte Mäuse und ihre Nieren (oben und unten); oben: Wildtyp-Maus ; unten: *Ercc1*-Knockout-Maus (b) Körpergewicht von weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n= 8 ; n=7) sowie weibliche und männliche Wildtyp-Mäusen (control) (n=7;n=4) im Alter von 21 Wochen. (c) Nierengewicht von weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n= 8 ; n=6) sowie von weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen (control) (n=7;n=4) im Alter von 21 Wochen.

#### **4.6. Effekt des *Ercc1*-Knockouts auf die Nierenfunktion im Alter von 21 Wochen**

*Ercc1*-Knockout-Mäuse zeigten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen im Alter von 8 Wochen lediglich leichte, nicht signifikant erhöhte Kreatinin-Werte (Abbildung 6). Bei *Ercc1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse im Alter von 21 Wochen jedoch traten signifikante Veränderungen der Nierenretentionsparameter auf (Abbildung 9). Es wurden die Harnstoffwerte und das Serumkreatinin untersucht. Beide Werte waren bei den Knockouttieren signifikant erhöht. Dabei traten die Veränderungen bei den männlichen Knockoutmäusen deutlich stärker auf.



**Abbildung 9: Nierenfunktionsparameter der weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockoutmäuse sowie Wildtypmäuse im Alter von 21 Wochen**

(a) Serumharnstoff von weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n= 7 ; n=7) und von weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen (control) (N=7;n=5) im Alter von 21 Wochen. (b) Serumkreatinin von weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockout-Mäusen (n= 7 ; n=7) und von weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen (control) (N=7;n=5) im Alter von 21 Wochen.

#### **4.7. Renale Gewebearchitektur der *Ercc1*-Knockout-Mäuse im Alter von 21 Wochen**

Zum Vergleich der histopathologischen Entwicklungen im fortgeschrittenen Alter wurden die Nieren von *Ercc1*-Knockout- und Wildtyp-Mäuse im Alter von durchschnittlich 21 Wochen histologisch aufbereitet und mikroskopisch auf Veränderungen analysiert. Diesmal wurde ebenfalls eine PAS-Reaktion durchgeführt. Zusätzlich kamen noch die Masson-Trichome-Färbung, die Picro-Siriusrot-Färbung in lichtmikroskopischer und polarisationsmikroskopischer Darstellung sowie die Hämatoxylin-Färbung zur Anwendung. Die histologischen Färbungen mittels PAS-Technik zeigten nun einen deutlichen Unterschied zwischen dem Nierengewebe von *Ercc1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Die *Ercc1*-Knockout-Mäuse zeigten eine gestörte Architektur der Niere, insbesondere der Nierentubuli mit deutlicher Symmetrie und außerdem verschobener Kern-Plasmarelation (Abbildung 10a). Die Färbungen mit der Masson-Trichom Färbung demonstrieren eine histopathologisch signifikante Fibrosebildung mit ebenfalls gestörter Nierenarchitektur sowie eine Zunahme der blau angefärbten Kollagenen (Abbildung 10b). In der Picro-Sirius-Färbung präsentierte sich lichtmikroskopisch eine Zunahme der Kollagenablagerung in den Nieren der *Ercc1*-Knockout-Mäuse, die eine Dysregulation der extrazellulären Matrix mit Kollagenablagerungen und Fibrosebildung zeigt (Abbildung 10c). Unter Verwendung des Polarisationsmikroskops zeigt sich insbesondere eine Ablagerung des Kollagen I (Abbildung 10e). Die histologischen Färbungen mit der Hämatoxylin-Eosin-Reaktion der Nierengewebe von *Ercc1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Mäusen bestätigt die gestörte und asymmetrische Nierenarchitektur von *Ercc1*-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen mit nahezu vollständigem Verschwinden der Medulla renalis (Abbildung 10d).

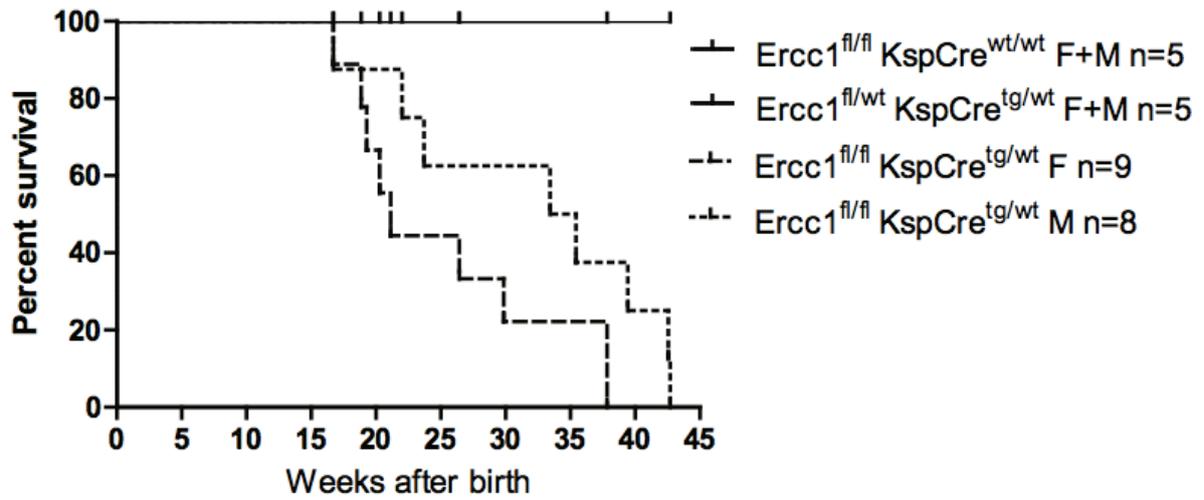


## Abbildung 10: Renale Histologie in 21 Wochen alten *Ercc1*-Knockoutmäusen

a) PAS-Staining von paraffiniertem Nierengewebe von *Ercc1<sup>fl/fl</sup> KspCre<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen, *Ercc1<sup>fl/fl</sup> Ksp<sup>w</sup>*-Mäusen und *Ercc1<sup>fl/wt</sup> KspCre<sup>tg</sup>*-Mäusen (von oben nach unten) im Alter von durchschnittlich 21 Wochen. Scale bar 200  $\mu$ m b) Masson's-Trichome-Staining von paraffiniertem Nierengewebe *Ercc1<sup>fl/fl</sup> KspCre<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen, *Ercc1<sup>fl/fl</sup> Ksp<sup>w</sup>*-Mäusen und *Ercc1<sup>fl/wt</sup> KspCre<sup>tg</sup>*-Mäusen (von oben nach unten) im Alter von durchschnittlich 21 Wochen. Scale bar 1 mm c) Sirius-Red-Staining von paraffiniertem Nierengewebe *Ercc1<sup>fl/fl</sup> KspCre<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen, *Ercc1<sup>fl/fl</sup> Ksp<sup>w</sup>*-Mäusen und *Ercc1<sup>fl/wt</sup> KspCre<sup>tg</sup>*-Mäusen (von oben nach unten) im Alter von durchschnittlich 21 Wochen im Lichtmikroskop. d) HE-Staining von paraffiniertem Nierengewebe von *Ercc1<sup>fl/wt</sup> Ksp<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen und *Ercc1<sup>fl/fl</sup> KspCre<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen im Alter von durchschnittlich 21 Wochen e) Sirius-Red-Staining von paraffiniertem Nierengewebe von *Ercc1<sup>fl/fl</sup> Ksp<sup>tg/wt</sup>*-Mäusen und *Ercc1<sup>fl/fl</sup> KspCre<sup>w<sup>t</sup>/w<sup>t</sup></sup>*-Mäusen (von oben nach unten) im Alter von durchschnittlich 21 Wochen im Polarisationsmikroskop. Scale bar 200  $\mu$ m.

### 4.8. Einfluss des *Ercc1*-Knockouts auf das Überleben der Versuchsmäuse

Die unten gezeigte Kaplan-Meyer-Kurve zeigt das perzentile Überleben der weiblichen und männlichen Knockout und Wildtypmäuse in Wochen nach der Geburt. Gleichbedeutend mit dem Versterben wurde ein 20% Gewichtsverlust oder ein 10% Gewichtsverlust zwischen zwei Gewichtswiegungen gewertet, die wöchentlich stattfanden. Während es bei den Wildtyptieren in der abgebildeten Zeitspanne zu keinem Todesfall kam, war die Lebenspanne der Knockouttiere verkürzt. Im Median lebten die Knockouttiere 26 Wochen. Dabei überlebten die männlichen Knockouttiere maximal 43 Wochen und die weiblichen Tiere maximal 37 Wochen. Im Durchschnitt lag das Überleben der männlichen Mäuse bei 34 Wochen und bei den weiblichen Mäusen 21 Wochen. Die männlichen Knockoutmäuse lebten somit länger als die weiblichen Versuchstiere (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Perzentile Überleben der weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockoutmäuse in Wochen nach der Geburt.

## 5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgten wir der Hypothese, dass eine defiziente DNA-Reparatur und damit die Akkumulation von DNA-Schäden ein Faktor bei der Pathogenese der NPH sein könnte. Daher generierten wir erstmals ein konditionales *Ercc1*-Knockout-Mausmodell für die Niere. Die *Ercc1*-Knockout-Mäuse waren lebensfähig und wurden gesund und in einem normalen Geschlechtsverhältnis nach den Mendelschen Regeln geboren. Die Tiere zeigten im Verlauf nierenspezifische Symptome, aber keine neuronalen oder die Leber betreffende Symptome. Diese Befunde erklären sich durch den auf die Niere begrenzten Knockout des *Ercc1*-Gens. Bei einem nicht auf die Niere begrenzten *Ercc1*-Knockout traten die renalen Symptome gewöhnlich früher und stärker auf [96].

Dabei traten keine renale Zysten oder Symptome einer Ziliopathie auf. Dazu passt, dass ERCC1 nicht im Zilium lokalisiert ist (Slaats et. al, unpubliziert) und bei nahezu allen zystischen Nierenerkrankungen das auslösende veränderte/fehlende Protein im primären Zilium oder dem Basalkörper lokalisiert sind. Zudem waren auch in den vorgestellten *Ercc1*-Knockout-Mausmodellen keine Zysten aufgefallen. Jedoch zeigten unsere *Ercc1*-Knockout-Mäuse eine renale Fibrose, die auch bei den zystischen Nierenerkrankungen, vor allem bei der NPHP zu beobachten ist und zu histologischen Trias der NPHP gehört. Daher unterstützt dieses Modell die Hypothese, dass DNA Schädigungen bzw. Defekte in der Reparatur an der Pathogenese der NPHP beteiligt sein könnten. Auch wenn aus den vorliegenden Ergebnissen nicht direkt neue Therapien ableitbar sind, ist das generierte Mausmodell eine Basis für weitere Untersuchungen zur Physiologie und zu den Auswirkungen von DNA-Schäden auf die Niere. Speziell der Aspekt der interstitiellen Fibrose bei der NPHP lässt sich hier sehr gut studieren. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse bildet den Ausgangspunkt für neue und effizientere Therapien, die das klinische Ergebnis betroffener Patienten verbessern, ihre Lebensspanne verlängern und die Lebensqualität erhöhen können.

### 5.1. Einfluss des ERCC1-Defizits auf die Niere sowie der Lebensdauer

Lange Zeit fehlten Hinweise auf die pathophysiologische humangenetische Bedeutung von Mutationen im *ERCC1*-Gen. Inzwischen wurde aber von zwei Patienten berichtet. Diese zeigten schwere prä- und postnatale Entwicklungsstörungen und wurden unter der klinischen Diagnose COFS-Syndrom zusammengefasst [76,97]. Zur Analyse der Bedeutung eines veränderten *Ercc1*-Gens wurden verschiedene teilweise auch gewebespezifische *Ercc1*-Knockout-Mausmodelle generiert. Ein *Ercc1*-Knockout in den tubulären Epithelzellen des distalen Nephrons der Niere fehlte allerdings bislang [97].

Die *Ercc1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die in keinem Gewebe ERCC1 exprimierten, waren verkümmert und starben früh an einem Leberversagen [77]. Da es sich um den bisher ersten

nierenspezifischen Knockout handelt, blieb abzuwarten, inwieweit sich der Phänotyp in Bezug auf die Niere unterscheidet. Der verwendete Promotor Ksp-Catherin ist nicht für die gesamte Niere spezifisch, sondern nur für die Epithelzellen der distalen Tubuli sowie der Sammelrohre und nicht für die Zellen der proximalen Tubuli und Glomeruli, die für die Ultrafiltration des Primärharns verantwortlich sind. Somit ist eine Proteinurie nicht zu erwarten [91]. Die Architektur der Niere ist ebenfalls vor allem im Bereich der Nierentubuli gestört, was mit der Aktivität des Promotors Ksp-Catherin vereinbar ist. Bei den gewebespezifischen Knockouts spielen außerdem potenzielle systemische Faktoren (z. B. kardiovaskulärer Einfluss, renale Mikrovaskulatur) keine Rolle, dennoch können auch gewebespezifische Störfaktoren vorhanden sein [98].

In den vorliegenden Versuchen waren die Nieren der *Ercc1*-Knockout-Mäuse in der 8 Woche tendenziell kleiner als die der Wildtyp-Mäuse, in der 21 Woche dann signifikant kleiner. In unseren Ergebnissen verzeichneten die Nieren der Knockoutmäuse einen Gewichtsverlust von etwa 50%.

Als Marker für Veränderungen der Nierenfunktion wurden in der vorliegenden Untersuchung neben der Nierengröße auch Nierenlaborparameter analysiert. Im Alter von 8 Wochen zeigten *Ercc1*-Knockout- und Wildtyp-Tiere keine signifikanten Unterschiede bei den Nierenlaborwerten Kreatinin und Harnstoff. Nach 21 Wochen jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung sowohl des Serumkreatinins als auch des Harnstoffes, was auf eine deutliche Schädigung der Niere schließen lässt. Die Elevation der Retentionsparametern war bei Männern bei beiden Parametern doppelt so hoch wie bei den weiblichen Vergleichstieren. Diese Befunde sprechen für eine sich sukzessive verschlechternde Nierenfunktion, die sich im Alter von 8 Wochen noch nicht auf die Nierenlaborwerte auswirkt, und letztlich aber in einer Niereninsuffizienz münden.

Die Lebensdauer der verschiedenen *Ercc1*-Knockout-Mausstämme unterscheidet sich je nach Arbeitsgruppe und ob es sich um einen Ganzkörperknockout oder einen konditionalen Knockout handelt.

Die *Ercc1*<sup>-/-</sup> Mäuse von McWhir et al. waren verkümmert und starben bereits nach etwa 3 Wochen. Die Ganzkörper-Knockout-Mäuse von Weeda et al. überlebten mit bis zu 5 Wochen nur wenig länger. [99].

Die *Ercc1*<sup>\*292</sup>-Maus von Weeda et al. wurde dagegen bis zu 24 Wochen alt. Die Mäuse mit dem Hybrid-Genotyp von Dollè et al. lebten mit 24–30 Wochen ebenfalls deutlich länger als die ERCC1-defizienten Mäuse [76].

In unserem Experiment lebten die Knockoutmäuse jedoch im Median 21 Wochen und damit in Bereich der Knockoutmäuse von Weeda und Dollè, obwohl unserer Knockout auf die Niere begrenzt war. In der maximalen Lebensdauer wurden die männlichen Knockoutmäuse 43 Wochen und die weiblichen Tiere 37 Wochen. Dies zeigt die Wichtigkeit von ERCC1 für

die Lebensdauer, auch im Bezug auf die Niere. Die Lebensdauer ist damit zwar nicht so stark reduziert wie bei einem vollständigen Knockout von *Ercc1*, aber dennoch reduziert im Vergleich zu der Lebensspanne von Wildtypmäusen.

Bei dem vorliegenden Modell handelt es sich um einen gewebespezifischen Knockout, während der Knockout in den Vergleichsstudien zum Teil alle Zellen betraf. Auch das Niveau der ERCC1-Restexpression ist möglicherweise unterschiedlich. Diese Abweichungen erschweren den Vergleich verschiedener Studien. In dem vorliegende *Ercc1*-Knockout-Mausmodell zeigt sich eine verkürzte Lebensspanne der Knockoutmäusen insbesondere bei den weiblichen Mäusen, wenngleich die Retentionsparameter bei den männlichen Knockoutmäusen deutlich erhöht waren im Vergleich zu den weiblichen Knockoutmäusen. Beide Geschlechter zeigten außerdem einen gleich starken Verlust des Körper- und Nierengewichtes. Zur Klärung dieses Widerspruches zwischen verkürzter Lebensspanne der Weibchen im Vergleich zu den Männer bei weniger ausgeprägter laborchemischer Nierenschädigung benötigt weitere Analysen in der Zukunft. Eventuell sind die Retentionsparameter bei insgesamt größerer Nieren der männlichen Mäuse stärker erhöht ohne Korrelation zu der eigentlichen Nierenschädigung.

## **5.2. Einfluss des ERCC1-Defizits auf die DNA-Reparatur und auf die Entstehung von Gewebeschäden**

Wie beschrieben ist ERCC1 an der Reparatur verschiedener DNA-Läsionen beteiligt. Dazu zählen auch folgenschwere Doppelstrangbrüche [57].  $\gamma$ H2AX ist ein Marker für Doppelstrangbrüche. Das Molekül entsteht durch die spezifische Phosphorylierung des Histons H2AX am Serinrest 139 als Folge von DNA-Schäden [100]. Ahmad et al. konnten zeigen, dass ionisierende Strahlen in *ERCC1*-defizienten Mäusen und in *ERCC1*-defizienten Zellen zu persistierenden  $\gamma$ H2AX-Foci führen und die Rolle von ERCC1 für die Reparatur der Doppelstrangbrüche bestätigen [66].

Auch in der vorliegenden Arbeit war in den Nierengewebeschnitten von *Ercc1*-Knockout-Mäusen im Vergleich zu den Gewebeschnitten aus Wildtyp-Mäusen eine erhöhte Anzahl von  $\gamma$ H2AX-Foci nachweisbar. Dabei handelte sich aber um eine endogen ausgelöste H2AX-Phosphorylierung, da die Mäuse nicht bestrahlt wurden.

In verschiedenen Studien wurden in Abhängigkeit vom verwendeten Mausmodell bzw. von der analysierten *Ercc1*-Modifikation histopathologische Korrelate von Organschäden gefunden. In Hämatoxylin und Eosin gefärbten Nierenschnitten von 3 Wochen alten *Ercc1*<sup>-/-</sup>-Mäusen waren dilatierte Tubuli und nukleären Abnormalitäten erkennbar. In den Nierenschnitten 3 bzw. 19 Wochen alter *Ercc1*<sup>\*292</sup>- und *Ercc1*<sup>-/292</sup>-Mäuse waren vergleichbare

histopathologische Veränderungen sichtbar, die eine starke Ähnlichkeit zu altersassoziierten Veränderungen aufwiesen [78,79].

Aufgrund dieser Vorbefunde war zu erwarten, dass auch bei den *Ercc1*-Knockout-Mäusen der vorliegenden Studie histopathologische Auffälligkeiten in der Niere auftreten würden. Diese Vermutung konnte aber bei den 8 Wochen alten Mäusen nicht bestätigt werden. Mit der vermehrten Existenz von  $\gamma$ H2AX-Foci als Ausdruck von verstärktem DNA-Schaden in dem Nierengewebe der *Ercc1*-Knockout-Mäuse ist aber die pathologische Grundlage für histologische Veränderungen gegeben. Unter Annahme dieser Hypothese führten wir erneute histopathologische Untersuchungen der Nieren von älteren Mäusen im Alter von 21 Wochen durch. Es zeigte sich tatsächlich eine signifikante Fibrosebildung mit Zerstörung der Nierenarchitektur, sodass wir die Auswirkungen des Knockouts nicht nur in Form von DNA-Schäden darstellen konnten, sondern auch in Form von histopathologischen Veränderungen. Eine Dysbalance zwischen dem Auf- und Abbau von extrazellulärer Matrix trägt zur Fibrose bei. Die Fibrose ist charakterisiert durch eine Gewebsversteifung mit übermäßiger Akkumulation von extrazellulären Matrix-Komponenten – bestehend aus Kollagen (va. Kollagen I, III, IV), Fibronektin sowie aus Proteoglykanen oder Glykoproteinen [101]. Die Zunahme der Kollagenbildung bestätigt nochmals die extramedullären Ablagerungen und Entwicklung der Fibrose.

### **5.3. Bedeutung eines ERCC1-Mangels für die renale Karzinogenese**

Da es sich bei ERCC1 um einen Bestandteil des DNA-Reparatursystems handelt, könnte eine fehlende renale ERCC1-Expression die Entwicklung von Nierenkarzinomen begünstigen. Prinzipiell kann eine fehlerhafte DNA-Reparatur zur Aktivierung von Onkogenen und / oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen [102]. Werden Zellen mit DNA-Fehlern nicht eliminiert (z.B. Apoptose) können daher Karzinome entstehen [97]. Bisher haben weder *Ercc1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse noch die *Ercc1*<sup>\*292</sup>-Mäuse oder die *Ercc1*<sup>-/292</sup>-Mäuse Neoplasien entwickelt [76]. Auch ein Zusammenhang zwischen einem ERCC1-Mangel und der Entstehung von Nierenkarzinomen konnte bisher nicht gezeigt werden. Konditionale *Ercc1*-Knockout-Mäuse, bei denen die ERCC1-Expression in der Haut eliminiert wurde, entwickelten aber deutlich schneller – innerhalb von 8 Wochen – als die Vergleichsgruppe epidermale Hauttumoren [80]. Zudem wird in der Literatur beschrieben, dass ein erniedrigtes ERCC1-Expressionsniveau bei der frühen Kolon-Karzinogenese eine Rolle spielt [74]. Insgesamt deutet die aktuelle Datenlage aber an, dass ERCC1 keine entscheidende Rolle bei Tumorsuppression spielt [79]. Aufgrund der eingeschränkten Lebenszeit der nierenspezifischen *Ercc1*-Knockouttiere in der vorliegenden Arbeit kann eine mögliche Rolle bei der Entstehung eines Nierenzellkarzinoms nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber wie oben dargestellt als eher unwahrscheinlich.

#### 5.4. Verbindung zwischen DDR Signaling und NPH

Mittlerweile existieren verschiedene wissenschaftliche Erkenntnisse, die den DDR Signalweg und die Nephronophthie miteinander verbinden. In der Vergangenheit konnten für den Großteil aller NPHP auslösende Gene nachgewiesen werden, dass sie Proteine kodieren, die im primären Zilium lokalisiert sind und dort wichtige Funktionen übernehmen. So entstand die Theorie, dass die NPH eine Ziliopathie ist [103].

Im Verlauf stellt sich aber auch heraus, dass die Mehrzahl der Proteine zwar eine Aufgabe im Bereich des primären Ziliums hat, einige jedoch auch im Bereich des DDR eine Rolle spielen [48]. Für die Proteine CEP164 und ZNF423, die in mutierter Form auslösend für die NPHP 15 und 14 sind, konnte eine Funktion in DDR beschrieben werden. Es konnte sowohl eine Kolo-kalisation der Proteine an nukleäre Foki, die eine bewiesene Funktion für die DNA-Reparatur innehatten, als auch eine Sensitivität für DNA-Schaden in Zellen mit knockdown von *Cep164* oder *zfp423* [48]. Auch bei *Nek8*, verantwortlich als Auslöser für die NPHP 9 in mutierter Form, zeigt sich in einem Knockdown eine größere Sensitivität auf DNA-Schäden. Weitergehende Analysen konnten eine Verbindung von NEK8 und dem DNA-Checkpoint Signalweg beweisen [104].

Zuletzt konnte auch bewiesen werden, dass Mutationen in *sdccag8* die Nephronophthie 10 auslöst und durch retinale Degeneration, leichte geistige Behinderung, Fettleibigkeit, Hypogonadismus und rezidivierende Atemwegsinfektionen gekennzeichnet ist. Das Protein SDCCAG8 ist während des gesamten Zellzyklus an den Zentriolen lokalisiert und übernimmt bei der DNA-Replikation eine wichtige Rolle bei der Progression der S-Phase. In *sdccag8*-Knockoutmäusen zeigten sich erhöhte Werte von  $\gamma$ H2AX. Die Mäuse zeigten histologisch interstinale Fibrose, als auch Zysten der Niere [51]

Fraglich bleibt bisher, ob die verstärkten DNA-Schäden aufgrund der progredienten Erkrankung bei der Nephronophthie entsteht oder ob es eine ursächliche Verbindung zwischen Zilien und den dort befindlichen Proteinen und der Regulation des DDR gibt.

Bei dem in dieser Arbeit vorliegenden murinen Knockout von *Ercc1* in den distalen Tubuluszellen der Niere zeigte sich im Verlauf ein schwerer Phänotyp. Allerdings stellten wir in den Gewebeuntersuchungen der Niere keine zystische Nierenerkrankungen fest, sondern eine massive Fibrose und Degeneration. Unklar ist, ob der zelluläre Phänotyp durch den ERCC1 Verlust zu gravierend ist, sodass Fibrose ohne die klassischen NPH Charakteristika wie Zysten entsteht. Allerdings bestehen nach 8 Wochen noch keine signifikanten histologischen Veränderungen in unseren Experimenten. Möglich ist jedoch, dass der Verlust von ERCC1 bis zu einem gewissen Zeitpunkt kompensiert wird, bei Ausprägung dann aber eben noch den vermuteten gravierenden Verlauf mit Fibrose ohne Zystenentwicklung führt. Im Alter von 8 Wochen besteht noch kein histologischer Nachweis von DNA-Schäden, die Veränderungen treten also erst danach auf.

Ein wichtiger Beitrag zum Verständnis der DDR-Zilien Achse kam vor einigen Jahren aus unserer Arbeitsgruppe. Hier wurde Aatf mit der gleichen Cre-Linie ausgeschaltet, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Aatf ist ein Teil des DDR und endogener Regulator von p53. Interessanterweise entwickelten diese Tiere den kompletten Phänotyp der NPHP mit tubulointerstitieller Fibrose, tubulären Zysten am kortikomedullären Übergang und tubulärer Atrophie. Es zeigte sich, dass es zu einem Defekt der Zilien kommt als auch zu einer Akkumulation von DNA Doppelstrangbrüchen. Das heißt AATF konnte anders als ERCC1 eindeutig im primärem Zilium nachgewiesen werden. Diese Daten weisen auf eine Doppelfunktion von AATF im Bereich des DDR als auch im Zilium hin. Diese Doppelfunktion lässt sich bei *Ercc1* nicht eindeutig belegen und könnte die Ursache dafür sein, weshalb die Zystenbildung beim *Ercc1*-Knockout in unserer Arbeit fehlt. Diese Daten zeigen die Notwendigkeit der Lokalisation des Proteins im Zilium wichtig für Zystenbildung zu sein scheint. Beim *Aatf*-Knockout zeigt sich darüberhinaus bereits nach 8 Wochen eine nachzuweisende histopathologische Veränderung in Form von kleinen Zysten und Fibrose. Diese Veränderungen zeigen sich nach 10 Wochen bereits schon deutlich progressiv. Dies spricht dafür, dass sich die Zysten und Fibrose bei der kompletten Symptomausprägung der NPH parallel entwickeln und nicht aufeinander aufbauen.

Diese Daten verbinden zwei pathogene Mechanismen für die NPH und anderen Ziliopathien. [105].

Anders als AATF, aber genauso wie ERCC1 lässt sich MAPKBP1 nicht im primären Zilium nachweisen. MAPKBP1 ist Teil des JNK Signalweges und verursacht in mutierter Form die NPHP 20. Darüber hinaus zeigt der Verlust von MAPKBP1 auch keine Zysten in der histologischen Analyse. Nierenbiopsien und Ultraschall von betroffenen Personen zeigten klassische Merkmale der NPH, gekennzeichnet durch atrophische Tubuli mit Verdickung der Basalmembranen, massive interstitielle Fibrose sowie das Vorhandensein von interstitiellen Infiltraten [103]. Daher zeigt dieses Mausmodell einige Überschneidungen mit unserem *Ercc1*-Knockout Mausmodell. Es muss allerdings noch geklärt werden, inwiefern MAPKBP1 Teil des DDR ist. Der JNK Signalweg, deren Teil MAPKBP1, scheint den DDR Signalweg zumindest zu beeinflussen, wobei die Rolle von MAPKBP1 dabei noch geklärt werden muss [106]. Dieses Beispiel rückt den DDR stärker in die Pathogenetik der NPH und damit auch anderer Ziliopathien. Es scheint damit möglich, dass der DDR tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung der NPH spielt. Zur genauen Klärung dieser Fragestellung bedarf es weiterer Daten und Studien.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Hildebrandt F, Zhou W (2007). Nephronophthisis-associated ciliopathies. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 18(6): 1855-71
- [2] Wolf MT, Hildebrandt F (2011). Nephronophthisis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany).* 26(2): 181-94
- [3] Terry Watnick GG (2003). From cilia to cysts. *Nature Genetics.* 34(4): 355-6
- [4] Hildebrandt F, Attanasio M, Otto E (2009). Nephronophthisis: disease mechanisms of a ciliopathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 20(1): 23-35
- [5] Otto EA, Schermer B, Obara T, O'Toole JF, Hiller KS, Mueller AM, Ruf RG, Hoefele J, Beekmann F, Landau D, Foreman JW, Goodship JA, Strachan T, Kispert A, Wolf MT, Gagnadoux MF, Nivet H, Antignac C, Walz G, Drummond IA, Benzing T, Hildebrandt F (2003). Mutations in INVS encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nat Genet.* 34(4): 413-20
- [6] Soliman NA, Hildebrandt F, Otto EA, Nabhan MM, Allen SJ, Badr AM, Sheba M, Fadda S, Gawdat G, El-Kiky H (2012). Clinical characterization and NPHP1 mutations in nephronophthisis and associated ciliopathies: a single center experience. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia.* 23(5): 1090-8
- [7] Omran H, Fernandez C, Jung M, Haffner K, Fargier B, Villaquiran A, Waldherr R, Gretz N, Brandis M, Ruschendorf F, Reis A, Hildebrandt F (2000). Identification of a new gene locus for adolescent nephronophthisis, on chromosome 3q22 in a large Venezuelan pedigree. *American journal of human genetics.* 66(1): 118-27
- [8] Snoek R, van Setten J, Keating BJ, Israni AK, Jacobson PA, Oetting WS, Matas AJ, Mannon RB, Zhang Z, Zhang W, Hao K, Murphy B, Reindl-Schwaighofer R, Heinzl A, Oberbauer R, Viklicky O, Conlon PJ, Stapleton CP, Bakker SJL, Snieder H, Peters EDJ, van der Zwaag B, Knoers N, de Borst MH, van Eerde AM (2018). NPHP1 (Nephrocystin-1) Gene Deletions Cause Adult-Onset ESRD. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 29(6): 1772-9
- [9] Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, Chaki M, Allen SJ, Zhou W, Airik R, Hurd TW, Ghosh AK, Wolf MT, Hoppe B, Neuhaus TJ, Bockenbauer D, Milford DV, Soliman NA, Antignac C, Saunier S, Johnson CA, Hildebrandt F (2011). Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. *Journal of medical genetics.* 48(2): 105-16
- [10] Ala-Mello S, Kivivuori SM, Ronnholm KA, Koskimies O, Siimes MA (1996). Mechanism underlying early anaemia in children with familial juvenile nephronophthisis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany).* 10(5): 578-81
- [11] Blowey DL, Querfeld U, Geary D, Warady BA, Alon U (1996). Ultrasound findings in juvenile nephronophthisis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany).* 10(1): 22-4
- [12] Waldherr R, Lennert T, Weber HP, Fodisch HJ, Scharer K (1982). The nephronophthisis complex. A clinicopathologic study in children. *Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology.* 394(3): 235-54
- [13] Olbrich H, Fliegauf M, Hoefele J, Kispert A, Otto E, Volz A, Wolf MT, Sasmaz G, Trauer U, Reinhardt R, Sudbrak R, Antignac C, Gretz N, Walz G, Schermer B, Benzing T, Hildebrandt F, Omran H (2003). Mutations in a novel gene, NPHP3, cause adolescent nephronophthisis, tapeto-retinal degeneration and hepatic fibrosis. *Nat Genet.* 34(4): 455-9
- [14] Oud MM, van Bon BW, Bongers EM, Hoischen A, Marcelis CL, de Leeuw N, Mol SJ, Mortier G, Knoers NV, Brunner HG, Roepman R, Arts HH (2014). Early presentation of cystic kidneys in a family with a homozygous INVS mutation. *American journal of medical genetics. Part A.* 164a(7): 1627-34

- [15] Senior B, Friedmann AI, Braudo JL (1961). Juvenile familial nephropathy with tapetoretinal degeneration. A new oculorenal dystrophy. *American journal of ophthalmology*. 52: 625-33
- [16] Valente EM, Silhavy JL, Brancati F, Barrano G, Krishnaswami SR, Castori M, Lancaster MA, Boltshauser E, Boccone L, Al-Gazali L, Fazzi E, Signorini S, Louie CM, Bellacchio E, Bertini E, Dallapiccola B, Gleeson JG (2006). Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet*. 38(6): 623-5
- [17] Ramachandran U, Malla T, Joshi KS (2006). Meckel-Gruber syndrome. *Kathmandu University medical journal (KUMJ)*. 4(3): 334-6
- [18] Tobin JL, Beales PL (2007). Bardet-Biedl syndrome: beyond the cilium. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 22(7): 926-36
- [19] Hildebrandt F, Benzing T, Katsanis N (2011). Ciliopathies. *The New England journal of medicine*. 364(16): 1533-43
- [20] Mortellaro C, Bello L, Pucci A, Lucchina AG, Migliario M (2010). Saldino-Mainzer syndrome: nephronophthisis, retinitis pigmentosa, and cone-shaped epiphyses. *The Journal of craniofacial surgery*. 21(5): 1554-6
- [21] Davenport JR, Yoder BK (2005). An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle. *American journal of physiology. Renal physiology*. 289(6): F1159-69
- [22] Gabow PA (1993). Autosomal dominant polycystic kidney disease. *The New England journal of medicine*. 329(5): 332-42
- [23] Slaats GG, Lilien MR, Giles RH (2016). Nephronophthisis: should we target cysts or fibrosis? *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 31(4): 545-54
- [24] Harris PC, Torres VE (2014). Genetic mechanisms and signaling pathways in autosomal dominant polycystic kidney disease. *The Journal of clinical investigation*. 124(6): 2315-24
- [25] Igarashi P, Somlo S (2002). Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 13(9): 2384-98
- [26] Ward CJ, Yuan D, Masyuk TV, Wang X, Punyashthiti R, Whelan S, Bacallao R, Torra R, LaRusso NF, Torres VE, Harris PC (2003). Cellular and subcellular localization of the ARPKD protein; fibrocystin is expressed on primary cilia. *Human molecular genetics*. 12(20): 2703-10
- [27] Kagan KO, Dufke A, Gembruch U (2017). Renal cystic disease and associated ciliopathies. *Current opinion in obstetrics & gynecology*. 29(2): 85-94
- [28] Buscher R, Buscher AK, Weber S, Mohr J, Hegen B, Vester U, Hoyer PF (2014). Clinical manifestations of autosomal recessive polycystic kidney disease (ARPKD): kidney-related and non-kidney-related phenotypes. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*. 29(10): 1915-25
- [29] Wolf MT (2015). Nephronophthisis and related syndromes. *Current opinion in pediatrics*. 27(2): 201-11
- [30] Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N (2006). The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annual review of genomics and human genetics*. 7: 125-48
- [31] Simons M, Gloy J, Ganner A, Bullerkotte A, Bashkurov M, Kronig C, Schermer B, Benzing T, Cabello OA, Jenny A, Mlodzik M, Polok B, Driever W, Obara T, Walz G (2005). Inversin, the gene product mutated in nephronophthisis type II, functions as a molecular switch between Wnt signaling pathways. *Nat Genet*. 37(5): 537-43
- [32] Attanasio M, Uhlenhaut NH, Sousa VH, O'Toole JF, Otto E, Anlag K, Klugmann C, Treier AC, Helou J, Sayer JA, Seelow D, Nurnberg G, Becker C, Chudley AE, Nurnberg P, Hildebrandt F, Treier M (2007). Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis. *Nat Genet*. 39(8): 1018-24
- [33] Benzing T, Schermer B (2012). Clinical spectrum and pathogenesis of nephronophthisis. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 21(3): 272-8
- [34] Fonte VG, Searls RL, Hilfer SR (1971). The relationship of cilia with cell division and differentiation. *The Journal of cell biology*. 49(1): 226-9

- [35] Satir P, Christensen ST (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual review of physiology*. 69: 377-400
- [36] Buisson J, Chenouard N, Lagache T, Blisnick T, Olivo-Marin JC, Bastin P (2013). Intraflagellar transport proteins cycle between the flagellum and its base. *Journal of cell science*. 126(Pt 1): 327-38
- [37] Jensen VL, Leroux MR (2017). Gates for soluble and membrane proteins, and two trafficking systems (IFT and LIFT), establish a dynamic ciliary signaling compartment. *Current opinion in cell biology*. 47: 83-91
- [38] Taschner M, Bhogaraju S, Lorentzen E (2012). Architecture and function of IFT complex proteins in ciliogenesis. *Differentiation; research in biological diversity*. 83(2): S12-22
- [39] Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene *tg737*, are required for assembly of cilia and flagella. *The Journal of cell biology*. 151(3): 709-18
- [40] Fanconi G, Hanhart E, von AA, Uhlinger E, Dolivo G, Prader A (1951). [Familial, juvenile nephronophthisis (idiopathic parenchymal contracted kidney)]. *Helvetica paediatrica acta*. 6(1): 1-49
- [41] Braun DA, Hildebrandt F (2017). Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 9(3)
- [42] Hildebrandt F, Otto E, Rensing C, Nothwang HG, Vollmer M, Adolphs J, Hanusch H, Brandis M (1997). A novel gene encoding an SH3 domain protein is mutated in nephronophthisis type 1. *Nat Genet*. 17(2): 149-53
- [43] Benzing T, Gerke P, Hopker K, Hildebrandt F, Kim E, Walz G (2001). Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98(17): 9784-9
- [44] Sang L, Miller JJ, Corbit KC, Giles RH, Brauer MJ, Otto EA, Baye LM, Wen X, Scales SJ, Kwong M, Huntzicker EG, Sfakianos MK, Sandoval W, Bazan JF, Kulkarni P, Garcia-Gonzalo FR, Seol AD, O'Toole JF, Held S, Reutter HM, Lane WS, Rafiq MA, Noor A, Ansar M, Devi AR, Sheffield VC, Slusarski DC, Vincent JB, Doherty DA, Hildebrandt F, Reiter JF, Jackson PK (2011). Mapping the NPHP-JBTS-MKS protein network reveals ciliopathy disease genes and pathways. *Cell*. 145(4): 513-28
- [45] Luo F, Tao YH (2018). Nephronophthisis: A review of genotype-phenotype correlation. *Nephrology (Carlton, Vic.)*. 23(10): 904-11
- [46] Dutto I, Scalera C, Prospero E (2017). CREBBP and p300 lysine acetyl transferases in the DNA damage response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*.
- [47] Jackson SP, Bartek J (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 461(7267): 1071-8
- [48] Chaki M, Airik R, Ghosh AK, Giles RH, Chen R, Slaats GG, Wang H, Hurd TW, Zhou W, Cluckey A, Gee HY, Ramaswami G, Hong CJ, Hamilton BA, Cervenka I, Ganji RS, Bryja V, Arts HH, van Reeuwijk J, Oud MM, Letteboer SJ, Roepman R, Husson H, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Yasunaga T, Walz G, Eley L, Sayer JA, Schermer B, Liebau MC, Benzing T, Le Corre S, Drummond I, Janssen S, Allen SJ, Natarajan S, O'Toole JF, Attanasio M, Saunier S, Antignac C, Koeneke RK, Ren H, Lopez I, Nayir A, Stoetzel C, Dollfus H, Massoudi R, Gleeson JG, Andreoli SP, Doherty DG, Lindstrad A, Golzio C, Katsanis N, Pape L, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Lewis RA, Omran H, Lee EY, Wang S, Sekiguchi JM, Saunders R, Johnson CA, Garner E, Vanselow K, Andersen JS, Shlomai J, Nurnberg G, Nurnberg P, Levy S, Smogorzewska A, Otto EA, Hildebrandt F (2012). Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell*. 150(3): 533-48
- [49] Choi HJ, Lin JR, Vannier JB, Slaats GG, Kile AC, Paulsen RD, Manning DK, Beier DR, Giles RH, Boulton SJ, Cimprich KA (2013). NEK8 links the ATR-regulated replication stress response and S phase CDK activity to renal ciliopathies. *Molecular cell*. 51(4): 423-39

- [50] Slaats GG, Saldivar JC, Bacal J, Zeman MK, Kile AC, Hynes AM, Srivastava S, Nazmutdinova J, den Ouden K, Zagers MS, Foletto V, Verhaar MC, Miles C, Sayer JA, Cimprich KA, Giles RH (2015). DNA replication stress underlies renal phenotypes in CEP290-associated Joubert syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 125(9): 3657-66
- [51] Airik R, Slaats GG, Guo Z, Weiss AC, Khan N, Ghosh A, Hurd TW, Bekker-Jensen S, Schroder JM, Elledge SJ, Andersen JS, Kispert A, Castelli M, Boletta A, Giles RH, Hildebrandt F (2014). Renal-retinal ciliopathy gene *Sdccag8* regulates DNA damage response signaling. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 25(11): 2573-83
- [52] Loeb LA, Monnat RJ, Jr. (2008). DNA polymerases and human disease. *Nature reviews. Genetics*. 9(8): 594-604
- [53] Hoeijmakers JH (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*. 411(6835): 366-74
- [54] Diderich K, Alanazi M, Hoeijmakers JH (2011). Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair (Amst)*. 10(7): 772-80
- [55] Iyama T, Wilson DM, 3rd (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 12(8): 620-36
- [56] Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation research*. 773: 174-87
- [57] Bohgaki T, Bohgaki M, Hakem R (2010). DNA double-strand break signaling and human disorders. *Genome integrity*. 1(1): 15
- [58] Lieber MR (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of biological chemistry*. 283(1): 1-5
- [59] van Duin M, Koken MH, van den Tol J, ten Dijke P, Odijk H, Westerveld A, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1987). Genomic characterization of the human DNA excision repair gene ERCC-1. *Nucleic acids research*. 15(22): 9195-213
- [60] Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD (1996). Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell*. 86(5): 811-22
- [61] Tsodikov OV, Enzlin JH, Scharer OD, Ellenberger T (2005). Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(32): 11236-41
- [62] Aboussekhra A, Biggerstaff M, Shivji MK, Vilpo JA, Moncollin V, Podust VN, Protic M, Hubscher U, Egly JM, Wood RD (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*. 80(6): 859-68
- [63] Manandhar M, Boulware KS, Wood RD (2015). The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products. *Gene*. 569(2): 153-61
- [64] Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers NG, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, Kanaar R (2004). The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol*. 24(13): 5776-87
- [65] Adair GM, Rolig RL, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nairn RS (2000). Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *The EMBO journal*. 19(20): 5552-61
- [66] Ahmad A, Robinson AR, Duensing A, van Drunen E, Beverloo HB, Weisberg DB, Hasty P, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ (2008). ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 28(16): 5082-92
- [67] Rahn JJ, Adair GM, Nairn RS (2010). Multiple roles of ERCC1-XPF in mammalian interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis*. 51(6): 567-81
- [68] Klein Douwel D, Boonen RA, Long DT, Szybowska AA, Raschle M, Walter JC, Knipscheer P (2014). XPF-ERCC1 acts in Unhooking DNA interstrand crosslinks in cooperation with FANCD2 and FANCP/SLX4. *Molecular cell*. 54(3): 460-71

- [69] Wood RD (2010). Mammalian nucleotide excision repair proteins and interstrand crosslink repair. *Environmental and molecular mutagenesis*. 51(6): 520-6
- [70] Kashiyama K, Nakazawa Y, Pilz DT, Guo C, Shimada M, Sasaki K, Fawcett H, Wing JF, Lewin SO, Carr L, Li TS, Yoshiura K, Utani A, Hirano A, Yamashita S, Greenblatt D, Nardo T, Stefanini M, McGibbon D, Sarkany R, Fassihi H, Takahashi Y, Nagayama Y, Mitsutake N, Lehmann AR, Ogi T (2013). Malfunction of nuclease ERCC1-XPF results in diverse clinical manifestations and causes Cockayne syndrome, xeroderma pigmentosum, and Fanconi anemia. *American journal of human genetics*. 92(5): 807-19
- [71] Faridounnia M, Wienk H, Kovacic L, Folkers GE, Jaspers NG, Kaptein R, Hoeijmakers JH, Boelens R (2015). The Cerebro-oculo-facio-skeletal Syndrome Point Mutation F231L in the ERCC1 DNA Repair Protein Causes Dissociation of the ERCC1-XPF Complex. *The Journal of biological chemistry*. 290(33): 20541-55
- [72] Smith DH, Fiehn AM, Fogh L, Christensen IJ, Hansen TP, Stenvang J, Nielsen HJ, Nielsen KV, Hasselby JP, Brunner N, Jensen SS (2014). Measuring ERCC1 protein expression in cancer specimens: validation of a novel antibody. *Scientific reports*. 4: 4313
- [73] Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC (2006). DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 355(10): 983-91
- [74] Facista A, Nguyen H, Lewis C, Prasad AR, Ramsey L, Zaitlin B, Nfonsam V, Krouse RS, Bernstein H, Payne CM, Stern S, Oatman N, Banerjee B, Bernstein C (2012). Deficient expression of DNA repair enzymes in early progression to sporadic colon cancer. *Genome integrity*. 3(1): 3
- [75] Vermeij WP, Dolle ME, Reiling E, Jaarsma D, Payan-Gomez C, Bombardieri CR, Wu H, Roks AJ, Botter SM, van der Eerden BC, Youssef SA, Kuiper RV, Nagarajah B, van Oostrom CT, Brandt RM, Barnhoorn S, Imholz S, Pennings JL, de Bruin A, Gyenis A, Pothof J, Vijg J, van Steeg H, Hoeijmakers JH (2016). Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature*. 537(7620): 427-31
- [76] Gregg SQ, Robinson AR, Niedernhofer LJ (2011). Physiological consequences of defects in ERCC1-XPF DNA repair endonuclease. *DNA Repair (Amst)*. 10(7): 781-91
- [77] McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW (1993). Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat Genet*. 5(3): 217-24
- [78] Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, Vissers CJ, Nigg A, van Steeg H, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1997). Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Current biology : CB*. 7(6): 427-39
- [79] Dolle ME, Kuiper RV, Roodbergen M, Robinson J, de Vlugt S, Wijnhoven SW, Beems RB, de la Fonteyne L, de With P, van der Pluijm I, Niedernhofer LJ, Hasty P, Vijg J, Hoeijmakers JH, van Steeg H (2011). Broad segmental progeroid changes in short-lived *Ercc1(-/Delta7)* mice. *Pathobiology of aging & age related diseases*. 1
- [80] Doig J, Anderson C, Lawrence NJ, Selfridge J, Brownstein DG, Melton DW (2006). Mice with skin-specific DNA repair gene (*Ercc1*) inactivation are hypersensitive to ultraviolet irradiation-induced skin cancer and show more rapid actinic progression. *Oncogene*. 25(47): 6229-38
- [81] Selfridge J, Song L, Brownstein DG, Melton DW (2010). Mice with DNA repair gene *Ercc1* deficiency in a neural crest lineage are a model for late-onset Hirschsprung disease. *DNA Repair (Amst)*. 9(6): 653-60
- [82] Kim H, Kim M, Im SK, Fang S (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory animal research*. 34(4): 147-59

- [83] Kampmann JP, Hansen JM (1981). Glomerular filtration rate and creatinine clearance. *British journal of clinical pharmacology*. 12(1): 7-14
- [84] Fenton RA, Knepper MA (2007). Urea and renal function in the 21st century: insights from knockout mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 18(3): 679-88
- [85] Ragoussis J (2009). Genotyping technologies for genetic research. *Annual review of genomics and human genetics*. 10: 117-33
- [86] Haraguchi S, Nakagawara A (2009). A simple PCR method for rapid genotype analysis of the TH-MYCN transgenic mouse. *PLoS one*. 4(9): e6902
- [87] Vleming LJ, Baelde JJ, Westendorp RG, Daha MR, van Es LA, Bruijn JA (1997). The glomerular deposition of PAS positive material correlates with renal function in human kidney diseases. *Clinical nephrology*. 47(3): 158-67
- [88] Mao H, Su P, Qiu W, Huang L, Yu H, Wang Y (2016). The use of Masson's trichrome staining, second harmonic imaging and two-photon excited fluorescence of collagen in distinguishing intestinal tuberculosis from Crohn's disease. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 18(12): 1172-8
- [89] Kalele K, Kulkarni N, Kathariya R (2015). Oral Squamous Cell Carcinoma: Picro Sirius Red Stain. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 9(10): Zj01
- [90] Setiadi JA, Dwihantoro A, Iskandar K, Heriyanto DS, Gunadi (2017). The utility of the hematoxylin and eosin staining in patients with suspected Hirschsprung disease. *BMC surgery*. 17(1): 71
- [91] Shao X (2002). Epithelial-Specific Cre/lox Recombination in the Developing Kidney and Genitourinary Tract. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13(7): 1837-46
- [92] Thomson RB, Ward DC, Quaggin SE, Igarashi P, Muckler ZE, Aronson PS (1998). cDNA cloning and chromosomal localization of the human and mouse isoforms of Ksp-cadherin. *Genomics*. 51(3): 445-51
- [93] Baum S (2008). The PAS Reaction for Staining Cell Walls. *CSH protocols*. 2008: pdb.prot4956
- [94] Bratthauer GL (2010). The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 588: 257-70
- [95] Redon CE, Dickey JS, Bonner WM, Sedelnikova OA (2009). gamma-H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin. *Advances in space research : the official journal of the Committee on Space Research (COSPAR)*. 43(8): 1171-8
- [96] Lawrence NJ, Sacco JJ, Brownstein DG, Gillingwater TH, Melton DW (2008). A neurological phenotype in mice with DNA repair gene *Ercc1* deficiency. *DNA Repair (Amst)*. 7(2): 281-91
- [97] Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR, Appeldoorn E, Odijk H, Oostendorp R, Ahmad A, van Leeuwen W, Theil AF, Vermeulen W, van der Horst GT, Meinecke P, Kleijer WJ, Vijg J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (2006). A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature*. 444(7122): 1038-43
- [98] Schermer B, Bartels V, Frommolt P, Habermann B, Braun F, Schultze JL, Roodbergen M, Hoeijmakers JH, Schumacher B, Nurnberg P, Dolle ME, Benzing T, Muller RU, Kurschat CE (2013). Transcriptional profiling reveals progeroid *Ercc1(-/Delta)* mice as a model system for glomerular aging. *BMC genomics*. 14: 559
- [99] Selfridge J, Hsia KT, Redhead NJ, Melton DW (2001). Correction of liver dysfunction in DNA repair-deficient mice with an *ERCC1* transgene. *Nucleic acids research*. 29(22): 4541-50
- [100] Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *The Journal of cell biology*. 146(5): 905-16
- [101] Duffield JS (2014). Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *The Journal of clinical investigation*. 124(6): 2299-306

- [102] Torgovnick A, Schumacher B (2015). DNA repair mechanisms in cancer development and therapy. *Frontiers in genetics*. 6: 157
- [103] Macia MS, Halbritter J, Delous M, Bredrup C, Gutter A, Filhol E, Mellgren AEC, Leh S, Bizet A, Braun DA, Gee HY, Silbermann F, Henry C, Krug P, Bole-Feysot C, Nitschké P, Joly D, Nicoud P, Paget A, Haugland H, Brackmann D, Ahmet N, Sandford R, Cengiz N, Knappskog PM, Boman H, Linghu B, Yang F, Oakeley EJ, Saint Mézard P, Sailer AW, Johansson S, Rødahl E, Saunier S, Hildebrandt F, Benmerah A (2017). Mutations in MAPKBP1 Cause Juvenile or Late-Onset Cilia-Independent Nephronophthisis. *American journal of human genetics*. 100(2): 323-33
- [104] Jackson PK (2013). Nek8 couples renal ciliopathies to DNA damage and checkpoint control. *Molecular cell*. 51(4): 407-8
- [105] Jain M, Kaiser RWJ, Bohl K, Hoehne M, Göbel H, Bartram MP, Habbig S, Müller RU, Fogo AB, Benzing T, Schermer B, Höpker K, Slaats GG (2019). Inactivation of Apoptosis Antagonizing Transcription Factor in tubular epithelial cells induces accumulation of DNA damage and nephronophthisis. *Kidney Int*. 95(4): 846-58
- [106] Shaukat Z, Liu D, Hussain R, Khan M, Gregory SL (2016). The Role of JNK Signalling in Responses to Oxidative DNA Damage. *Current drug targets*. 17(2): 154-63

## 7. Anhang

Lorem ipsum

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Morphologie der Nephronophthise
- Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Bilder und Struktur der motilen und nicht-motilen (primären) Zilien
- Abbildung 3: DNA-Reparaturmechanismen bei Einzel- und Doppelstrangbrüchen
- Abbildung 4: Genotyping der *Ercc1*-floxed- und Wildtypmäuse
- Abbildung 5: Renale Phänotyp der *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 8 Wochen
- Abbildung 6: Nierenfunktion der *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 8 Wochen
- Abbildung 7: DNA-Schäden und renale Histologie in *Ercc1*-Knockoutmäusen im Alter von 8 Wochen
- Abbildung 8: Renale Histologie der *Ercc1*-Knockoutmäusen im Alter von 21 Wochen
- Abbildung 9: Nierenfunktionsparameter der weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockoutmäuse im Alter von 21 Wochen
- Abbildung 10: Renale Histologie in 21 Wochen alten *Ercc1*-Knockoutmäusen
- Abbildung 11: Percentile Überleben der weiblichen und männlichen *Ercc1*-Knockoutmäuse in Wochen nach der Geburt

### 7.2. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Mutierte Gene bei der isolierten Nephronophthise
- Tabelle 2: Polymerase-Chain-Reaction (PCR) – Ansätze und Standardprotokolle