



FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA



DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

Morphologische Charakterisierung renaler Organoide aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena von

Lena Lyanne Marcella Rutten

Jena, 22.05.2023

Gutachter

1. Prof. Dr. Ralf Mrowka, Universitätsklinikum Jena
2. apl. Prof. Dr. Thomas Zimmer, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. Andreas Patzak, Charité – Universitätsmedizin Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2023

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | 7 |
| 1 Zusammenfassung..... | 10 |
| 2 Einleitung..... | 12 |
| 3 Ziele der Arbeit..... | 19 |
| 4 Methodik..... | 20 |
| 4.1 Klonierung der Plasmide..... | 20 |
| 4.1.1 Material..... | 20 |
| 4.1.2 Auswahl der Gene für die Reportersysteme..... | 22 |
| 4.1.3 Planung der Klonierung..... | 22 |
| 4.1.4 Design und Synthese der Oligonukleotide..... | 23 |
| 4.1.5 Generieren der Inserts..... | 23 |
| 4.1.6 Enzymatische Spaltung..... | 24 |
| 4.1.7 Ligation des Vektor-Plasmids mit den linken Homologie-Armen..... | 25 |
| 4.1.8 Transformation in <i>E. coli</i> Top 10..... | 26 |
| 4.1.9 Inokulation von Klonen..... | 26 |
| 4.1.10 Überprüfung der Plasmide..... | 27 |
| 4.1.11 Sequenzierung der Plasmide..... | 27 |
| 4.1.12 Anlegen einer Kryokultur..... | 27 |
| 4.1.13 Ligation der weiteren Inserts..... | 27 |
| 4.1.14 Ligation der Guideplasmide..... | 28 |
| 4.1.15 Weitere Klonierungsmethoden..... | 28 |
| 4.2 Zellkultur..... | 28 |
| 4.2.1 Material..... | 28 |
| 4.2.2 Auftauen und Kultivierung der Zellen..... | 30 |
| 4.2.3 Splitten und Einsaat der Zellen..... | 30 |
| 4.2.4 Stabile Transfektion zur Generierung der Reporter-Zelllinien..... | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.5 | Isolierung genomischer DNA | 31 |
| 4.2.6 | Lagerung der Zellen..... | 31 |
| 4.2.7 | Stimulation der Genexpression von NPHS2 und UMOD | 31 |
| 4.2.8 | Fluoreszenzanalyse am Konfokalmikroskop..... | 32 |
| 4.3 | qPCR- Analyse..... | 33 |
| 4.3.1 | Material | 33 |
| 4.3.2 | Isolation der RNA..... | 34 |
| 4.3.3 | Synthese der komplementären DNA..... | 34 |
| 4.3.4 | Durchführung der qPCR | 34 |
| 4.3.5 | Auswertung der qPCR | 35 |
| 4.4 | Kultivierung der humanen iPSC..... | 35 |
| 4.4.1 | Material | 35 |
| 4.4.2 | Auftauen der iPSC | 37 |
| 4.4.3 | Erhalt der iPSC in Kultur | 37 |
| 4.4.4 | Passagieren und Splitten der iPSC..... | 37 |
| 4.4.5 | Einfrieren der iPSC | 38 |
| 4.5 | Differenzierung der iPSC in humane renale Organoide..... | 38 |
| 4.5.1 | Material | 38 |
| 4.5.2 | Generieren der Organoide | 39 |
| 4.5.3 | Entnahme der Organoide und qPCR-Analyse | 42 |
| 4.6 | Histologische Untersuchung der Organoide | 44 |
| 4.6.1 | Material | 44 |
| 4.6.2 | Präparation der renalen Organoide..... | 46 |
| 4.6.3 | Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung..... | 48 |
| 4.6.4 | Immunfärbung der Organoide | 48 |
| 4.7 | Elektronenmikroskopische Untersuchung der Organoide..... | 50 |
| 4.7.1 | Material | 50 |
| 4.7.2 | Präparation und Untersuchung | 51 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5 | Ergebnisse | 52 |
| 5.1 | Histologische Untersuchungen der renalen Organoide | 52 |
| 5.1.1 | Übersichtsfärbung nach zwei Wochen Kultivierung | 52 |
| 5.1.2 | Übersichtsfärbung nach vier Wochen Kultivierung..... | 52 |
| 5.1.3 | Immunfärbung der renalen Organoide | 54 |
| 5.2 | Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der renalen Organoide | 56 |
| 5.2.1 | Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung nach zwei Wochen Kultivierung..... | 56 |
| 5.2.2 | Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung nach vier Wochen Kultivierung..... | 58 |
| 5.3 | qPCR-Analyse der renalen Organoide | 58 |
| 5.3.1 | qPCR-Analyse nach zwei Wochen Kultivierung..... | 59 |
| 5.3.2 | qPCR-Analyse nach vier Wochen Kultivierung | 61 |
| 5.4 | Analyse der NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinien | 62 |
| 5.4.1 | Steigerung der Expression von NPHS2 und UMOD durch die Verknüpfung mit den Fluorophorgenen | 62 |
| 5.4.2 | Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Reporter-Zelllinien | 63 |
| 6 | Diskussion | 67 |
| 6.1 | Generieren der humanen renalen Organoiden aus iPSC | 68 |
| 6.1.1 | Etablierung des Differenzierungsprotokolls..... | 68 |
| 6.1.2 | Nachweis multipler renaler Komponenten in den Organoiden | 68 |
| 6.1.3 | Zelllinien-spezifische Unterschiede und Diskrepanz zwischen Genexpression und Morphologie in den renalen Organoiden | 69 |
| 6.1.4 | Einfluss des Durchmessers auf Differenzierung, Versorgung, Vaskularisierung und Degeneration der renalen Organoide..... | 71 |
| 6.1.5 | Effekte einer Kultur von über zwei Wochen auf humane renale Organoide..... | 73 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6.1.6 | Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms und der Ureterknospe | 74 |
| 6.1.7 | Off-target Populationen und der Einsatz von multiplen Wachstumsfaktoren | 75 |
| 6.1.8 | Individualität der renalen Organoide und Reproduzierbarkeit des Protokolls | 75 |
| 6.1.9 | Große Übereinstimmungen zwischen humanem Nierengewebe und humanen renalen Organoiden | 76 |
| 6.2 | NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinie | 76 |
| 6.2.1 | Steigerung der Genexpression von NPHS2 und UMOD in den Reporter-Zelllinien | 77 |
| 6.2.2 | Nachweis von tdTomato und Funktionalität der Reporter-Zelllinien | 78 |
| 6.2.3 | Möglicher Funktionsverlust der Zielgene durch Expression als Fusionsprotein | 79 |
| 7 | Schlussfolgerungen | 80 |
| 8 | Literatur- und Quellenverzeichnis | 82 |
| 9 | Anhang | 87 |
| 9.1 | Auflistung der verwendeten Oligonukleotide | 87 |
| 9.2 | Ursprung der Mäusenieren | 89 |
| 9.3 | Abbildungsverzeichnis | 90 |
| 9.4 | Tabellenverzeichnis | 91 |
| 9.5 | Ehrenwörtliche Erklärung | 92 |
| 9.6 | Danksagung | 93 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------|--|
| A. dest | destilliertes Wasser |
| ANP | atriales natriuretisches Peptid |
| | |
| BCRT | Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| | |
| Cas | CRISPR-assoziierte Endonuklease |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CKD | chronische Nierenerkrankung |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats |
| | |
| DAB | Diaminobenzidin |
| dCas9 | katalytisch inaktive Cas9 |
| De | Desmosom |
| DMEM-VM | Dulbecco's Modified Eagle Vollmedium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPBS (-) bzw. (+) | Dulbecco's phosphate-buffered saline ohne bzw. mit Magnesium und Calcium |
| | |
| E8 | Essential 8 |
| EBs | Embryoid Bodies |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>E. coli</i> |
| | |
| FGF | Fibroblastenwachstumsfaktor |
| FLI | Fritz-Lipmann-Institut |
| FSU | Friedrich-Schiller-Universität |
| | |
| GBD | Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study |
| gDNA | genomische DNA |

| | |
|--------------------|---|
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| HCl | Chlorwasserstoff, Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| HEK | Human Embryonic Kidney |
| HEK-AWL-AWN | HEK 293-Zellen mit stabil integriertem CRISPR/Cas9 SAM Komplex; Eigenname der Arbeitsgruppe |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure |
| (h)(i)PSC | (humane) (induzierte) pluripotente Stammzellen |
| HLA | linker Homologie-Arm |
| HRA | rechter Homologie-Arm |
| HSF | humaner Hitzeschock-Transkriptionsfaktor |
| IF | Immunfärbung |
| IM | intermediäres Mesoderm |
| iPSC | induzierte pluripotente Stammzellen |
| KOSR | KnockOut™ Serumersatz |
| LB | Luria-Bertani |
| LSM | Laser Scanning Mikroskop |
| M | Mitochondrien |
| MW | Mediumwechsel |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natriumhydroxid |
| NF-κB | nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells |
| PAM | Protospacer adjacent Motif |
| PSC | pluripotente Stammzellen |
| (q)PCR | (quantitative) Polymerase-Kettenreaktion |

| | |
|--------------------|---|
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROCK | Rho-Kinase |
| RT | Raumtemperatur |
| SAM | Synergistic Activation Mediator |
| sgRNA | single guide-Ribonukleinsäure |
| S. O. C. | Super Optimal Broth |
| Tab. | Tabelle |
| TBE | Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat- Ethylendiamintetraessigsäure |
| TBS-T | Tris-buffered saline with Tween® 20 |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| tj | Tight Junctions |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| T75-Flasche | Flasche mit 75 cm ² Zellwachstumsbereich |
| ULA | ultra-low attachment |
| UTR | untranslatierter Bereich |
| VEGF | vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren |
| Wnt | Wingless-Typ |

1 Zusammenfassung

Die steigende Zahl chronisch Nierenkranker und die Limitationen bisheriger Therapien erfordern eine tiefergehende Analyse der renalen Pathophysiologie und die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Hierfür wird ein möglichst exaktes Modell der Niere benötigt. Sowohl die bisher eingesetzten Tiermodelle als auch zweidimensionale humane (Stamm-)Zellkulturen besitzen diverse Einschränkungen. Durch humane Organoide - aus Vorläuferzellen differenzierte, dreidimensionale, organähnliche Strukturen - könnten exaktere *in vitro*-Modelle der Niere generiert werden. Viele Protokolle zur Differenzierung renaler Organoide aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) sind allerdings äußerst komplex. Przepiorski *et al.* publizierten 2018 eine simple und effiziente Alternative.

Neben einem optimalen Modell sind auch die Untersuchungsmethoden entscheidend. U. a. können mittels Genomeditierung generierte Fluoreszenzgenbasierte Reporter-Zelllinien die Detektion bestimmter Zielgene ermöglichen und somit eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der humanen renalen Organoide spielen.

Ziele dieser Arbeit waren die Etablierung des von Przepiorski *et al.* (2018) publizierten Protokolls anhand zweier hiPSC-Linien und die anschließende Charakterisierung der renalen Organoide. Des Weiteren sollten zwei Reportersysteme für die nierenspezifischen und krankheitsrelevanten Gene NPHS2 und UMOD generiert und ihre Funktionalität getestet werden. Eine Kombination der Organoid-Technologie mit den Reporterkonstrukten wurde evaluiert.

Für die Differenzierung der humanen renalen Organoide wurden BCRT5-Zellen in Essential 8™ Medium und IMR90-Zellen im DEF-CS System verwendet. Die hiPSC wurden für die Formation von Embryoid Bodies (EBs) abgelöst und in Medium mit dem Wachstumsfaktor CHIR99021 überführt. An Tag 3 des Protokolls wurden die EBs in Medium mit KnockOut™ Serumersatz (KOSR) platziert. Nach acht Tagen traten erste Strukturen hervor. Die renalen Organoide wurden nach je etwa zwei oder vier Wochen entnommen und mit histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden sowie mithilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bzgl. ihres Entwicklungsstandes und ihrer Eigenschaften untersucht.

Für die Reportersysteme wurden Plasmide für das Verknüpfen von NPHS2 mit dem Fluorophoren mCherry bzw. von UMOD mit mNeonGreen kloniert. Die mit den Reporterkonstrukten zu modifizierenden Human Embryonic Kidney (HEK) 293-Zellen

enthielten bereits den CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM) Komplex, mithilfe dessen durch Stimulation der Expression von NPHS2 bzw. UMOD die Funktionalität der Reportersysteme getestet werden konnte.

In den renalen Organoiden wurden juvenile tubuläre Strukturen und potenzielle Glomeruli nachgewiesen. Die qPCR-Analysen zeigten die gesteigerte Expression der Marker-Gene des Endothels, des Glomerulus, des Tubulusapparates sowie des Sammelrohrs. Wie auch bei der Organoidmorphologie waren Zelllinien-spezifische Unterschiede auffällig. Ebenfalls wurde eine Diskrepanz zwischen histologisch sichtbaren Strukturen und der Steigerung der Genexpression festgestellt. Bei verlängerter Suspensionskultur kam es neben Wachstums- und Differenzierungsvorgängen auch zu degenerativen Prozessen, welche Folge eines fehlenden ausgereiften Gefäßnetzwerks sein könnten.

Es wurden zwei Reportersysteme für die Gene NPHS2 und UMOD generiert. Durch Konfokalmikroskopie erfolgte der Nachweis der Reportergene mCherry und mNeonGreen in den mit den Reporterkonstrukten modifizierten Zellen, wodurch die Funktionalität bewiesen werden konnte. Es zeigte sich, dass allein durch Verknüpfung von Gen und Fluorophor die Expression der Zielgene gesteigert wurde. Eine weitere Steigerung war durch Stimulation mithilfe des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes möglich. Es konnten Hinweise auf ein Verbleiben der für die Modifizierung genutzten Guides in den Zellen gefunden werden. Dies hätte u.a. eine verlängerte Aktivität der Cas9 zur Folge, könnte aber mittels Durchflusszytometrie behoben werden. Da die Fluoreszenzsignale im Zytoplasma nachgewiesen wurden, scheint die Expression von Zielgenen und Reportergen als Fusionsprotein die Integration in bzw. Verankerung an die Zellmembran zu behindern. Der Einsatz des selbst-schneidenden Peptids P2A bietet hier eine Lösung.

Zusammenfassend konnte das Protokoll von Przepiorski *et al.* (2018) erfolgreich etabliert werden. Die generierten humanen renalen Organoiden wurden charakterisiert und ihre besondere Eignung als Modell der Niere untermauert. Auch gelang es, zwei Reportersysteme mit den nierenspezifischen und krankheitsrelevanten Genen NPHS2 und UMOD zu generieren. Eine Modifikation der hiPSC mit den Reporterkonstrukten und anschließende Differenzierung könnte eine dreidimensionale, morphologische Charakterisierung humaner renaler Organoiden *in vitro* in Echtzeit ermöglichen.

2 Einleitung

Die menschliche Niere ist ein paarig angelegtes, lebenswichtiges Organ. Ihre Funktion umfasst u. a. die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, die Produktion von Hormonen und die Regulation des Blutdrucks sowie von Wasser-, Säure-Base- und Elektrolythaushalt (Abb. 1) (Zilles und Tillmann 2010). Die funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus Nierenkörperchen und Tubulussystem. Das Nierenkörperchen setzt sich aus einem Kapillarknäuel, Glomerulus genannt, und der Bowman-Kapsel zusammen. Der tubuläre Apparat lässt sich unterteilen in das proximale Konvolut, die Henle-Schleife, welche aus den geraden Abschnitten des proximalen und des distalen Tubulus gebildet wird, und in das distale Konvolut, an das sich das Sammelrohrsystem anschließt. Eine Niere enthält ca. eine Millionen Nephrone.

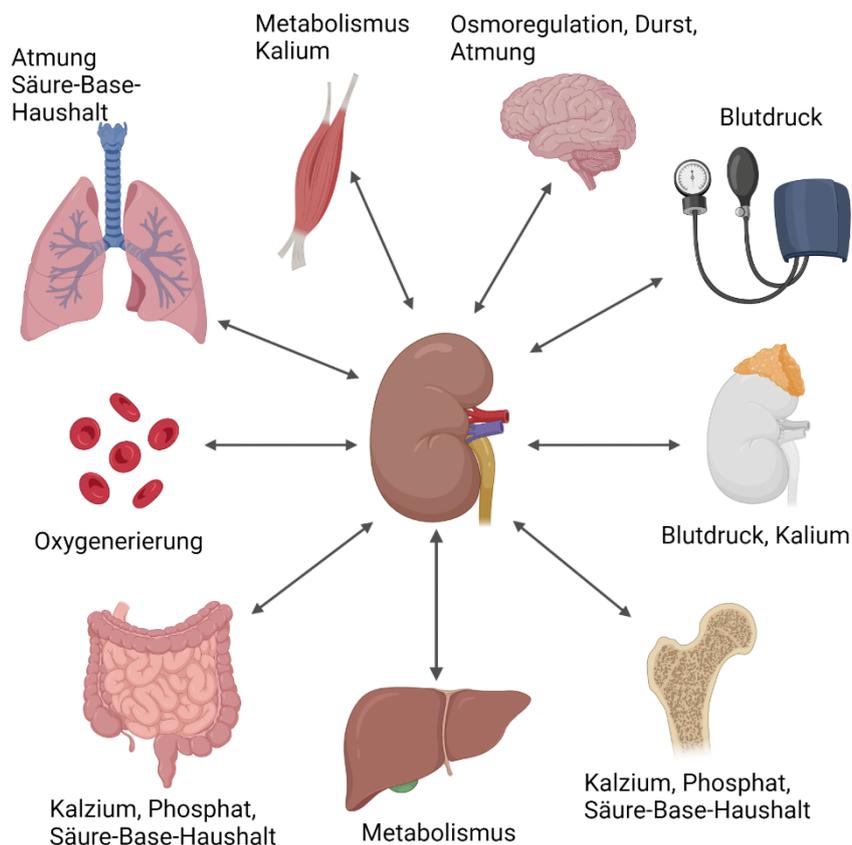


Abb. 1: Funktionen der Niere, angelehnt an Eckardt et al. (2013)

Die Niere ist beteiligt an der Regulation von Blutdruck, Wasser-, Säure-Base- und Elektrolythaushalt. Auch beeinflusst sie den Knochenstoffwechsel und ist verantwortlich für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie für die Synthese bestimmter Hormone.

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) und deren Risikofaktoren wie Bluthochdruck, Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 nehmen weltweit an Häufigkeit zu (Jha et al. 2013). Aufgrund der mannigfaltigen Aufgaben des Organs ist

die wachsende Zahl chronisch Nierenkranker umso relevanter. Auch der demografische Wandel trägt mit dem zunehmenden Anteil der älteren Bevölkerung zur steigenden Prävalenz der CKD bei (Eckardt et al. 2013). Laut Daten der Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD) der Universität von Washington ist die globale Prävalenz der CKD über alle Altersgruppen und Geschlechter hinweg von ca. 6,6 % im Jahr 1990 auf ca. 9,4 % im Jahr 2019 gestiegen (Abb. 2).

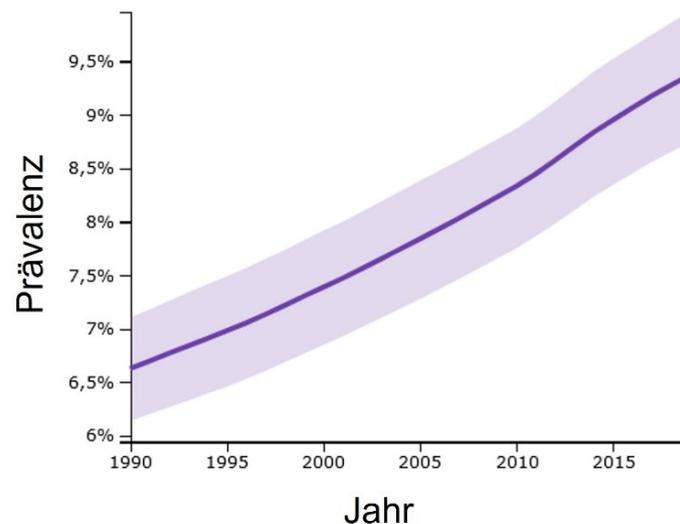


Abb. 2: Entwicklung der globalen Prävalenz der CKD für alle Geschlechter und Altersgruppen von 1990 bis 2019

Die steigende Anzahl an CKD-Patienten ist auf die zunehmende Prävalenz von Risikofaktoren wie Adipositas, Bluthochdruck und Diabetes mellitus Typ 2 sowie auf den demografischen Wandel zurückzuführen (Jha, Garcia-Garcia et al. 2013). Die Grafik wurde mithilfe des Online Tools der GBD der University of Washington erstellt und die Achsenbeschriftung nachträglich hinzugefügt (<http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>).

Dies führt zu einer zunehmenden Belastung der Gesundheitssysteme (Gupta et al. 2020). Auch die Lebensqualität der erkrankten Personen wird deutlich beeinträchtigt. Im Jahresbericht 2021 der Deutschen Stiftung Organtransplantation ist die CKD die häufigste Indikation zur Transplantation. Die Zahl der Anmeldungen zur Nierentransplantation im Zeitraum von 2015 bis 2021 lag durchweg über der tatsächlich durchgeführten Transplantationen in Deutschland (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2022). Der Mangel an Organspenden ist ein seit langem bestehendes Problem, das sich durch die zunehmende Prävalenz der CKD zuspitzen wird (Elsner 2004, Edgar et al. 2020). So ruft Prof. Dr. med. Bernhard Banas, Leiter der Abteilung für Nephrologie und Leiter des Universitären Transplantationszentrums des Universitätsklinikums Regensburg, zum Nachdenken über Auswege und Alternativen zur klassischen Transplantation auf (Deutsche Stiftung

Organtransplantation 2022). Auch die Problematik der Immunogenität ist im Bereich der Transplantationsmedizin von großer Relevanz und kann die Anzahl kompatibler Transplantate für einen Patienten stark einschränken (Edgar et al. 2020). Daher sind weitere Erkenntnisse hinsichtlich der Physiologie und Pathophysiologie der Niere sowie die Suche nach neuen therapeutischen Ansätzen inklusive alternativer Gewebeersatzstrategien vonnöten. Bisherige Forschung basierte u. a. auf Tiermodellen, die aufgrund von Inter-Spezies-Unterschieden und hohem Aufwand jedoch Limitationen aufweisen (Gupta et al. 2020, Miyoshi et al. 2020). Weitere Ansätze befassen sich mit zellulären Forschungsmodellen, bei denen humane Stammzellen eine stets prominentere Rolle einnehmen (Sterneckert et al. 2014). Stammzellen werden definiert über die uneingeschränkte Kapazität zur Selbst-Erneuerung, die Klonalität und das Potenzial, sich in alle Zell- und Gewebetypen zu differenzieren (Miyoshi et al. 2020, Kolios und Moodley 2013). Sie lassen sich anhand ihres Differenzierungspotenzials in omni-, pluri-, multi-, oligo- und unipotente Stammzellen einteilen, wobei im Kontext dieser Dissertationsschrift die PSC von besonderer Relevanz sind (Kolios und Moodley 2013). Pluripotente Zellen sind in der Lage, sich in alle drei Keimblätter, d.h. in die Zellen des Meso-, Endo- und Ektoderms, zu differenzieren (Miyoshi et al. 2020). Im Jahr 2006 gelang es Takahashi und Yamanaka durch Verwendung der vier Faktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 aus adulten Fibroblasten der Maus PSC zu erzeugen, welche sie induzierte PSC taufte (Takahashi und Yamanaka 2006). Ein Jahr später wurde die Methode erfolgreich auf humane adulte Fibroblasten übertragen (Takahashi et al. 2007). iPSC können für Zellersatzstrategien in der regenerativen Medizin, in der patientenspezifischen Medizin und in der Medikamententestung eingesetzt werden sowie der Erweiterung unseres Verständnisses über Organogenese und Pathogenese dienen (Inoue et al. 2014, Kolios und Moodley 2013). Dies wird u. a. durch die gezielte Differenzierung in bestimmte Zelltypen ermöglicht (Hariharan et al. 2019, Inoue et al. 2014). So konnten bereits iPSC-basierte Krankheitsmodelle für z. B. die spinale Muskelatrophie generiert werden (Sterneckert et al. 2014).

Trotz des enormen Potenzials der iPSC gibt es diverse Hürden. Durch die Zweidimensionalität der Monolayer-Kultur können *in vivo*-Gegebenheiten wie Zell-Zell- oder Zell-Umwelt-Interaktionen nur begrenzt *in vitro* nachgeahmt werden (Kapalczynska et al. 2018). Eine mögliche Lösung für diese Problematik bietet die Technologie der Organoide. Organoide sind aus Stamm- oder Vorläuferzellen

differenzierte, dreidimensionale organähnliche Strukturen, die Organ-spezifische Zelltypen und Funktionen aufweisen und durch eine Entwicklung via Selbstorganisation definiert sind (Lancaster und Knoblich 2014). Ähnlich wie die Stammzellen, aus denen sie generiert werden, besitzen Organoide enormes Potenzial als Modelle der Organo- und Pathogenese, für Toxizitäts- und Medikamententestungen und für die Entwicklung alternativer Gewebeersatzstrategien (Abb. 3) (Lancaster und Knoblich 2014). Durch ihre Dreidimensionalität können sie *in vivo*-Gegebenheiten realistischer *in vitro* nachahmen (Hale et al. 2018).

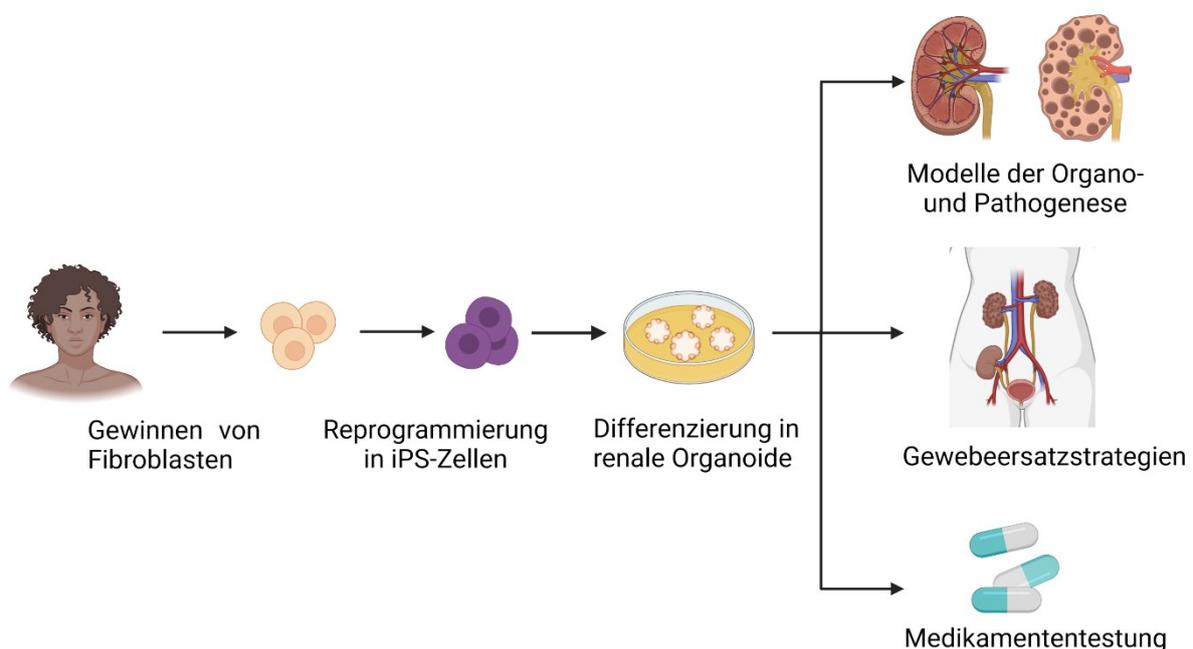


Abb. 3: Das Generieren humaner renaler Organoide und deren Anwendungen, angelehnt an Lancaster und Knoblich (2014)

Von Patienten werden z. B. adulte Fibroblasten gewonnen, in iPSC umgewandelt und in dreidimensionale Organoide differenziert. Diese können anschließend u. a. als Modelle der Organo- und Pathogenese, für die Medikamententestung und zur Entwicklung alternativer Organersatzstrategien angewandt werden.

Bis dato ist es bereits gelungen, Organoide von u. a. Leber, Darm, Prostata, Lunge, Pankreas, Brust, Ovar, Magen, Ösophagus und Niere von Maus und bzw. oder Mensch zu generieren (Lancaster und Knoblich 2014, Miyoshi et al. 2020). Zu den frühen Meilensteinen in der Differenzierung humaner renaler Organoide gehören u. a. die Publikationen von Takasato *et al.* (2014, 2015, 2016), Taguchi *et al.* (2014, 2017) und Morizane *et al.* (2015). Die dort beschriebenen Protokolle sind oft hoch anspruchsvoll sowie kosten- und zeitaufwendig. So verlangt ein von Taguchi *et al.* (2014) publiziertes Protokoll die Ko-Kultivierung der induzierten renalen

Vorläuferzellen mit embryonalem Mäuse-Rückenmark. Oftmals wird eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren parallel oder sukzessiv in abweichender Auswahl, Konzentration und von divergierender Dauer benötigt (Takasato et al. 2016). Die Diversität und Komplexität, welche die allgemeine Anwendbarkeit erschweren, inspirierten weitere Gruppen, universal gültige, simple und kostengünstigere Protokolle zu entwickeln. So publizierten Przepiorski *et al.* (2018) eine Methode, die übersichtlich, schnell, effizient und skalierbar ist. Das Protokoll verlangt lediglich den Einsatz eines Wachstumsfaktors, CHIR99021, zur Induktion des Primitivstreifens (Przepiorski et al. 2018). CHIR99021 wirkt als Wingless-Typ (Wnt)-Agonist, indem es den Inhibitor des Wnt-Signalwegs, die Glykogensynthase-Kinase 3, blockiert (Taguchi et al. 2014, Chandrasekaran et al. 2021). Die Anwendung von KOSR als Ersatz für den Fibroblastenwachstumsfaktor 9 (FGF9) lenkt anschließend die weitere Differenzierung des Primitivstreifens in das intermediäre Mesoderm (IM) (Przepiorski et al. 2018, Takasato et al. 2016). Das in Abb. 4 dargestellte Schema verdeutlicht die Differenzierung hiPSC mittels CHIR99021 und KOSR in renale Organoiden und zeigt auf, aus welchen Entitäten sich die spezifischen Abschnitte der Niere entwickeln.

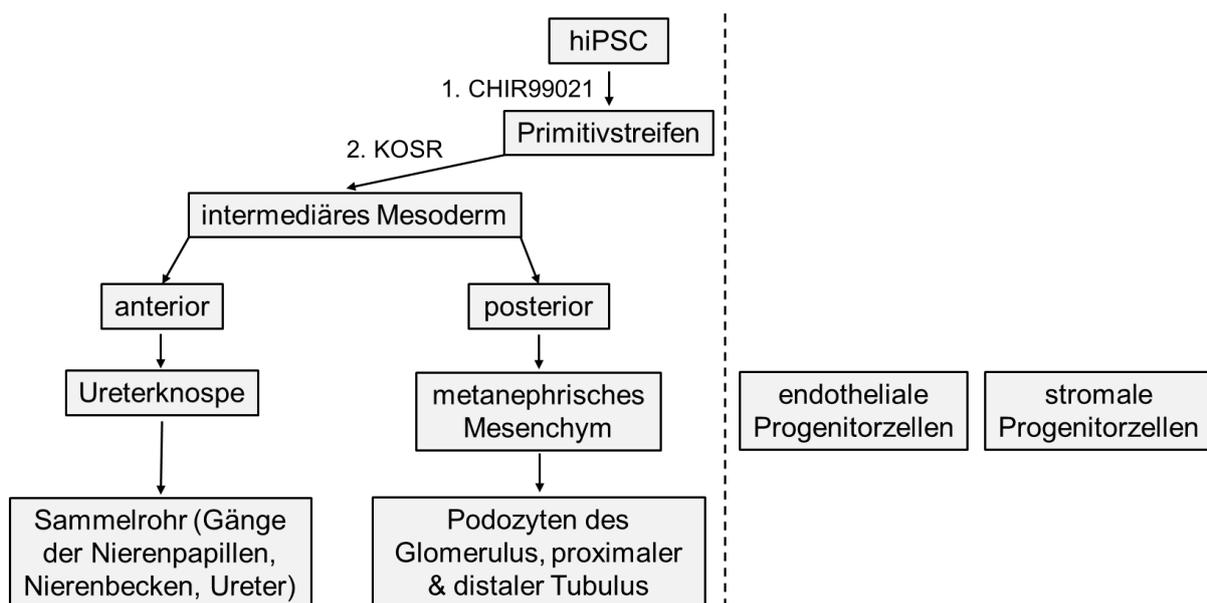


Abb. 4: Schema für die Differenzierung von hiPSC in renale Organoiden. Der Wnt-Agonist CHIR99021 induziert die Differenzierung des Primitivstreifens. Exakte Dosis und Dauer der CHIR99021-Anwendung können je nach Zelllinie variieren (Cruz, Song et al. 2017, Taguchi and Nishinakamura 2017). Bei weniger als drei Tagen Anwendung wird im späteren Verlauf hauptsächlich die Entwicklung des anterioren IM induziert, während ein längerer Zeitraum die Entstehung des posterioren IM begünstigt (Takasato et al. 2016). Nach der CHIR99021-Gabe folgt die Kultur in Medium versetzt mit KOSR als Substituent für FGF9. Aus dem anteriorem IM differenziert sich die Ureterknospe und nachfolgend das Sammelrohr, während sich aus dem posteriorem IM das metanephrische Mesenchym und letztlich die übrigen Abschnitte des Nephrons bilden (Takasato et al. 2015). Neben der Ureterknospe und dem metanephrischem Mesenchym sind auch endotheliale und stromale

Progenitorzellen für die Nephrogenese entscheidend (Takasato, Er et al. 2015). Diese entstehen ebenfalls aus dem IM, entweder als eigene Entitäten oder als Subgruppe des metanephrischen Mesenchym (Takasato et al. 2016).

In der Forschung sind neben einem optimalen Modell auch die passenden Analysemethoden entscheidend. Für die Untersuchung renaler Organoide sind u. a. die Histologie, die Immunhistochemie, die Elektronenmikroskopie, die qPCR-Analyse sowie Methoden der Genomeditierung geeignet. Die Genomeditierung beschreibt eine gezielte Änderung der genomischen Information (Li et al. 2020). Durchgesetzt hat sich in den letzten Jahren die Anwendung von Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) zusammen mit einer CRISPR-assoziierten Endonuklease (Cas) (Li et al. 2020, Zhang et al. 2015). Der am häufigsten verwendete Subtyp ist das CRISPR/Cas9-System (Li et al. 2020). Die Cas9 ist Bestandteil des adaptiven Immunsystems des Bakteriums *Streptococcus pyogenes* (Li et al. 2020). Die CRISPR/Cas9-Technologie ermöglicht im Rahmen der Genomeditierung das Generieren von Reportersystemen. Diese bestehen aus Reporter genen, welche die Detektion oder Quantifizierung der Expression bestimmter Zielgene gestatten (Debnath et al. 2010). Als Zielgene können organspezifische Gene, krankheitsrelevante Gene oder auch solche, deren Funktion erforscht werden soll, gewählt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die nierenspezifischen, krankheitsrelevanten Gene NPHS2 und UMOD als Zielgene festgelegt (Boute et al. 2000, Scolari et al. 2015). NPHS2 kodiert für das integrale Membranprotein Podozin, welches die Architektur der Podozyten und ihrer Fortsätze bedingt (Boute et al. 2000). Diese sichern den Erhalt der glomerulären Schlitzmembran und damit der Filterfunktion der Niere (Boute et al. 2000). Aufgrund der Lokalisation der Podozyten lässt sich NPHS2 als Marker-Gen zur Darstellung der Glomeruli verwenden (Abb. 5). Das Gen UMOD kodiert für das Protein Uromodulin. Seine Funktion ist nicht vollständig gesichert, doch geht man davon aus, dass Uromodulin u. a. an der Regulation verschiedener Transporter in der Niere beteiligt ist (Scolari et al. 2015). Uromodulin ist in der luminalen Membran der epithelialen Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Asts der Henle-Schleife lokalisiert und kann somit zur repräsentativen Darstellung von Teilen des tubulären Systems genutzt werden (Abb. 5) (Knaup und Wiesener 2019, Scolari et al. 2015).

Durch Verknüpfung bzw. durch sogenanntes Tagging von Zielgenen und Reporter genen mittels CRISPR/Cas9 entsteht das Reportersystem. Als Reporter gene sind u. a. Fluorophore wie mNeonGreen, mCherry oder tdTomato geeignet (Fetter et al. 2015).

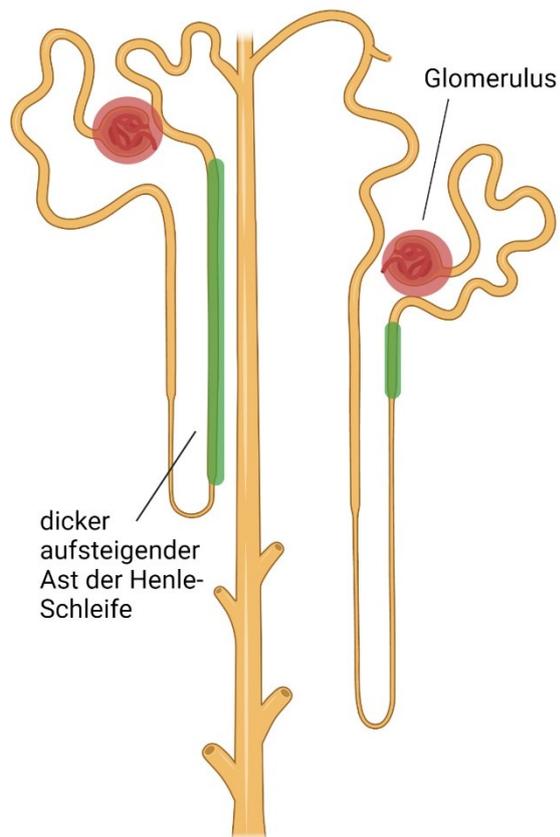


Abb. 5: Lokalisation von Podozin (rot) und Uromodulin (grün) im Nephron

Die Fluoreszenzmikroskopie spielt daher als Werkzeug zur Erforschung der Zellphysiologie eine große Rolle und war essenziell für viele Entdeckungen in diesem Gebiet (Renz 2013, Lichtman und Conchello 2005, Sanderson et al. 2014). Zelllinien, die mit solchen Reportersystemen modifiziert wurden, haben bereits bei der Erforschung der Nephrogenese von Mäusen auf molekularer Ebene Erfolge erzielt (Vanslambrouck et al. 2019). Ein enormer Vorteil von Reportersystemen ist, dass nach der initialen Modifikation der Zellen eine erneute invasive Manipulation nicht erforderlich ist. Dies vermindert u. a. die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination.

Auch können die Ergebnisse in Echtzeit und kontinuierlich beobachtet, dokumentiert und analysiert werden (Vanslambrouck et al. 2019, Przepiorski et al. 2022). Im Anschluss können direkt weitere Untersuchungen am selben Modell angeschlossen werden. Dies ist bei anderen analytischen Prozeduren wie der histochemischen Verarbeitung aufgrund der Natur dieser Methodik nicht möglich.

3 Ziele der Arbeit

Die steigende Prävalenz der CKD kombiniert mit ihren limitierten Behandlungsmöglichkeiten und der hohen Morbidität und Mortalität erfordert die Entwicklung innovativer therapeutischer Strategien (Asgari et al. 2017). Diese bedürfen neuer, präziser Forschungsansätze, um Defizite bisheriger Modelle auszugleichen (Gupta et al. 2020). Einer dieser innovativen Ansätze ist die Differenzierung humaner renaler Organoide aus iPSC. Die Organoid-Technologie besitzt enormes Potenzial als möglichst exaktes und potenziell patientenspezifisches Modell der Niere und ihrer Anteile.

Erstes Ziel dieser Arbeit war daher die Etablierung eines Protokolls zur Differenzierung humaner renaler Organoide als Modelle der Niere anhand zweier iPSC-Linien. Das gewählte Protokoll von Przepiorski *et al.* (2018) postuliert eine universelle, robuste und simple Methodik im Gegensatz zur Komplexität der bis dato publizierten Differenzierungsprotokolle. Die generierten humanen renalen Organoide wurden mittels histologischer, immunhistologischer und elektronenmikroskopischer Techniken untersucht. Dadurch sollte die Qualität der renalen Organoide sowie ihre Eignung als neuartige Technologie zur Erforschung von Organo- und Pathogenese der Niere, zur Medikamenten- und Toxizitätstestung sowie zur Entwicklung alternativer Gewebeersatzstrategien beurteilt werden. Eine Analyse der Organoide via qPCR mithilfe gezielter Marker-Gene diente zur quantitativen Ergänzung der morphologischen Betrachtungen. Als weitere Charakterisierungsmethode der renalen Organoide wurden Reportersysteme in Betracht gezogen. Sie bieten die Möglichkeit, zelluläre Vorgänge in Echtzeit zu visualisieren (Przepiorski et al. 2022). Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten zwei Reporter-Zelllinien mit den nierenspezifischen, krankheitsrelevanten Zielgenen NPHS2 und UMOD generiert und auf ihre Funktionalität untersucht werden. Eine zukünftige Kombination von iPSC- und Organoid-Technologie mit diesen Reporter-Zelllinien zur optimierten Analyse der Forschungsmodelle wurde evaluiert.

4 Methodik

4.1 Klonierung der Plasmide

4.1.1 Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|-------------------------------|
| GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix | Promega |
| Multiply®-Pro 0.2 ml Biosphere® | Sarstedt AG & Co. |
| Biozym LE Agarose | Biozym Scientific |
| TBE-Puffer (10x): 1 M TRIS | Carl Roth |
| SYBR™ Safe DNA Gel Stain | Thermo Fisher Scientific |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | Thermo Fisher Scientific |
| AarI und Puffer | Thermo Fisher Scientific |
| Ascl und Puffer | New England Biolabs |
| MluI-HF und Puffer | New England Biolabs |
| NotI-HF und Puffer | New England Biolabs |
| PacI und Puffer | New England Biolabs |
| Esp3I und Puffer | Thermo Fisher Scientific |
| T4 DNA Ligase und T4 DNA Ligase Reaction Buffer | New England Biolabs |
| Antarctic Phosphatase und Puffer | New England Biolabs |
| One Shot™ TOP10 chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> , Plasmid mit hoher Kopienzahl | Thermo Fisher Scientific |
| S.O.C. Medium | Thermo Fisher Scientific |
| Ampicillin | Sigma-Aldrich Chemie |
| LB Agar (Luria/Miller) | Carl Roth |
| LB Broth (Luria/Miller) | Carl Roth |
| Petrischalen | Greiner Bio-One International |
| Glycerin | Carl Roth |
| T311-CRYOVIAL® Internal thread with silicone washer seal | Simport Scientific |

Kits

| | |
|---------------------------------|---------------|
| NucleoSpin Plasmid EasyPure | MACHERY-NAGEL |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up | MACHERY-NAGEL |
| NucleoSpin Tissue | MACHERY-NAGEL |

Vektorplasmide

| | |
|---|---------------------------|
| Plasmid AVO (pGuide-it-tdTomato Vector als Teil des Guide-it™ CRISPR/Cas9 System) | Takara Clontech |
| Plasmid BHO (LA_Adapter_mNeonGreen_MV_puro_TK_RA_Adapter) | kloniertes Plasmid der AG |
| Plasmid AIT (H2B-mCherry) | Addgene |
| Plasmid BKZ (lenti sgRNA (MS2) puro backbone) | Addgene |

Online Tools

| | |
|--|---|
| BioGPS (http://biogps.org) | The Scripps Research Institute |
| UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu) | University of California |
| Ensembl (https://www.ensembl.org/index.html) | European Molecular Biology Laboratory |
| Benchling (https://www.benchling.com/) | Benchling, Inc. |
| Cas9 SAM (http://sam.genome-engineering.org/) | Zhang lab |
| Primer design tips (https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-design-tools.html) | Thermo Fisher Scientific |
| Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) | National Center for Biotechnology Information |

Software und Geräte

| | |
|--|--------------------------|
| Vector NTI, Version 9.1.0 | Thermo Fisher Scientific |
| Debut Videoaufnahme und Bildschirmrekorder | NCH Software |
| T100™ Thermal Cycler (PCR-Maschine) | Bio-Rad Laboratories |
| Sub-Cell GT Cell (Elektrophoresekammer) | Bio-Rad Laboratories |
| Mini-Sub Cell GT Cell (Elektrophoresekammer) | Bio-Rad Laboratories |
| PowerPac 200 (Elektrophoresenetztteil) | Bio-Rad Laboratories |
| peqPOWER 250 (Elektrophoresenetztteil) | PEQLAB Biotechnologie |
| Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator | Thermo Fisher Scientific |
| GKB CB-3803S (Kamera zur Geldokumentation) | Sony Europe B.V. |
| Präzisionswaage EW 420-3NM | KERN & SOHN |
| Thermomixer comfort (Thermoschüttler) | Eppendorf AG |

| | |
|---|--------------------------|
| ThermoMixer F1.5 (Thermoschüttler) | Eppendorf AG |
| Thermomixer (Thermoschüttler) | Thermo Fisher Scientific |
| AccuBlock™ Mini Digital Dry Bath | Labnet International |
| Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge | Thermo Fisher Scientific |
| Centrifuge 5415 C | Eppendorf AG |
| Centrifuge 5424 R | Eppendorf AG |
| Mini-Zentrifuge ROTILABO® Uni-fuge | Carl Roth |
| Vortex-Genie 2 | Scientific Industries |
| MaxQ™ 6000 (Inkubator) | Thermo Fisher Scientific |
| Plus II Incubator | Gallenkamp |
| NanoDrop™ 8000 Spektralphotometer | Thermo Fisher Scientific |

4.1.2 Auswahl der Gene für die Reportersysteme

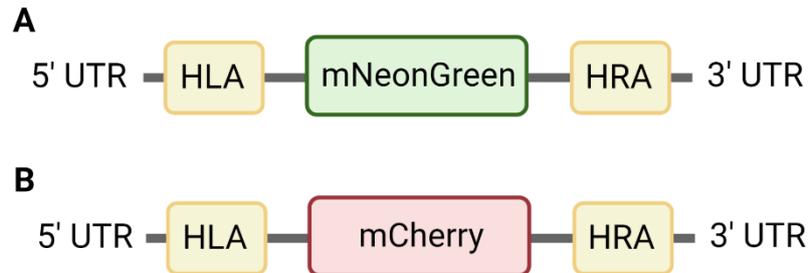
Die Auswahl der Marker-Gene für die Reportersysteme erfolgte mithilfe der Website BioGPS. Gesucht wurden Gene, die möglichst exklusiv, verstärkt und lokal definiert in der Niere exprimiert werden. Nach weiterer Selektion mittels UCSC Genome Browser wurde die Auswahl auf die Gene NPHS2 und UMOD reduziert.

4.1.3 Planung der Klonierung

Die genomische Sequenz für das Design der Guide- und Taggingplasmide wurde von der Ensembl-Datenbank heruntergeladen, wobei die am häufigsten im Menschen vorkommende Transkriptvariante gewählt wurde. Für das Design der Guideplasmide wurde zusätzlich die Website Benchling genutzt. Die Guideplasmide enthalten single guide-Ribonukleinsäuren (sgRNA), die die Cas9 im Rahmen der Genomeditierung zur korrekten Position führen. Die Taggingplasmide enthalten u. a. eine Puromycinresistenz, die Homologie-Arme und das Fluorophor, welches als Reporter gen mit dem Zielgen im Genom verknüpft werden soll (Abb. 6). Die Homologie-Arme sind identisch zu den Regionen rechts bzw. links der gewünschten Insertionsstelle im Genom. Sie ermöglichen nach Doppelstrangbruch durch die Cas9 die Reparatur via homologer Rekombination und somit die Insertion der Fluorophorgene an korrekter Position (Liu et al. 2019).

Mithilfe des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes lässt sich gezielt die Expression bestimmter Gene stimulieren (Koner mann et al. 2015). Die für die Stimulation der Zielgene NPHS2 und UMOD notwendigen Guidesequenzen lieferte das vom Zhang lab bereitgestellte online-Design Tool, welches Stand 2022 deaktiviert wurde.

Alle weiteren Planungsschritte für die Guide- und Taggingplasmide fanden unter Verwendung des Klonierungsprogrammes Vector NTI statt. NPHS2 wurde digital mit dem Reportergen mCherry ausgestattet, UMOD mit mNeonGreen (Abb. 6). Die Expression von Zielgen und Reportergen wurde in Form eines Fusionsproteins geplant.



*Abb. 6: Vereinfachtes Schema für die Planung der Reporterkonstrukte
 A: Schematische Darstellung des UMOD-Taggingplasmids mit mNeonGreen.
 B: Schematische Darstellung des NPHS2-Taggingplasmids mit mCherry. An das Fluorophorgen mNeonGreen bzw. mCherry schließt sich am 5' untranslatierten Bereich (UTR) der linken Homologie-Arm (HLA) und am 3' UTR der rechten Homologie-Arm (HRA) an. Diese sichern die Insertion an korrekter Position im Genom.*

4.1.4 Design und Synthese der Oligonukleotide

Das Design der für die Klonierung der Guide- und Taggingplasmide notwendigen Primer erfolgte mit Vector NTI. Die Herstellung der Oligonukleotide wurde bei Eurofins Genomics in Auftrag gegeben. Die erhaltenen Produkte besaßen eine Molarität von 100 µM. Sie wurden in Elutionspuffer mit 5 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan/ Salzsäure (TRIS/HCl) und pH=8,5 aus dem Kit NucleoSpin Plasmid EasyPure von MACHERY-NAGEL gelöst. Eine 1:10 verdünnte Arbeitslösung mit einer Molarität von 10 µM wurde erstellt. Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle (Tab.) 13 im Anhang hinterlegt.

4.1.5 Generieren der Inserts

Zu den Inserts zählten die linken und rechten Homologie-Arme, das Fluorophorgen mCherry und die Guidesequenzen. Die Guide-Oligonukleotide wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und für 10 min bei 95 °C inkubiert.

Die übrigen Inserts wurden mithilfe der PCR amplifiziert. Als Vorlagen dienten die genomische Desoxyribonukleinsäure (gDNA) von HEK 293-Zellen oder Plasmide, die das gewünschte Insert bereits enthielten. Die gDNA wurde mit dem NucleoSpin Tissue Kit (MACHERY-NAGEL) isoliert.

Für die PCR-Ansätze wurde der GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix (Promega) eingesetzt. Die notwendigen Komponenten sind in Tab. 1 aufgeführt, das Protokoll in Tab. 2.

Tab. 1: Komponenten für die PCR

| Komponente | Menge (Gesamtvolumen 25 µl) |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| GoTaq G2 Hot Start Green Master Mix | 12,5 µl |
| forward-Primer (10 µM) | 2,5 µl |
| reverse-Primer (10 µM) | 2,5 µl |
| DNA als Vorlage | 250 ng |
| Nuklease-freies Wasser | Auffüllen auf 25 µl |

Tab. 2: Protokoll der PCR

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|---|---------------|------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 2 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 20 s | 30 |
| Primerhybridisierung (Modifikation je nach Primer) | 72 °C – 62 °C | 30 s | 30 |
| Elongation | 72 °C | 1 min/1 kb | 30 |
| finale Elongation | 72 °C | 5 min | 1 |

Die PCR-Produkte wurden in einem einprozentigen Agarosegel mit TRIS-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer (TBE-Puffer) aufgetrennt. Zum Anfärben der DNA-Banden diente der SYBR™ Safe Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) in einer Verdünnung von 1:10.000. Als Marker wurden 12 µl des GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Trennung der DNA erfolgte in Gelelektrophoresekammern gefüllt mit TBE-Puffer bei 6-7 V/cm für 35 min. Die Zielbanden wurden ausgestanzt und mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits (MACHERY-NAGEL) aufgereinigt.

4.1.6 Enzymatische Spaltung

Die enzymatische Spaltung der PCR-Produkte wurde bei vom Enzym-Hersteller empfohlener Temperatur für vier Stunden oder über Nacht unter Halbierung der Enzymmenge durchgeführt. Teilweise wurde nur ein Restriktionsenzym eingesetzt. Die Komponenten für die enzymatische Spaltung sind in Tab. 3 aufgezeigt und gelten auch für die Vektor-Plasmide.

Tab. 3: Komponenten für die enzymatische Spaltung

| Komponente | Menge (Gesamtvolumen 30 µl) |
|------------------------|-----------------------------|
| Puffer | 3 µl |
| Enzym 1 | 1 µl |
| Enzym 2 | 1 µl |
| DNA | 2 µg |
| Nuklease-freies Wasser | Auffüllen auf 30 µl |

Linke Homologie-Arme wurden mit NotI-HF und PacI geschnitten, rechte Homologie-Arme mit AscI und AarI. Die enzymatische Spaltung von mCherry erfolgte mit PacI und MluI-HF. Die geschnittenen Inserts wurden erneut mit dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHERY-NAGEL) aufgereinigt.

Für die Ligation der Inserts in die Vektor-Plasmide erfolgte die Spaltung der Empfängerplasmide mit denselben Enzymen, mit denen die jeweiligen Inserts geschnitten wurden. Ausnahme bildeten die Vektor-Plasmide AVO (pGuide-it-Tomato Vector) und BKZ (lenti sgRNA (MS2) puro backbone) der späteren Guide-Plasmide, die mit Esp3I gespalten wurden. Aufgrund der Größe der geschnittenen Plasmide wurden diese zur Auftrennung auf ein einprozentiges Agarosegel gegeben. Anschließend wurden die jeweiligen Banden ausgestanzt und aufgereinigt.

4.1.7 Ligation des Vektor-Plasmids mit den linken Homologie-Armen

Die linken Homologie-Arme wurden mit dem geschnittenen Plasmid BHO (LA_Adapter_mNeonGreen_MV_puro_TK_RA_Adapter) unter Verwendung der T4 DNA Ligase (New England Biolabs) ligiert. Die Komponenten der Ligation wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert (Tab. 4). Das Insert wurde im dreifachen Überschuss zum Empfängerplasmid hinzugegeben. Das Verhältnis der Länge von Empfängerplasmid zu Insert wurde hierbei berücksichtigt. Dies ist in Tab. 4 beispielhaft illustriert. Der Ligationsansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation bei 65 °C für weitere 10 min. Parallel wurde ein Religationsansatz ohne Insert als Kontrolle mitgeführt.

Elektiv erfolgte im Anschluss eine enzymatische Spaltung zur Präselektion mit spezifisch ausgewählten Restriktionsenzymen. Hierfür wurden Enzym und Puffer wie in Tab. 3 aufgezeigt zum Ligationsansatz hinzugegeben und für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Reaktion durch Inkubation bei Enzym-spezifischer Inaktivierungstemperatur. Die Präselektion bewirkt, dass Vektor-

Plasmide, die sich ohne Aufnahme des Inserts wieder geschlossen haben, geschnitten werden und im nächsten Schritt, der Transformation, nicht von den *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien vermehrt werden können.

Tab. 4: Komponenten für die Ligation mit T4 DNA Ligase

| Komponente | Menge (Gesamtvolumen 20 µl) |
|----------------------------|-----------------------------|
| T4 DNA Ligase Puffer (10x) | 2 µl |
| Vektor DNA (4 kb) | 50 ng (0,02 pmol) |
| Insert DNA (1 kb) | 37,5 ng (0,06 pmol) |
| T4 DNA Ligase | 1 µl |
| Nuklease-freies Wasser | Auffüllen auf 20 µl |

4.1.8 Transformation in *E. coli* Top 10

Das Protokoll für die Transformation zur Aufnahme der ligierten Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* Top10 wurde angelehnt an das Transformation Protocol (C2925) von New England Biolabs. Ein Volumen von 2 µl des Ligationsansatzes wurde auf 50 µl chemisch kompetente *E. coli* Top10 gegeben und für 5 min auf Eis gestellt. Es folgte die Hitzeinaktivierung bei 42 °C für 30 s. Anschließend wurden 200 µl vorgewärmtes Super Optimal Broth (S.O.C.) Medium hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für 30 min bei 350 rpm und 37 °C auf einen Thermomixer platziert. Der Ansatz wurde auf Luria-Bertani (LB)-Agarplatten mit einer Ampicillinkonzentration von 100 µg/ml ausplattiert. Die verwendeten Ausgangsplasmide enthalten eine Ampicillinresistenz. Durch Hinzufügen von Ampicillin im LB-Agar und im LB-Medium kann das Wachstum von *E. coli* Bakterien, die kein Plasmid aufgenommen haben und somit über keine Resistenz verfügen, vermindert werden.

4.1.9 Inokulation von Klonen

Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden mehrere Klone von den Agarplatten ausgewählt, mithilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in Zentrifugenröhrchen mit 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben. Das Verhältnis von Klonen auf der Agarplatte des Ligationsansatzes zu denen auf der Agarplatte des Religationsansatzes diente der Qualitätskontrolle der enzymatischen Spaltung des Empfängerplasmids und somit der Abschätzung des prozentualen Anteils von Religationsklonen an den Transformanden. Nach Inkubation der Zentrifugenröhrchen

bei 37 °C und 225 rpm für 16 h erfolgte die Aufreinigung der Klone mithilfe des NucleoSpin Plasmid EasyPure Kits (MACHERY-NAGEL).

4.1.10 Überprüfung der Plasmide

Mit individuell ausgewählten Restriktionsenzymen wurden die zu prüfenden Plasmide für 30 min inkubiert. Das *in silico* geplante Bandenmuster der enzymatischen Spaltung sollte eine Unterscheidung zwischen Religationsklonen und Klonen mit integriertem PCR-Produkt ermöglichen. Die Komponenten sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Komponenten für die Überprüfung der Plasmide mithilfe enzymatischer Spaltung

| Komponente | Menge (Gesamtvolumen 10 µl) |
|------------------------|-----------------------------|
| Puffer | 1 µl |
| Enzym 1 | 0,5 µl |
| Enzym 2 | 0,5 µl |
| DNA | 400 ng |
| Nuklease-freies Wasser | Auffüllen auf 10 µl |

4.1.11 Sequenzierung der Plasmide

Die Proben wurden auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Klone, deren Bandenmuster der *in silico*-Planung entsprachen, wurden zur Sequenzierung an Eurofins Genomics gesandt. Als Sequenzierprimer wurden Primer von Eurofins ausgewählt, die stromaufwärts oder stromabwärts der erwarteten Integrationsposition des PCR-Produkts binden.

4.1.12 Anlegen einer Kryokultur

Nach Sequenzierung eines Plasmids wurde die zugehörige *E. coli*-Kolonie zur Inokulation einer Flüssigkultur mit 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verwendet und bei 37°C über Nacht für mindestens 12 h schüttelnd mit 225 rpm inkubiert. Zusätzlich wurde eine Kryokultur angelegt, indem 600 µl der bewachsenen *E. coli*-Kultur mit 400 µl eines 50%igen Glycerin-Wasser-Gemisches in ein Kryoröhrchen überführt und bei - 80 °C gelagert wurden.

4.1.13 Ligation der weiteren Inserts

Nach Integration des PCR-Produktes, welches als linker Homologie-Arm dient, wurde das generierte Plasmid mit *Ascl* und *AarI* gespalten, um das als rechten Homologie-Arm dienende PCR-Produkt in den Vektor ligieren zu können. Das Zielplasmid für das Tagging von NPHS2 wurde zusätzlich mit *PacI* und *MluI*-HF geschnitten, um das

Fluorophorgen mNeonGreen mit mCherry ersetzen zu können. Es wurde wie in 4.1.5 bis 4.1.12 beschrieben vorgegangen.

4.1.14 Ligation der Guideplasmide

Die geschnittenen Empfänger-Plasmide für die Guides wurden mit beiden Guide-Oligonukleotiden ligiert. Der Ablauf erfolgte wie in 4.1.5 bis 4.1.12 geschildert.

4.1.15 Weitere Klonierungsmethoden

Bei einigen Klonierungen wurde eine Plasmiddephosphorylierung mit Antarktischer Phosphatase (New England Biolabs) durchgeführt. Diese Methode wurde angewandt, wenn der Anteil von Religationsklonen überwog und verhindert die Religation von nur einmalig geschnittenen Empfängervektoren. Die Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert (Tab. 6). Die Reaktion wurde durch zweiminütige Inkubation bei 85 °C beendet. Mit dem dephosphoryliertem Empfängerplasmid wurde anschließend die Ligation wie unter 4.1.7 beschrieben durchgeführt.

Tab. 6: Komponenten für die Dephosphorylierung

| Komponente | Volumen (Gesamtvolumen 20 µl) |
|---|-------------------------------|
| geschnittenes Plasmid | 5 µl |
| Antarctic Phosphatase Reaction Puffer (10x) | 2 µl |
| Antarctic Phosphatase | 1 µl |
| Nuklease-freies Wasser | Auffüllen auf 20 µl |

4.2 Zellkultur

4.2.1 Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------------|
| DMEM, high glucose, HEPES, no phenol red | Thermo Fisher Scientific |
| Dimethylsulfoxid | Sigma-Aldrich Chemie |
| Fetales Kälberserum | Merck KGaA |
| Penicillin-Streptomycin | Sigma-Aldrich Chemie |
| Trypsin-EDTA | Thermo Fisher Scientific |
| Puromycin | InvivoGen |
| DPBS, no calcium, no magnesium | Thermo Fisher Scientific |
| DPBS, calcium, magnesium | Thermo Fisher Scientific |

| | |
|---|----------------------------------|
| Hygromycin B | Thermo Fisher Scientific |
| Blasticidin | InvivoGen |
| Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent | Thermo Fisher Scientific |
| Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium | Thermo Fisher Scientific |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Carl Roth |
| Zellschaber | Sarstedt |
| Cellview Microplatte, 96 Well, Cycloolefin, F-Boden (Kaminform), Glasboden, schwarz, tc, Abdeckplatte, steril, einzeln verpackt | Greiner Bio-One International |
| Neubauer-Zählkammer | Marienfeld Superior |

Kits

| | |
|-------------------|---------------|
| NucleoSpin Tissue | MACHERY-NAGEL |
|-------------------|---------------|

Software und Geräte

| | |
|---|--------------------------|
| Vector NTI, Version 9.1.0 | Thermo Fisher Scientific |
| CO2-Inkubator C 150 | BINDER GmbH |
| Sicherheitswerkbank Holten Lamin Air | Thermo Fisher Scientific |
| Axio Vert.A1 Mikroskop | Carl Zeiss Microscopy |
| HXP 120 V Kompaktlichtquelle | Carl Zeiss Microscopy |
| Centrifuge 5702 | Eppendorf |
| Wasserbad LAUDA Aqualine AL12 | LAUDA DR. R. WOBSE |
| Nalgene® Mr. Frosty® Cryo 1°C Freezing Containers | Thermo Fisher Scientific |
| ZEISS LSM 980 mit Airyscan 2 | Carl Zeiss Microscopy |
| ZEN 3.1 | Carl Zeiss Microscopy |

Medien

| Medium | Zusammensetzung |
|------------|---|
| DMEM-VM | DMEM, high glucose, HEPES, no phenol red 10 % fetales Kälberserum 1 % Penicillin-Streptomycin |
| Kryomedium | DMEM, high glucose, HEPES, no phenol red 5 % fetales Kälberserum 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) |

Grundzelllinie

Als Grundzelllinie dienten HEK 293-Zellen mit stabil integriertem CRISPR/Cas9 SAM Komplex, genannt HEK-AWL-AWN-Zellen (Malecha 2019, Mrowka et al. 2018). Die Kultur erfolgte in Dulbecco's Modified Eagle Vollmedium (DMEM-VM) mit 100 µg/ml Hygromycin B und 10 µg/ml Blasticidin.

4.2.2 Auftauen und Kultivierung der Zellen

In einer Flasche mit 75 cm² Zellwachstumsbereich (T75-Flasche) wurden 8 ml DMEM-VM vorgelegt und für 30 min in den Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ platziert. Ein Kryoröhrchen HEK-AWL-AWN-Zellen wurde aus dem Stickstoff-Lager entnommen und im Wasserbad bei 37 °C für 3 min erwärmt. Die Zellsuspension wurde aus dem Kryoröhrchen in 2 ml vorgewärmtes DMEM-VM überführt und wiederholt resuspendiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 200 x g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 2 ml frischem Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in die vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Ab dem Folgetag wurden 100 µg/ml Hygromycin B und 10 µg/ml Blasticidin zum DMEM-VM hinzugefügt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

4.2.3 Splitten und Einsaat der Zellen

Einmal pro Woche wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:12 aufgeteilt. Nach einem Waschschrift mit Dulbecco's phosphate-buffered saline ohne Magnesium und Calcium (DPBS (-)) wurden die Zellen für 3 min mit 1 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe des fünffachen Volumens an Medium wurde die Wirkung des Trypsins aufgehoben. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und das gewünschte Volumen in die Zellkulturflasche zurückgegeben. Bei Einsaat einer exakten Zellzahl wurden zunächst 10 µl der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl bestimmt. Somit konnte das gewünschte Volumen an Zellsuspension errechnet werden.

4.2.4 Stabile Transfektion zur Generierung der Reporter-Zelllinien

Zur stabilen Transfektion der Zellen mit den Plasmiden zum Tagging der Zielgene wurde Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) angewandt. Die Zellen wurden wie unter 4.2.3 beschrieben abgelöst und 1,2 x 10⁶ Zellen in ein Well einer 6-Well-Platte eingesät. Als Medium wurde DMEM-VM ohne Zugabe von Antibiotika eingesetzt. Bei einer Konfluenz von 70 % bis 90 % wurden die HEK-AWL-AWN-Zellen transfiziert. Pro zu transfizierendem Well wurden 11 µl

Lipofectamine in 150 µl Opti-MEM™ (Thermo Fisher Scientific) aufgenommen. Ein zweiter Ansatz enthielt 140 µl Opti-MEM™ und je 3000 ng des Guide- und des Taggingplasmids pro ein Well. Beide Ansätze wurden zusammengegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Das Vollmedium wurde von den Zellen entfernt und durch je 2,7 ml DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum ersetzt. Anschließend wurden je 280 µl des Transfektionsansatzes in ein Well gegeben. Nach drei Tagen Inkubation begann die Selektion durch DMEM-VM mit 100 µg/ml Hygromycin B, 10 µg/ml Blastocidin und 3 µg/ml Puromycin. Bei erfolgreicher Modifikation der Zellen besitzen diese eine Resistenz gegen Puromycin, über die die HEK-AWL-AWN-Zellen nicht verfügen. Somit überleben nur die modifizierten Zellen.

4.2.5 Isolierung genomischer DNA

Die Überprüfung der Modifikation erfolgte durch Nachweis des jeweiligen Fluorophorgens und dessen korrekte Insertion im Genom der Zellen via PCR. Hierfür wurde als Vorlage die gDNA der modifizierten Zellen mit dem NucleoSpin Tissue Kit (MACHERY-NAGEL) isoliert. Die PCR und anschließende Sequenzierung der Produkte erfolgte wie unter 4.1.5 und 4.1.11 beschrieben. Als Negativkontrollen wurden destilliertes Wasser (A. dest) und die gDNA der nicht-editierten HEK-AWL-AWN-Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis von mCherry bzw. mNeonGreen diente das jeweilige Plasmid.

4.2.6 Lagerung der Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in Flüssigstickstoff gelagert. Die Zellen wurden wie unter 4.2.3 beschrieben abgelöst und die Suspension für 3 min bei 200 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in Kryomedium aufgenommen. In jedes Kryoröhrchen wurden 1 ml der Suspension überführt. Die Röhrchen wurden in mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter platziert und über Nacht bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in Stickstofftanks überführt.

4.2.7 Stimulation der Genexpression von NPHS2 und UMOD

Die Stimulation der Genexpression der Zielgene NPHS2 und UMOD in den generierten Reporter-Zelllinien erfolgte unter Verwendung des in der Grundzelllinie bereits stabil integrierten CRISPR/Cas9 SAM-Komplexes. Wie in Abb. 7 aufgezeigt, enthält der CRISPR/Cas9 SAM Komplex die Endonuklease Cas9, deren katalytische Domänen inaktiviert wurden (Konermann et al. 2015). Somit erfolgt im Gegensatz

zum klassischen CRISPR/Cas9 System kein Doppelstrangbruch (Mrowka et al. 2018). An dieser wurden der Transaktivator VP64 sowie die nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)-Untereinheit p65 und die Aktivierungsdomäne des humanen Hitzeschock-Transkriptionsfaktor (HSF) 1 über MS2-Fusion angefügt (Konermann et al. 2015).

Das klassische CRISPR/Cas9 System

Der CRISPR/Cas9 SAM Komplex

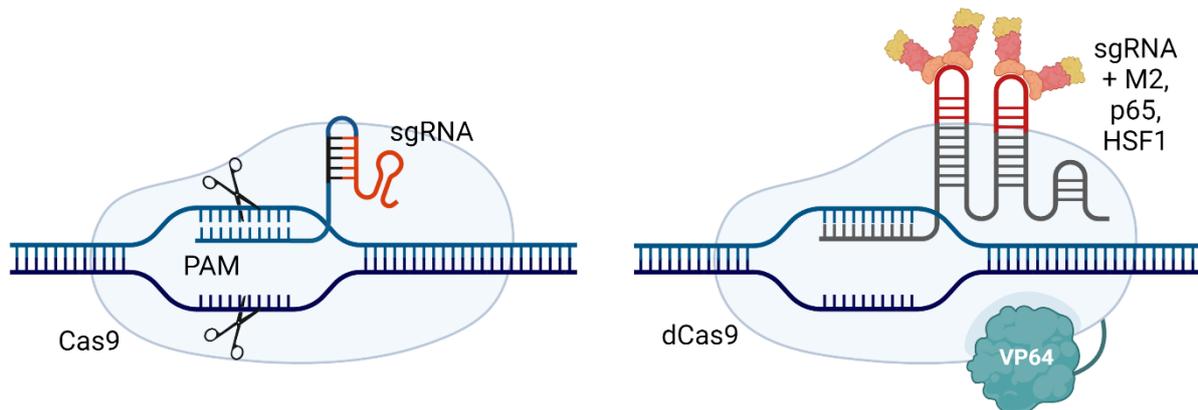


Abb. 7: Gegenüberstellung des klassischen CRISPR/Cas9 Systems und des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes zur gezielten Stimulation ausgewählter Gene
Die klassische Cas9 (links abgebildet) bindet, geleitet von der sgRNA, an die Protospacer adjacent Motif (PAM)-Sequenz und erzeugt einen Doppelstrangbruch. Der CRISPR/Cas9 SAM Komplex (rechts abgebildet) besteht aus einer katalytisch inaktiven Cas9 (dCas9), dem Transaktivator VP64 und, angefügt durch MS2-Fusion, der NF- κ B-Untereinheit p65 sowie der Aktivierungsdomäne des HSF 1. Mithilfe spezifischer sgRNAs kann dieser Komplex an den Promotor des Zielgens binden und die Expression stimulieren. Modifiziert nach Mrowka, Kirchner et al. 2018.

Die modifizierten Zellen wurden transient mit Guide-kodierenden Plasmiden, die Promotor-spezifische sgRNAs enthielten, wie unter 4.2.4 beschrieben transfiziert. Mithilfe dieser sgRNAs bindet der CRISPR/Cas9 SAM Komplex an die Promoter-Region des Zielgens und stimuliert dessen Expression (Mrowka et al. 2018). Bei der transienten Transfektion unterbleibt der Einsatz eines Selektionsmediums. Es kommt zu keiner langfristigen Integration der Information in das Genom. Wurde eine abschließende Auswertung via qPCR angestrebt, so wurden die Zellen in 12-Well-Platten eingesät.

4.2.8 Fluoreszenzanalyse am Konfokalmikroskop

Für die Analyse der Fluoreszenzsignale am Laser Scanning Mikroskop (LSM) 980 (Carl Zeiss Microscopy) wurden Mikrotiterplatten mit Glasboden (Greiner Bio-One) verwendet. Je ein Well Zellen blieb als Negativkontrolle unverändert, um die Auto- und Hintergrundfluoreszenz zu definieren. HEK-AWL-AWN-Zellen wurden wie unter

4.2.3 beschrieben eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Fluorophore mCherry, mNeonGreen und für das in den Guideplasmiden enthaltene Fluorophor tdTomato wurden HEK-AWL-AWN-Zellen mit Plasmiden, die das jeweilige Fluorophor kodieren, wie unter 4.2.4 und 4.2.7 beschrieben transient transfiziert. Zwei bis drei Tage nach Transfektion wurden die Proben mithilfe des LSM 980 spektral untersucht. Hierfür wurde das Medium als potenzielle Störquelle entfernt und DPBS mit Magnesium und Calcium (DPBS (+)) kurz vor Analyse auf die Zellen gegeben. Die Auto- und Hintergrundfluoreszenz der Negativkontrolle wurden definiert. Um mit maximaler Sicherheit zwischen mCherry- und tdTomato-exprimierenden Zellen differenzieren zu können, wurden zwei unterschiedliche Wellenlängen zur Anregung gewählt. Mit einem 594 nm-Laser kann mCherry nahezu optimal angeregt werden, während tdTomatos Exzitationsbereich kaum erfasst wird (Lambert 2019, Shaner et al. 2004). Unter Nutzung des 594 nm-Lasers ist das angeregte tdTomato-Signal demnach zu vernachlässigen und lediglich mCherry-positive Zellen werden dargestellt. Umgekehrt lässt sich mCherry durch Wahl eines 514 nm-Lasers deutlich schlechter anregen als tdTomato (Shaner et al. 2004, Lambert 2019). Die Aufnahmen wurden unter Verwendung des Smart Setup der ZEN Software (Carl Zeiss Microscopy) erstellt. Minimale Korrekturen zur Vermeidung exzessiver Autofluoreszenz wurden vorgenommen.

4.3 qPCR-Analyse

4.3.1 Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--------------------------|
| Luminaris HiGreen Mastermix für qPCR, hoher ROX | Thermo Fisher Scientific |
| Life Science Verschlussfolien für qPCR | BRAND GMBH + CO KG |
| PCR-Platte 96-well (low Profile, transparent, ohne Rahmen) | BRAND GMBH + CO KG |
| Kits | |
| Nucleo Spin RNA | MACHERY-NAGEL |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit | Thermo Fisher Scientific |
| Online Tools | |
| NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) | National Center for |

Primer-BLAST
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Biotechnology Information
National Center for
Biotechnology Information

Software und Geräte

StepOne™ Software v2.3

Thermo Fisher Scientific

StepOne™ Real-Time PCR System

Thermo Fisher Scientific

Microsoft Excel

Microsoft Corporation

4.3.2 Isolation der RNA

Die RNA wurde mithilfe des Kits NucleoSpin RNA (MACHERY-NAGEL) frühestens zwei Tage nach transienter Transfektion der Zellen isoliert.

4.3.3 Synthese der komplementären DNA

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde mithilfe des High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert und bei - 20 °C gelagert.

4.3.4 Durchführung der qPCR

Die qPCR-Primer wurden mithilfe der Datenbanken von dem National Center for Biotechnology Information sowie mithilfe des Online Tools „Primer-BLAST“ generiert und bei Eurofins Genomics in Auftrag gegeben (Anhang, Tab. 13). Als Referenzprobe diente die cDNA der unmodifizierten Grundzelllinie. Für die qPCR-Analysen wurde der Luminaris HiGreen Mastermix für qPCR (Thermo Fisher Scientific) nach Protokoll des Herstellers verwendet. Die cDNA wurde 1:10 mit zweifach destilliertem Wasser verdünnt. Für die endogenen Referenzgene EMC7 und TBP und die zu untersuchenden Gene wurde je ein Primermix bestehend aus 10 µl 100 mM forward-Primer, 10 µl 100 mM reverse-Primer und 180 µl zweifach destilliertem Wasser erstellt. Jede Probe wurde als technisches Triplikat auf eine 96-Well PCR-Platte aufgetragen. Eine Probe enthielt 5 µl Luminaris Mastermix, 1 µl Primermix und 4 µl cDNA. Es wurde ein dreistufiges qPCR-Protokoll angewandt (Tab. 7). Die gewonnenen Daten wurden als Originaldatei auf der Gerätesoftware sowie als Excel-Datei gespeichert. Abweichungen bei der Durchführung der Analyse der Genexpressionsänderung in den renalen Organoiden werden unter 4.5.3 aufgezeigt.

Tab. 7: Protokoll der qPCR

| Schritt | Temperatur | Dauer | Zyklen |
|--------------------------------------|------------|--------|--------|
| Uracil-DNA-Glycosidase Vorbehandlung | 50 °C | 2 min | 1 |
| Initiale Denaturierung | 95 °C | 10 min | 1 |
| Denaturierung | 95 °C | 15 s | 40 |
| Hybridisierung | 60 °C | 30 s | 40 |
| Elongation | 72 °C | 30 s | 40 |

4.3.5 Auswertung der qPCR

Die Auswertung der qPCR-Analysen erfolgte durch relative Quantifizierung der Genexpression nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ – Methode anhand des Handbuchs „Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR“ (Applied Biosystems 2008). Die Daten wurden als x-fache Änderung der Genexpression im Vergleich zu einer Kontrollprobe dargestellt (Livak und Schmittgen 2001). Für die Ermittlung der Mini- und Maximalwerte der Änderung der Genexpression in den mit den Reporterkonstrukten modifizierten Zelllinien wurden die Standardabweichungen der biologischen Replikate verwendet. Die Auswertung der Änderung der Genexpression in den renalen Organoiden erfolgte anhand der technischen Triplikate der singulären biologischen Probe. Zur Normalisierung dienten endogene Referenzgene (Livak und Schmittgen 2001). Ein von der StepOne™ Software als „unbestimmt“ angegebener Schwellenwert-Zyklus wurde bei der Auswertung mit dem Wert 40 gleichgesetzt.

4.4 Kultivierung der humanen iPSC

4.4.1 Material

| Bezeichnung | Firma |
|---|--------------------------|
| Essential 8™ Medium | Thermo Fisher Scientific |
| Geltrex™ LDEV-freie, hESC-qualifizierte Basalmembran-Matrix mit reduziertem Wachstumsfaktor | Thermo Fisher Scientific |
| KnockOut™ DMEM | Thermo Fisher Scientific |
| DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate | Thermo Fisher Scientific |
| Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 | Wako Chemicals |

| | |
|---|--------------------------|
| UltraPure™ 0.5M EDTA | Thermo Fisher Scientific |
| DPBS, no calcium, no magnesium (DPBS (-)) | Thermo Fisher Scientific |
| DPBS, calcium, magnesium (DPBS (+)) | Thermo Fisher Scientific |
| BamBanker™ | NIPPON Genetics Europe |
| Cellartis DEF-CS 500 Culture System Kit | Takara |
| Trypsin-EDTA | Thermo Fisher Scientific |

Software und Geräte

| | |
|--|--------------------------|
| Galaxy™ 170 S CO2-Inkubator | Eppendorf AG |
| Heraeus® HERAsafe® Sicherheitswerkbank | Thermo Fisher Scientific |
| Axiovert 25 (inverses Mikroskop) | Carl Zeiss Microscopy |
| Axio Vert.A1 Mikroskop | Carl Zeiss Microscopy |
| Axiocam ERc 5s | Carl Zeiss Microscopy |
| MyBath 4L Digital Water Bath | Benchmark Scientific |
| Mega Star 600 Zentrifuge | VWR International |

Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien, die BCRT5-Zellen und die IMR90 Talen NF-κB-grün fluoreszierendes Protein (GFP)-Zellen, verwendet.

Die BCRT5-Zellen sind hiPSC, welche von ihrem Namensgeber, dem Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien (BCRT) der Charité, generiert wurden. Die BCRT5-Zellen wurden in Essential 8™ (E8) Medium (Thermo Fisher Scientific) kultiviert.

Die IMR90 Talen NF-κB-GFP-Zellen sind vom BCRT modifizierte hiPSC, in denen NF-κB via Elongationsfaktor 1α-Promotor mit GFP verknüpft wurde. In allen übrigen Abschnitten wurden die IMR90 Talen NF-κB-GFP-Zellen der Verständlichkeit halber zu IMR90-Zellen abgekürzt. Die IMR90-Zellen wurden im Cellartis DEF-CS System (Takara) kultiviert.

Votum der Ethik-Kommission

Ein Ethikvotum zur Reprogrammierung humaner Zellen in pluripotente Stammzellen, Transfektion und Differenzierung dieser Zellen wurde im Vorfeld bei der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Jena eingeholt. Die Auflagen der Ethik-Kommission wurden erfüllt. Die Registrierungsnummer lautet 2019-1277_1-Material.

4.4.2 Auftauen der iPSC

Vorbereitend wurden 6 ml Medium bei RT erwärmt. Zum DEF-CS Medium wurden Wachstumsfaktor-1 in einer Verdünnung von 1:333 und Wachstumsfaktor-2 und -3 in einer Verdünnung von je 1:1000 gegeben. Das E8 Medium der BCRT5-Zellen wurde vor erstem Gebrauch bei RT aufgetaut und das im Kit enthaltene Supplement hinzugefügt.

Ein Well einer 6-Well-Platte wurde mit der Beschichtung behandelt. Für die IMR90-Zellen im DEF-CS System wurde die im Kit enthaltene Beschichtung 1:20 mit DPBS (+) verdünnt und 1,5 ml dieser Verdünnung auf ein Well gegeben. Für die BCRT5-Zellen im E8 System wurde Geltrex (15 mg/ml) 1:10 mit KnockOut™ DMEM verdünnt und 1 ml dieser Verdünnung in ein Well gegeben. Die Well-Platte wurde für 30 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 21 % O₂ inkubiert. Vor dem Einsäen der Zellen wurde der Überstand wieder entfernt.

Ein Kryoröhrchen iPSC wurde für 3 min im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Die Zellsuspension wurde in 4 ml Medium aufgenommen und für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in den 2 ml Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in das vorbereitete Well überführt.

4.4.3 Erhalt der iPSC in Kultur

Das Medium wurde täglich gewechselt. Zum DEF-CS Medium wurden Wachstumsfaktor-1 und -2 wie unter 4.4.2 beschrieben hinzugegeben. Waren differenzierte Stammzellen vorhanden, wurden diese manuell durch Ablösen der Zellen mittels einer Pipettenspitze entfernt. Anschließend erfolgte ein weiterer Mediumwechsel (MW), um ein erneutes Adhärenzen zu verhindern.

4.4.4 Passagieren und Splitten der iPSC

Ab einer Konfluenz von 70 % bis 90 % wurden die iPSC aufgeteilt. Für die BCRT5-Zellen im E8 System wurden 50 µl 0,5 M EDTA-Lösung mit 50 ml DPBS (-) verdünnt. Nach Entfernung des Mediums wurden 1 ml EDTA-Verdünnung auf die BCRT5-Zellen gegeben und die Well-Platte für 3 min bei 37 °C inkubiert. Die EDTA-Verdünnung wurde entfernt und 3 ml Medium hinzugegeben. Für die IMR90-Zellen im DEF-CS System wurden 500 µl Trypsin, wie unter 4.2.3 beschrieben, angewandt. Die iPSC wurden anschließend vorsichtig abgelöst und in vorbereitete Wells überführt (siehe 4.4.2). Etwa alle vier Tage wurden die iPSC unabhängig von der

Konfluenz auf eine frische Beschichtung passagiert. Nach Splitten oder Passagieren der IMR90-Zellen im DEF-CS System wurden alle drei Wachstumsfaktoren, wie unter 4.4.2 beschrieben, hinzugegeben.

4.4.5 Einfrieren der iPSC

Ab einer Konfluenz von etwa 70 % konnten die iPSC eingefroren werden. Das Medium wurde entfernt und die iPSC wie unter 4.4.4 beschrieben abgelöst. Je ein Well BCRT5-Zellen im E8 System wurde in 1 ml auf RT erwärmtes Bambanker™ Einfriermedium aufgenommen. Die IMR90-Zellen wurden in 1 ml DEF-CS Medium unter Zugabe aller drei Wachstumsfaktoren überführt (siehe 4.4.2). Die Suspension der iPSC wurde in ein Kryoröhrchen gegeben und über Nacht in einen Gefrierbehälter bei - 80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in die Stickstofftanks überführt.

4.5 Differenzierung der iPSC in humane renale Organoid

4.5.1 Material

| Bezeichnung | Firma |
|---|--------------------------|
| Essential 8™ Medium | Thermo Fisher Scientific |
| Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 | Wako Chemicals |
| Albumin Fraktion V | Carl Roth |
| Cellartis DEF-CS 500 Culture System Kit | Takara |
| STEMdiff™ APEL™2 Medium | Stemcell Technologies |
| CHIR99021 | Merck KGaA |
| PFHM-II Protein-Free Hybridoma Medium (liquid) | Thermo Fisher Scientific |
| DMEM, high glucose, GlutaMAX™ Supplement, pyruvate | Thermo Fisher Scientific |
| KnockOut™ Serum Replacement | Thermo Fisher Scientific |
| MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X) | Thermo Fisher Scientific |
| Penicillin-Streptomycin | Merck KGaA |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Thermo Fisher Scientific |
| Poly (vinyl alcohol) | Sigma-Aldrich |
| Insulin-Transferrin-Selen-Ethanolamin (100x) | Thermo Fisher Scientific |
| Dispase (1 U/ml) | Stemcell Technologies |
| Corning® Costar® Ultra-Low Attachment Multiple | Sigma-Aldrich |

Well Plate

AggreWell™ 800 24-well Plate

Anti-Adherence Rinsing Solution

KnockOut™ DMEM/F-12

Neubauer-Zählkammer

Stemcell Technologies

Stemcell Technologies

Thermo Fisher Scientific

Marienfeld Superior

Software und Geräte

Midi 40 CO2-Inkubator

Thermomixer (Thermoschüttler)

Galaxy™ 170 S CO2-Inkubator

Heraeus® HERAsafe® Sicherheitswerkbank

Axiovert 25 (inverses Mikroskop)

Axio Vert.A1 Mikroskop

Axiocam ERc 5s

MyBath 4L Digital Water Bath

Mega Star 600 Zentrifuge

Thermo Fisher Scientific

Thermo Fisher Scientific

Eppendorf AG

Thermo Fisher Scientific

Carl Zeiss Microscopy

Carl Zeiss Microscopy

Carl Zeiss Microscopy

Benchmark Scientific

VWR International

4.5.2 Generieren der Organoide

Zur Generierung der renalen Organoide aus den hiPSC wurde das von Przepiorski *et al.* (2018) publizierte Protokoll angewandt. Geringe Modifikationen u. a. hinsichtlich einer höheren Konfluenz der iPSC zu Protokollbeginn und der Formation der EBs wurden im Austausch mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Kurtz am BCRT der Charité implementiert.

Für die Organoid-Ansätze wurden für die Formation der EBs sowohl AggreWell™ Platten als auch das Prinzip der Selbstaggregation angewandt. Unter EBs versteht man dreidimensionale Stammzellaggregate, die durch Selbstorganisation Teratom-ähnliche Gewebe *in vitro* bilden (Lancaster und Knoblich 2014). Sie dienen als Vorstufe für die Organoiddifferenzierung. In diesem Abschnitt werden beide Varianten des Protokolls beschrieben. Eine schematische Übersicht über das Protokoll ist in Abb. 8 gezeigt. Alle Medien wurden vor Anwendung auf RT erwärmt.

Tag - 1 (AggreWell™-Formation der EBs)

Die Wells der AggreWell™ 24-Well-Platte wurden mit 500 µl Anti-Adherence Rinsing Solution gefüllt und bei 1300 x g für 5 min zentrifugiert. Waren anschließend noch

Lufteneinschlüsse unter dem Mikroskop sichtbar, so wurde die Zentrifugation wiederholt. Die Anti-Adherence Rinsing Solution wurde entfernt und die Wells mit je 2 ml KnockOut™ DMEM/F-12 gespült. Je nach verwendeten iPSC wurden 2,5 ml E8 Medium mit 6 µl 5 mM Rho-Kinase (ROCK) Inhibitor oder 2,5 ml DEF-CS Medium mit Wachstumsfaktor-1, -2 und -3 vorbereitet. Ein Well iPSC wurden wie unter 4.4.4 beschrieben abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen mit 2 ml des vorbereiteten E8 bzw. DEF-CS Mediums überführt. Die Zellen wurden für 2 min bei 300 x g zentrifugiert, resuspendiert und mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Das Volumen für $1,5 \times 10^6$ iPSC wurde bestimmt und in ein Well der AggreWell™ Well-Platte gegeben. Durch vorsichtiges Pipettieren wurden die iPSC ebenmäßig auf das Well verteilt. Das vorhandene Medium im Well wurde auf insgesamt 2 ml aufgefüllt.

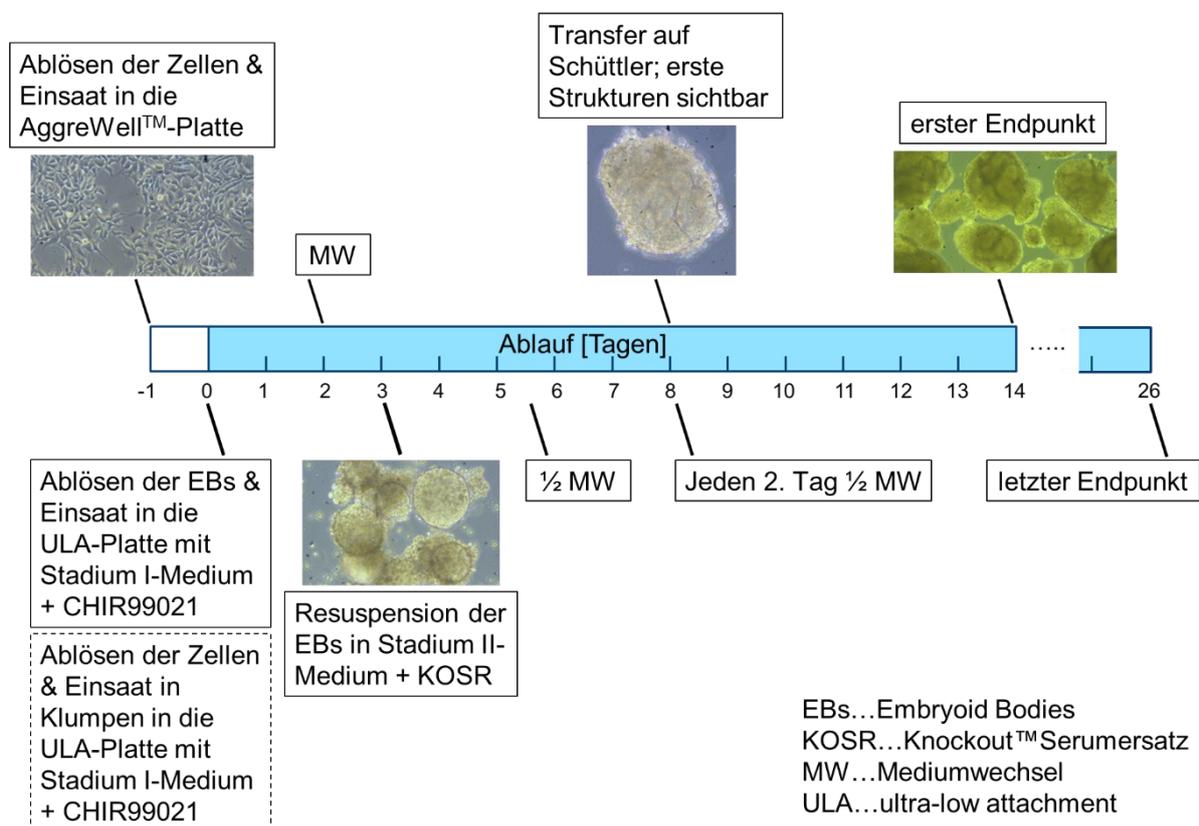


Abb. 8: Schema für die Differenzierung renaler Organoide aus hiPSC basierend auf Przepiorski et al. (2018)

Die gestrichelte Umrahmung zeigt die alternative Formation der EBs durch Selbstaggregation im Gegensatz zur Formation durch Verwendung von AggreWell™-Platten.

Tag 0 (AggreWell™-Formation der EBs)

Die Komponenten für das Stadium I-Medium wurden in ein Zentrifugenröhrchen gegeben (Tab. 8). Die EBs wurden durch wiederholtes Pipettieren aus dem Well der AggreWell™-Platte gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die EBs in dem Stadium I-

Medium resuspendiert. EBs aus einem Well der AggreWell™-Platte wurden auf drei Wells der 6-Well-Ultra Low Attachment (ULA)-Platte verteilt. Pro Well der ULA-Platte wurden etwa 2 ml Stadium I-Medium verwendet.

Tag 0 (EB-Formation durch Selbstaggregation)

Das Stadium I-Medium wurde hergestellt (Tab. 8). Die BCRT5-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70 %, die IMR90-Zellen bis zu einer Konfluenz von 100 % in einer 6-Well-Platte kultiviert. Die Zellen wurden zweimalig mit 1 ml DPBS (-) gewaschen und für 6 min mit 2 ml Dispase (1 mg/ml) bei 37 °C inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit DPBS (-). Anschließend wurde Stadium I-Medium in das Well gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig gelöst. Die Zellsuspension wurde sanft resuspendiert, um eine zu starke Zerkleinerung der Zellklumpen zu vermeiden, und auf die 6-Well-ULA-Platte überführt. Ein Well BCRT5-Zellen wurden in ein Well der ULA-Platte und ein Well IMR90-Zellen in drei Wells der ULA-Platte eingesät. Pro Well wurden etwa 2 ml Stadium I-Medium verwendet.

Tab. 8: Zusammensetzung des Mediums für Tag 0 bis 3 des Protokolls (Stadium I-Medium)

| Komponente | Volumen pro 3 Well |
|---|---------------------------|
| APEL™2 Medium | 9,5 ml |
| CHIR99021 (10 mM) | 10 µl |
| Proteinfreies Hybridoma-Medium II | 500 µl |
| Insulin-Transferrin-Selen-Ethanolamin | 10 µl |
| ROCK Inhibitor (1.000x) (bei Selbstaggregation) | 10 µl |

Tag 2

An Tag 2 erfolgte ein halber MW mit Stadium I-Medium.

Tag 3

Die Komponenten für das Stadium II-Medium wurden in ein 50 ml-Röhrchen pipettiert (Tab. 9). Die EBs wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g zentrifugiert. Nach Resuspension in Stadium II-Medium wurden die EBs wieder in die ULA-Platte eingesät. Pro Well der ULA-Platte wurden etwa 2 ml Stadium II-Medium eingesetzt.

Tag 5

An Tag 5 wurde ein halber MW mit Stadium II-Medium durchgeführt.

Tag 8

Ab Tag 8 waren lichtmikroskopisch erste Strukturen erkennbar, sodass man von diesem Zeitpunkt von Organoiden spricht. Ein kompletter MW mit Stadium II-Medium wurde durchgeführt. Die Organoide wurden hierfür in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Organoide in frischem Medium aufgenommen. Die ULA-Platte wurde auf einen Thermomixer platziert und für den weiteren Verlauf des Protokolls bei 90 rpm geschüttelt.

Tab. 9: Zusammensetzung des Stadium II-Mediums

| Komponente | Volumen pro 3 Well |
|---|---------------------------|
| DMEM GlutaMAX™ | 20 ml |
| KnockOut™ Serumersatz | 3,75 ml |
| Nicht essenzielle Aminosäuren | 250 µl |
| Penicillin-Streptomycin | 250 µl |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (1 M) | 250 µl |
| Polyvinylalkohol (5 %) | 250 µl |

Tag 10 und folgend

Nach Tag 8 wurde alle zwei Tage ein halber MW durchgeführt. Für eine Kultivierung über 14 Tage hinaus mussten entsprechend größere Mengen an Stadium II-Medium angesetzt werden.

4.5.3 Entnahme der Organoide und qPCR-Analyse

Die Entnahme der Organoide aus der Kultur erfolgte unter lichtmikroskopischer Kontrolle. Um mechanische Schäden zu vermeiden, wurden die Enden von 100 µl-Pipettenspitzen aufgeweitet. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde mit DPBS (-) zu einer einprozentigen Lösung verdünnt. Die Pipettenspitzen und die Reaktionsgefäße wurden mit der BSA-Lösung beschichtet. Organoide und Medium wurden mithilfe der manipulierten Spitzen in die beschichteten Reaktionsgefäße überführt. Die qPCR-Analyse erfolgte wie unter 4.3 beschrieben. Um ausreichend cDNA zu erhalten, wurde ein Ansatz mit durchschnittlich 20 Organoiden zu einer biologischen Probe zusammengefasst und untersucht. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kurtz vom BCRT der Charité wurden 12 Gene ausgewählt, die als Marker der

einzelnen Nephronabschnitte dienen, sowie wie der Pluripotenz-Marker OCT4 (Abb. 9) (Shirzadeh et al. 2018).

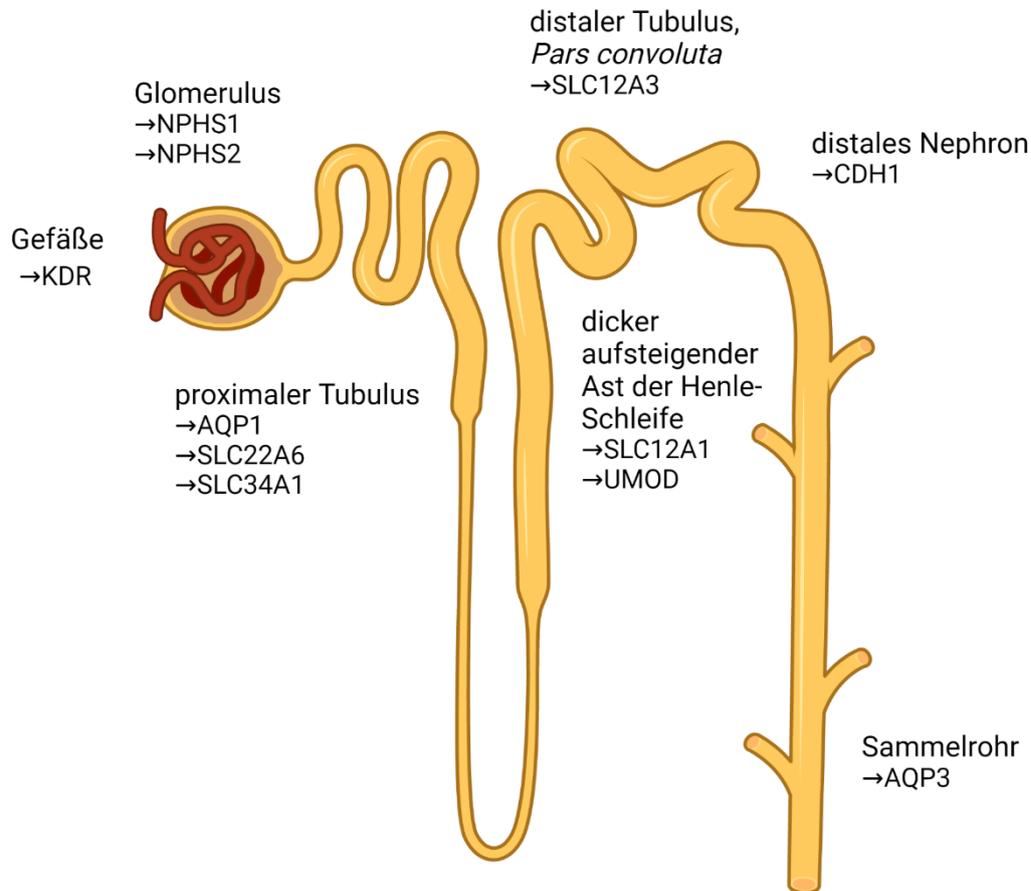


Abb. 9: Schematische Übersicht der in der qPCR untersuchten Marker-Gene der Niere

Als Marker für das Gefäßendothel wurde KDR festgelegt, welches für einen Rezeptor der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) kodiert (Blazquez et al. 2006). NPHS1 und NPHS2, die für die Proteine Nephrin bzw. Podozin kodieren, dienten als Podozyten-spezifische Marker (Zhuo et al. 2019, Boute et al. 2000). Die Gene AQP1, SLC22A6 und SLC34A1 repräsentieren den proximalen Tubulus. AQP1 ist das Gen des Transmembranproteins Aquaporin 1, während SLC22A6 für einen organischen Anionentransporter und SLC34A1 für einen Typ II Natrium-Phosphat-Cotransporter kodieren (Hara-Chikuma und Verkman 2006, Torres et al. 2011, Forster et al. 2006). Die Genprodukte von SLC12A1 und UMOD, ein Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter bzw. das Protein Uromodulin, werden im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert (Sasaki et al. 2016, Scolari et al. 2015). Das Gen SLC12A3, welches für einen Natrium-Chlorid-Cotransporter kodiert, diente als Marker-Gen für das distale Konvolut (Moes et al. 2014). CDH1 kodiert für das Protein E-Cadherin (Semb und Christofori 1998). Damit eignet es sich als Marker-Gen für

das distale Nephron (Prozialeck et al. 2004). Aquaporin 3, ein Protein, das durch das Gen AQP3 kodiert wird, wurde als Marker-Gen für das Sammelrohr gewählt (Parreira et al. 2009). Die qPCR-Primer der Marker-Gene wurden teilweise wie unter 4.3.4 beschrieben generiert, teilweise wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kurtz vorgeschlagene Oligonukleotidsequenzen verwendet (Anhang, Tab. 13). Als Referenzprobe diente die jeweilige undifferenzierte iPSC-Linie.

4.6 Histologische Untersuchung der Organoide

4.6.1 Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|--------------------------|
| Albumin Fraktion V | Carl Roth |
| DPBS, no calcium, no magnesium (DPBS (-)) | Thermo Fisher Scientific |
| DPBS, calcium, magnesium (DPBS (+)) | Thermo Fisher Scientific |
| ROTI®Histofix 4 % | Carl Roth |
| UltraPure Agarose | Thermo Fisher Scientific |
| Methylenblau | Waldeck |
| Skalpelle, Präzisa, Einweg | Dahlhausen |
| Biopsiekapseln CellSafe® | Biosystems Switzerland |
| 96%iger vergällter Alkohol | Nordbrand Nordhausen |
| 70%iger vergällter Alkohol | Carl Roth |
| 2-Propanol (Isopropanol) | Carl Roth |
| Xylol | Carl Roth |
| Paraffin 52 °C bis 54 °C (reinst) | Carl Roth |
| Einbettformen aus Metall, 23 x 36 mm | Carl Roth |
| SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger | Thermo Fisher Scientific |
| Methanol | Carl Roth |
| Wasserstoffperoxid (30 %) | Carl Roth |
| Natriumchlorid | Carl Roth |
| Salzsäure | Carl Roth |
| TRIS Hydrochlorid | Carl Roth |
| Tween® 20 | Carl Roth |
| Citronensäure | Carl Roth |
| Natriumhydroxidlösung | Carl Roth |
| DAKO Pen | Dako Denmark A/S |

| | |
|--|--------------------------|
| Ziegenserum | Sigma-Aldrich |
| Podocin Polyclonal Antibody (PA5-79757) | Thermo Fisher Scientific |
| Uromodulin Polyclonal Antibody (PA5-102518) | Thermo Fisher Scientific |
| Anti-Rabbit IgG (whole molecule) –Peroxidase (A0545) | Sigma-Aldrich |
| 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate | Fluka Chemie |
| Faltenfilter, Typ 600P | Carl Roth |
| Mayer's Hämalaun | Carl Roth |
| Eosin G | Carl Roth |
| Kaisers Glycerin-Gelatine | Carl Roth |
| Deckgläser Stärke 1, 18 x 18 mm | Carl Roth |

Software und Geräte

| | |
|---|--------------------------|
| ZEN 2.3 blue | Carl Zeiss Microscopy |
| Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge | Thermo Fisher Scientific |
| Heizrührer MR 3001 K | Heidolph Instruments |
| TES 99.250 Paraffineinbettssystem | Melite Medical |
| RM2155 Rotary Microtome | Leica Biosystems |
| pH-Messgerät FiveEasy F20 | Mettler Toledo |
| Axio Observer.Z1 | Carl Zeiss Microscopy |
| Axiocam 105 color | Carl Zeiss Microscopy |
| Niedrigraumabzüge CC-30 | Caspar & Co. Labora |

Probenmaterial

Als Probenmaterial dienten die Nieren zweier vier Monate alter männlicher Wildtyp-Mäuse der Linie C.129S6(Cg)-Ccl11tm1Mer/J mit Hintergrund 129S6/SvEvTac, welche durch Dr. Michael Reuter der Forschungsgruppe Morrison des Leibniz-Instituts für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut (FLI) in Jena bereitgestellt wurden (Anhang, Tab. 14). Des Weiteren wurden aus BCRT5-Zellen generierte renale Organoide ab Tag 14 bis max. Tag 25 der Kultur sowie aus IMR90-Zellen generierte renale Organoide ab Tag 14 bis max. Tag 26 der Kultur untersucht.

Die Methodik wurde auf Grundlage etablierter Protokolle unter Kooperation mit dem Institut der Anatomie II der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) Jena und unter Einbezug fachkundiger Literatur so angepasst, dass die maximal 500 µm großen

Organoide möglichst schonend verarbeitet werden konnten (Kumar et al. 2019, Clayton et al. 2018, Przepiorski et al. 2018).

4.6.2 Präparation der renalen Organoide

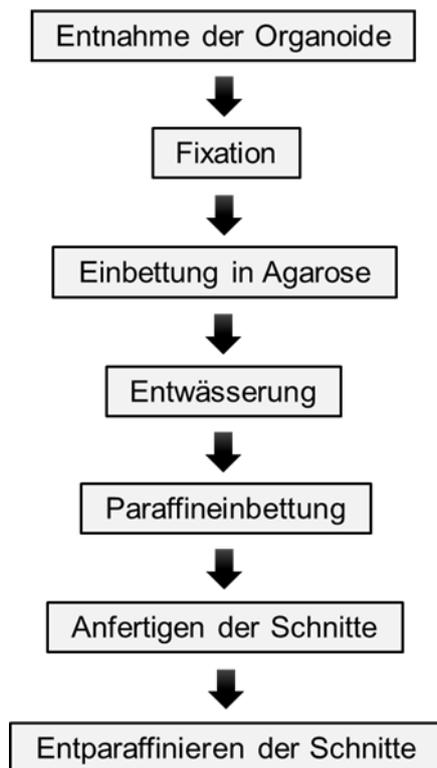


Abb. 10: Schematische Übersicht der Präparation der renalen Organoide

Die Organoide wurden wie unter 4.5.3 beschrieben aus der Kultur entnommen und histologisch präpariert. Eine Übersicht des Protokolls für die histologische Aufarbeitung ist in Abb. 10 dargestellt. Die Organoide wurden bei 300 x g für 1 min zentrifugiert und mit DPBS (+) gewaschen. Durch das Zentrifugieren entsteht ein Pellet, welches sich leichter handhaben lässt (Clayton et al. 2018). Die Zentrifugation wurde wiederholt. DPBS (+) wurde entfernt und 1 ml Histofix (Carl Roth, 4 % Formaldehyd, ready-to-use) zur Fixierung der Organoide in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach 1 h Fixationszeit wurde das Histofix entfernt und die Organoide erneut in DPBS (+) gewaschen. Es folgte die Zentrifugation. Auf das Organoidpellet wurde frisches DPBS (+) gegeben und das Röhrchen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Pellet vorsichtig mit einer zuvor erwärmten zweiprozentigen Agaroselösung mit Methylblau umhüllt. Dies diente der Stabilisation des Pellets sowie der vereinfachten Handhabung. Der Arbeitsschritt ist angelehnt an die Methodik von Clayton *et al.* (2018) und Przepiorski *et al.* (2018). Durch die artifizielle Vergrößerung des Präparates und das Anfärben der Organoide mit Methylblau konnten diese für den weiteren Ablauf des Protokolls besser dargestellt werden. Methylblau interferiert nicht mit anderen Färbungen und immunhistochemischen Untersuchungen.

Das von Agarose umhüllte Pellet wurde zum Erkalten für 1 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurde das Pellet longitudinal geteilt und die überschüssige Agarose entfernt. Die Hälften wurden in CellSafe® Biopsiekapseln (Biosystems Switzerland) platziert. Es folgte die manuelle Entwässerung der Organoide wie in Tab. 10 dargestellt. Die Gefäße mit Paraffin I-III befanden sich in einem eigens hierfür vorgesehen Inkubator.

Tab. 10: Ablauf der manuellen Entwässerung

| Lösung | Zeit |
|---------------------------------|------------|
| 70%iger Ethanol (vergällt) | 1 ½ h |
| 96%iger Ethanol (vergällt) (I) | 1 ½ h |
| 96%iger Ethanol (vergällt) (II) | 1 ½ h |
| Isopropanol (I) | 1 ½ h |
| Isopropanol (II) | über Nacht |
| Xylol (I) | 1 ½ h |
| Xylol (II) | 1 ½ h |
| Paraffin 52 °C bis 54 °C (I) | 2 h |
| Paraffin 52 °C bis 54 °C (II) | über Nacht |
| Paraffin 52 °C bis 54 °C (III) | 2 h |

Nachdem die Präparate aus dem Paraffin III entfernt wurden, erfolgte die Einbettung der Proben mit dem TES 99.250 Paraffineinbettssystem (Medite Medical). Die Hälften wurden in die mit Paraffin vorgefüllte Vertiefung der Einbettform platziert. Diese wurde kurzzeitig auf den Kühlkreis gestellt, bevor eine Einbettkassette auf die Form gesetzt und mit Paraffin bedeckt wurde. Nach Abkühlung des Paraffins wurde die Kassette mit dem die Organoide enthaltenden Paraffinblock aus der Einbettform entnommen. Anschließend wurden 4 µm dünne Schnitte am RM2155 Rotary Microtome (Leica Biosystems) erstellt und auf SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Das Entparaffinieren der Schnitte erfolgte nach dem in Tab. 11 gezeigtem Protokoll.

Tab. 11: Ablauf des Entparaffinierens

| Lösung | Zeit |
|---------------------------------|-------|
| Xylol (I) | 3 min |
| Xylol (II) | 3 min |
| 96%iger Ethanol (vergällt) (I) | 3 min |
| 96%iger Ethanol (vergällt) (II) | 3 min |
| 70%iger Ethanol (vergällt) | 3 min |
| 50%iger Ethanol (vergällt) | 3 min |
| A. dest | 3 min |

4.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung ist eine Routinefärbung, welche die Zellkerne blauviolett und das Zytoplasma rosa anfärbt (Welsch et al. 2014). Angelehnt an den etablierten Protokollen erfolgte die Färbung nach der individuellen Methode des Instituts der Anatomie II des Universitätsklinikums Jena (Tab. 12) (Mulisch und Welsch 2015). Anschließend wurden die Schnitte eingedeckt. Etwa ein Tropfen der Kaisers Glycerin-Gelatine wurde auf ein Präparat gegeben und ein Deckglas unter Ausschluss von Luftblasen darauf platziert.

Tab. 12: Protokoll für die HE-Färbung der Paraffinschnitte

| Lösung | Zeit |
|----------------------------------|---------|
| Mayser's Hämalaun | 20 min |
| warmes fließendes Leitungswasser | 10 min |
| 0,5 % Eosin G | 1 ½ min |
| A. dest | 5 s |
| 70%iger Ethanol | 15 s |
| 96%iger Ethanol (I) | 15 s |
| 96%iger Ethanol (II) | 2 min |
| Xylol (I) | 2 min |
| Xylol (II) | 2 min |

4.6.4 Immunfärbung der Organoide

Das Protokoll für die Immunfärbung (IF) der renalen Organoide wurde unter Einbezug von Modifikationen von Fr. Wirker aus der Anatomie II der FSU Jena und anhand der Datenblätter der Antikörper adjustiert. Für die Testdurchläufe und als Positivkontrollen wurden die Nieren zweier männlicher Wildtyp-Mäuse der Linie C.129S6(Cg)-Ccl11tm1Mer/J mit Hintergrund 129S6/SvEvTac verwendet. Eine Übersicht des Protokolls ist in Abb. 11 dargestellt. Die zuvor notwendige histologische Präparation der Organoide ist in 4.6.2 wiedergegeben. Die Mäusenieren wurden vorbereitend über Nacht in Histofix fixiert, longitudinal geteilt und anschließend für 1 h unter fließendem Leitungswasser gewässert. Es folgte die Entwässerung wie in Tab. 10 aufgezeigt, jedoch blieben die Nieren je mindestens 2 h in den Lösungen. Vor dem Überführen in das Paraffin wurden die Präparate in Einbettkassetten platziert. Paraffineinbettung, Anfertigung der Schnitte und Entparaffinieren erfolgten wie unter 4.6.2 beschrieben.

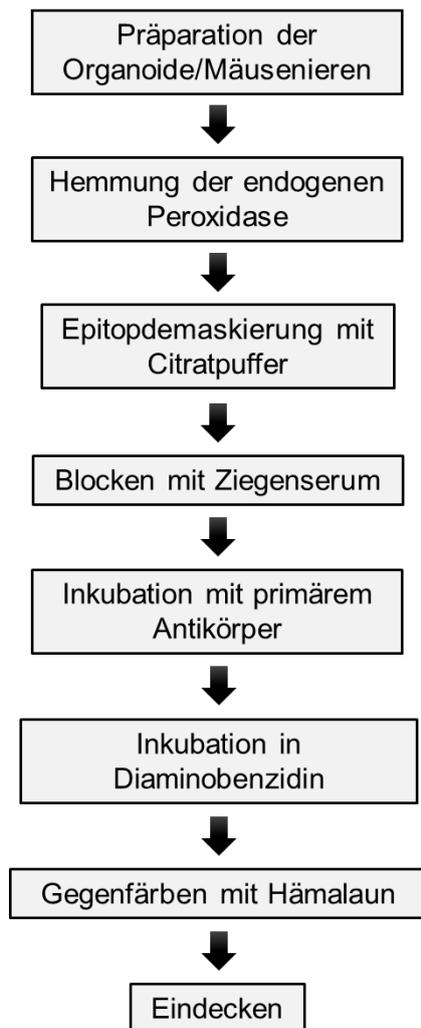


Abb. 11: Schematische Übersicht der Immunfärbung

Da der sekundäre Antikörper mit einer Peroxidase konjugiert war, wurde die endogene Peroxidase in den Präparaten gehemmt. Kurz vor Beginn des Protokolls wurden 750 µl 30%iges Wasserstoffperoxid in 50 ml Methanol gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für 25 min bei RT in der Lösung inkubiert. Die Präparate wurden dreimalig für je 5 min in frisch angesetztem Tris-buffered saline with Tween® (TBS-T) 20 - Puffer gespült. Für 1 l Puffer wurden 8,77 g Natriumchlorid (NaCl) und 0,93 g TRIS Hydrochlorid in 800 ml A. dest gelöst. Der pH-Wert wurde unter Verwendung 20%iger HCl auf pH=7,5 eingestellt. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers wurden 1 ml Tween® 20 (Carl Roth) hinzugegeben. Das Volumen wurde mit A. dest auf 1 l aufgefüllt.

Es folgte die hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Citratpuffer, welcher kurz vor Durchführung hergestellt wurde. Dafür wurden 2,1 g Citronensäure in 1 l A. dest gelöst. Der pH-Wert wurde unter Verwendung von HCl und NaOH auf pH=7,8 eingestellt. Die

Präparate wurden in den Puffer platziert, welcher zum Köcheln gebracht wurde. Bei Verwendung des Uromodulin-Antikörpers erzielte eine Dauer von 30 min die besten Resultate, bei dem Podozin-Antikörper eine Dauer von 40 min.

Anschließend wurden die Präparate dreimalig in TBS-T-Puffer gespült. Währenddessen wurden die Objektträger kurzzeitig aus dem Puffer entnommen und das Präparat mit einem DAKO Pen-Wachsstift (Dako Denmark) umrandet. Dies reduziert das später notwendige Volumen an Serum und Antikörper.

Um nicht-spezifische Bindungen des sekundären Antikörpers weiter zu verringern, wurden die Proteine mit Ziegenserum (Sigma-Aldrich) geblockt, da der sekundäre Antikörper aus dieser Spezies gewonnen wurde. Das Serum wurde 1:10 mit 12,5%igem BSA verdünnt. Ein Tropfen mit etwa 100 µl Serumverdünnung wurden pro Schnitt aufgetragen und für 20 min bei RT in einer Feuchten Kammer inkubiert.

Im nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern. Diese wurden mit 12,5%igem BSA verdünnt. Die optimale Verdünnung betrug 1:150 für den Uromodulin Polyclonal Antibody (1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific) und 1:500 für den Podocin Polyclonal Antibody (500 µg/ml, Thermo Fisher Scientific). Ein Tropfen mit etwa 100 µl der Antikörper-Verdünnung wurde auf die Präparate gegeben und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchten Kammer inkubiert. Mindestens ein Präparat wurde als Negativkontrolle ohne primären Antikörper mitgeführt. In den folgenden Schritten wurden die Negativkontrollen wie die übrigen Präparate behandelt.

Nach Inkubation wurden die Schnitte dreimalig in TBS-T-Puffer gespült. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit IgG, 4,0-11 mg/mL, Sigma-Aldrich) nach Empfehlung des Herstellers in einer Verdünnung von 1:200 aufgetragen und für 1 h bei RT in einer Feuchten Kammer inkubiert. Die Präparate wurden erneut dreimalig in TBS-T-Puffer gespült.

Es folgte die Inkubation in Diaminobenzidin (DAB)-Lösung. DAB ist ein Substrat der Peroxidase. Durch Inkubation für 10 min wird DAB an den Stellen, an denen der sekundäre Antikörper gebunden hat, umgesetzt und ein brauner Niederschlag entsteht. Bei hoher spezifischer Bindung des sekundären Antikörpers werden hierdurch indirekt die Bindungsorte des primären Antikörpers visualisiert. Die DAB-Lösung wurde frisch angesetzt. Es wurden 0,024 g DAB und 400 µl dreiprozentiger Wasserstoff in 40 ml DPBS (-) gelöst und mit Typ 600P Faltenfilter (Carl Roth) filtriert. Die Präparate wurden in A. dest gespült, für 2 min in Mayers Hämalaun gegengefärbt und für 10 min unter warmem Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Schnitte mit Kaisers Glycerin-Gelatine wie unter 4.6.3 beschrieben eingedeckt.

Die HE- und IF-Färbungen wurden mithilfe des Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy) ausgewertet. Aufnahmen wurden mit der AxioCam 105 color (Carl Zeiss Microscopy) und ZEN 2.3 blue (Carl Zeiss Microscopy) erstellt. Eine Negativkontrolle wurde zur Bewertung der unspezifischen Anfärbung des Präparathintergrundes und des Ausmaßes unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers mitgeführt.

4.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Organoide

4.7.1 Material

| Bezeichnung | Hersteller |
|--------------------------------------|--------------------------|
| DPBS, calcium, magnesium (DPBS (+)) | Thermo Fisher Scientific |
| Glutaraldehyd, 25 %-Lösung in Wasser | SERVA Electrophoresis |

| | |
|---|-----------------------|
| Paraformaldehyd | SERVA Electrophoresis |
| Cacodylsäure·Na-Salz·3H ₂ O | SERVA Electrophoresis |
| Osmiumtetroxid | Science Services |
| Ethanol, absolut, ≥ 99,8% | Sigma-Aldrich Chemie |
| Uranylacetat | Ted Pella |
| Epoxidharz-Kit (Araldit CY) | Plano GmbH |
| TEM Grids, Kupfer Netzchen mit hexagonalen Mesh | Plano GmbH |
| Bleicitrat | Plano GmbH |

Software und Geräte

| | |
|---|----------------------------|
| Leica Reichert Ultracut S | Leica Microsystems |
| EM 900 Transmissionselektronenmikroskop | Carl Zeiss Microscopy |
| 2k Slow Scan CCD Kamera | TRÖNDLE |
| | Restlichtverstärkersysteme |
| Image SP | SYSPROG |

4.7.2 Präparation und Untersuchung

Die Organoide wurden wie unter 4.5.3 beschrieben entnommen. Das Medium wurde entfernt und die Präparate mit 500 µl DPBS (+) gewaschen. Die Organoide wurden mit frischem modifizierten Karnovsky-Fixativ (4 % w/v Paraformaldehyd, 2,5 % v/v Glutaraldehyd in 0,1 M Natriumkakodylat-Puffer (pH=7,4)) für 24 h bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 15 min mit 0,1 M Natriumkakodylat-Puffer (pH=7,4) wurden die Proben bei RT für 1 h mit 2 % (w/v) Osmiumtetroxid nachfixiert. Anschließend wurden die Präparate erneut gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Während der Entwässerung wurden die Proben mit 1 % (w/v) Uranylacetat in 70%igem Alkohol nachgefärbt. Die Präparate wurden in Epoxidharz eingebettet. Ultradünnschnitte von 70 nm bis 90 nm Dicke wurden an einem Reichert Ultracut S Mikrotom (Leica Microsystems) angefertigt, auf mit Kunststoffilm überzogene Kupfernetze (Plano GmbH) aufgenommen und mit Bleicitrat nachgefärbt. Die Organoide wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV in einem EM 900 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Carl Zeiss Microscopy) bei 700- bis 20.000-facher Vergrößerung untersucht. Aufnahmen wurden mit der 2K Slow Scan CCD Kamera (TRÖNDLE Restlichtverstärkersysteme) in Kombination mit der Image SP Software (SYSPROG) erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Histologische Untersuchungen der renalen Organoiden

5.1.1 Übersichtsfärbung nach zwei Wochen Kultivierung

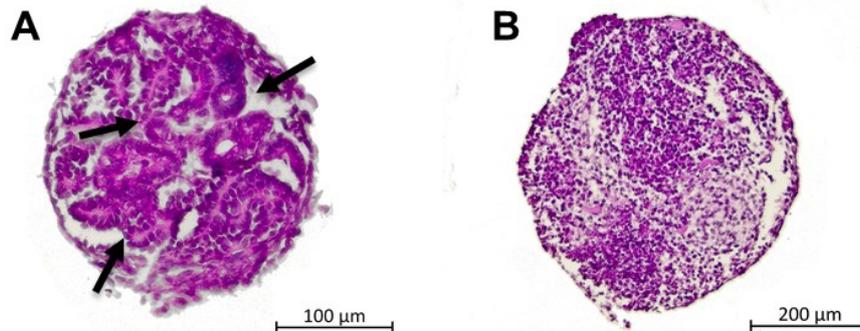


Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer renaler Organoiden im Querschnitt nach zwei Wochen Kultivierung

A: HE-Übersichtsfärbung eines aus IMR90-Zellen differenzierten Organoids. Die schwarzen Pfeile zeigen auf mehrere tubuläre Strukturen. B: HE-Übersichtsfärbung eines aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoids. Es sind deutliche Dichteunterschiede im Stroma erkennbar.

Um einen Überblick über den Stand der Differenzierung der humanen renalen Organoiden und dem Erfolg der Etablierung des von Przepiorski *et al.* (2018) publizierten Protokolls zu gewinnen, sollte die Organoidmorphologie auf mikroskopischer Ebene untersucht werden. Hierfür wurden die aus den BCRT5- und IMR90-Zellen differenzierten renalen Organoiden nach etwa zwei Wochen Kultur entnommen und histologisch präpariert. HE-Übersichtsfärbungen wurden angefertigt (Abb. 12). Die Organoiden besitzen eine rundliche Form und einen Durchmesser von 200 µm bis 500 µm. In Abb. 12 A sind tubuläre Strukturen mit z. T. ausgeprägtem Lumen erkennbar. Das Verhältnis von Stroma zu Strukturen liegt deutlich auf Seiten der tubulären Formationen. Glomeruli lassen sich nicht eindeutig identifizieren. Abb. 12 B lässt mikroskopisch keine eindeutigen tubulären oder glomerulären Strukturen erkennen. Auffällig sind die starken Dichteunterschiede im Stroma.

5.1.2 Übersichtsfärbung nach vier Wochen Kultivierung

Die renalen Organoiden beider iPS-Zelllinien wurden nach etwa vier Wochen Kultur entnommen und histologisch präpariert. Durch Anfertigung von HE-Übersichtsfärbungen sollten die Wachstums- und Differenzierungsvorgänge mikroskopisch beurteilt werden. Die HE-gefärbten Paraffinschnitte zeigen morphologisch vielfältige renale Organoiden, von denen drei exemplarisch in Abb. 13 dargestellt sind. Die Organoiden haben ihre einheitlich runde Form verloren und an Durchmesser zugenommen (vgl. Abb. 12 und 13).

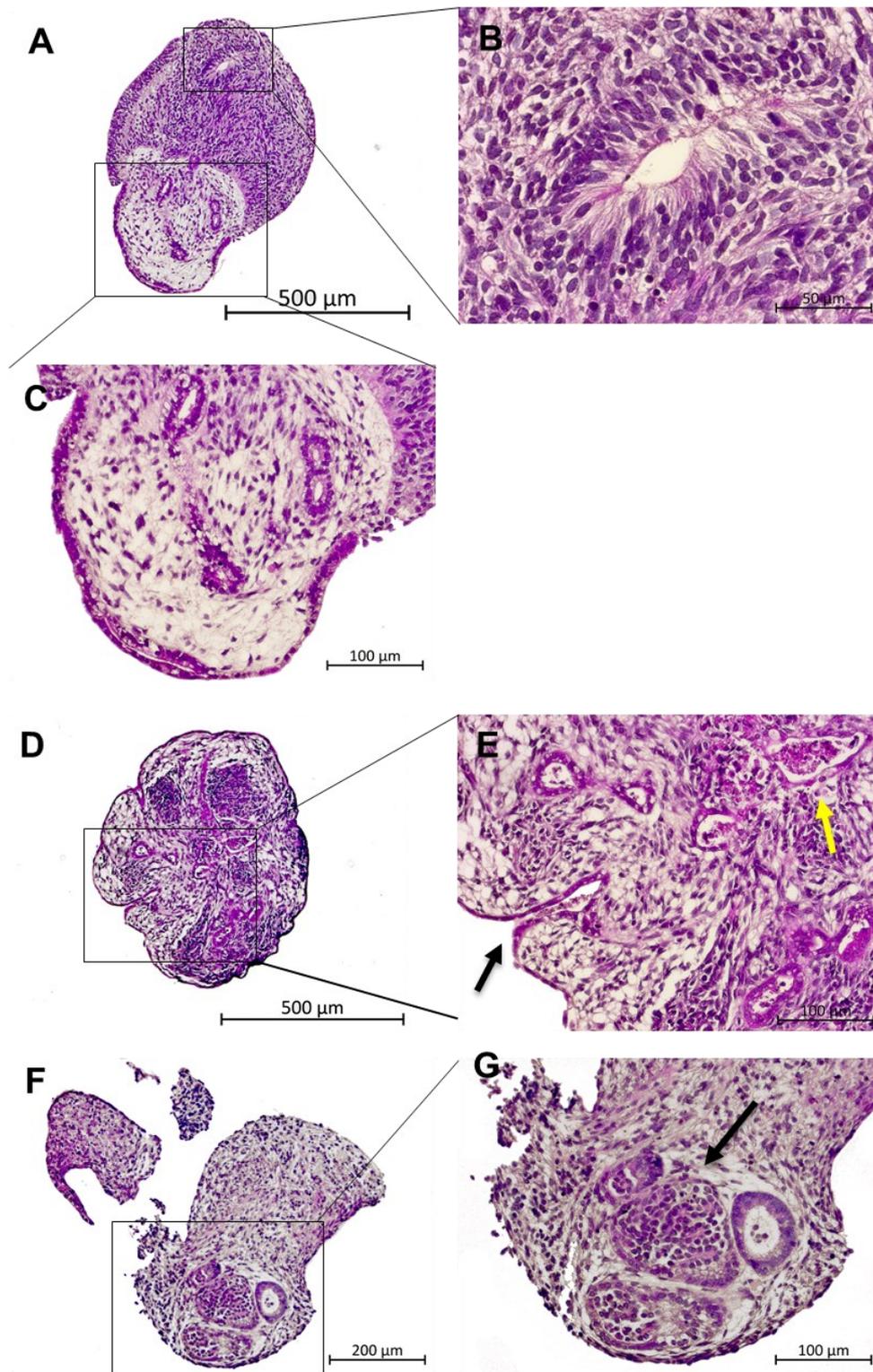


Abb. 13: Lichtmikroskopische HE-Übersichtsaufnahmen exemplarischer renaler Organoide im Querschnitt nach vier Wochen Kultivierung

A-E: Paraffinschnitte zweier exemplarischer renaler Organoide aus IMR90-Zellen. **A:** Übersichtsaufnahme. Eine klare Trennung zwischen einem zellichten und einem aufgelockerten Anteil ist zu erkennen. Mehrere tubuläre Strukturen sind angeschnitten. **B:** Detailaufnahme einer tubulären Struktur. Diese scheint größer als die Strukturen nach zwei Wochen Kultivierung. **C:** Detailaufnahme des zellärmeren Auswuchses mit mehreren tubulären Strukturen. **D:** Übersichtsaufnahme. Mehrere tubuläre Strukturen sind umgeben von Stroma unterschiedlicher Dichte. **E:** Detailaufnahme einiger tubulärer Strukturen. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine Struktur mit Verbindung zur Umgebung. In den Lumen einiger

Formationen finden sich Ansammlungen von Zellen (gelber Pfeil). F-G: Paraffinschnitt eines renalen Organoids aus BCRT5-Zellen. F: Übersichtsaufnahme. Ein Organoid, welches tubulär anmutenden Strukturen enthält, und mehrere Anschnitte weiterer Organoide sind abgebildet. G: Detailaufnahme. Auffällig sind mehrere große, mit Zellen nahezu vollständig gefüllte Formationen (schwarzer Pfeil).

Das Verhältnis von Stroma zu Strukturen liegt deutlich auf Seiten des Stromas. Einige der Strukturen weisen ein mit Zellen gefülltes Lumen auf.

In Abb. 13 A ist eine klare Abgrenzung zwischen einem dichteren Anteil und einem zellärmeren Gewebe im Organoid ausmachbar. In diesem zellärmeren Verband ist die Mehrzahl der tubulären Strukturen eingebettet. Ähnliche Vorwölbungen wurden bei mehreren renalen Organoiden dokumentiert. Im oberen Bereich des Präparates findet sich eine massiv imponierende tubuläre Struktur mit markantem Lumen (Abb. 13 A und B). Im Inneren des in Abb. 13 D und E dargestellten Organoids finden sich zahlreiche tubulär anmutende Formationen, die in Stroma unterschiedlicher Dichte eingebettet sind. Eine der angeschnittenen tubulären Strukturen weist eine Verbindung zur Umgebung auf (schwarzer Pfeil Abb. 13 E). Im Lumen anderer Strukturen sind amorphe Zellansammlungen erkennbar (gelber Pfeil Abb. 13 E), welche sich noch eindrucksvoller in dem in Abb. 13 G dargestellten renalen Organoid präsentieren.

5.1.3 Immunfärbung der renalen Organoide

Renale Organoide, die aus IMR90-Zellen differenziert worden waren, wurden nach etwa zwei Wochen Kultur entnommen und histologisch präpariert. Anschließend wurden via Immunfärbung zwei nierenspezifische Proteine markiert. Hierfür wurden Podozin und Uromodulin, das Genprodukt von NPHS2 bzw. von UMOD, gewählt.

Das Protokoll wurde mithilfe von Nieren männlicher Wildtyp-Mäuse der Linie C.129S6(Cg)-Ccl11tm1Mer/J mit Hintergrund 129S6/SvEvTac für die Anwendung an renalen Organoiden angepasst (Abb. 14). Bei den Mäusenierenpräparaten ist nur eine geringfügige unspezifische Anfärbung des Hintergrundes sichtbar (Abb. 14 C und D). Unter Verwendung des Uromodulin Polyclonal Antikörpers und des Podocin Polyclonal Antikörpers können beide Proteine erfolgreich in den Schnitten markiert werden (Abb. 14 E-H).

Anschließend wurde die Immunfärbung an den Paraffinschnitten der renalen Organoide durchgeführt. Die Mäusenierenpräparate wurden als Positivkontrollen genutzt. Die Negativkontrolle ohne primären Antikörper weist eine in den weiteren Präparaten vernachlässigbar geringe unspezifische Anfärbung des Hintergrundes auf

(Abb. 15 A). Die immunhistochemische Markierung von Podozin und Uromodulin zeigt in den Organoidschnitten eine eher disseminierte Verteilung des Niederschlages (Abb. 15 B und C).

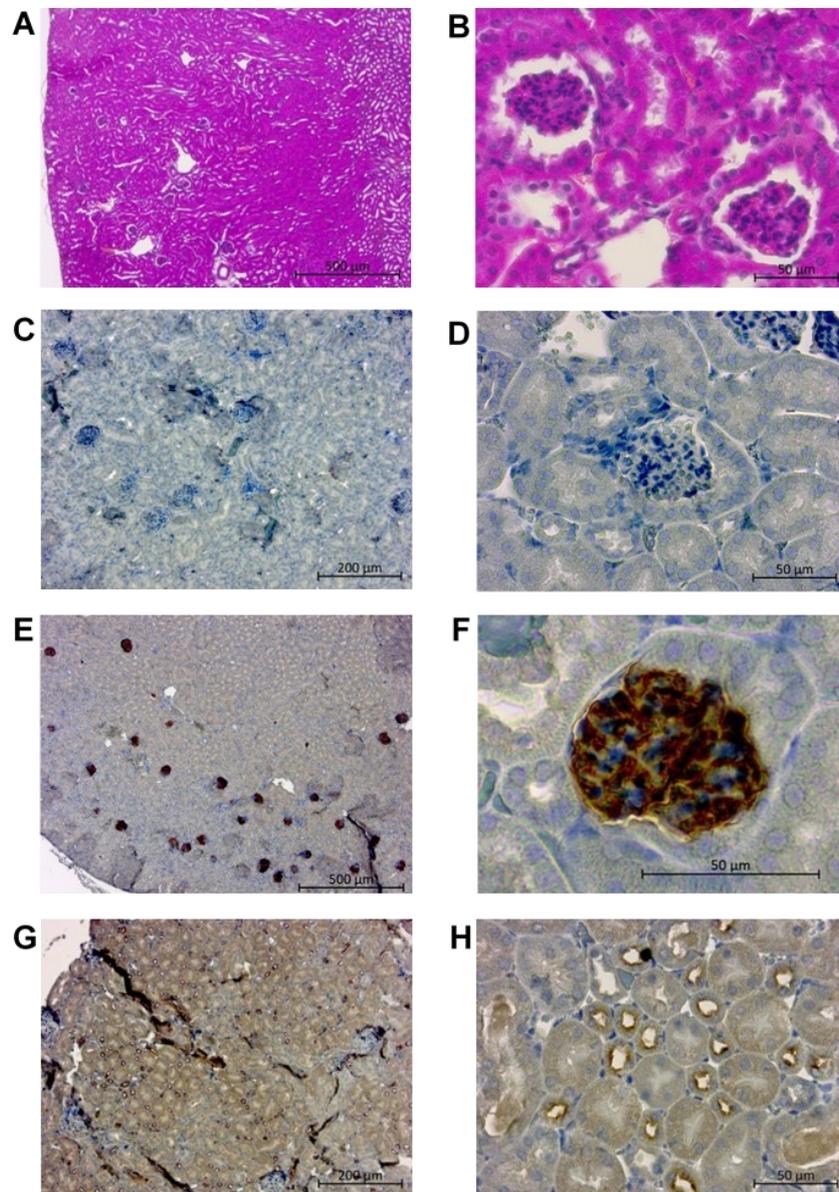


Abb. 14: Immunfärbung von Podozin und Uromodulin in Mäusenierenschnitten
 A: HE-Übersichtsfärbung. B: Detailaufnahme der HE-Färbung mit zwei Glomeruli. C: Der Hintergrund in der Übersichtsaufnahme der Negativkontrolle weist eine minimale unspezifische Anfärbung auf. D: Detailaufnahme der Negativkontrolle mit Glomerulus und mehreren Tubuli. E: Übersichtsaufnahme der Immunfärbung mit dem Podozin-Antikörper. Der deutliche braune Niederschlag markiert die Podozyten der Glomeruli. F: Detailaufnahme eines Glomerulus nach Immunfärbung mit dem Podozin-Antikörper. G: Übersichtsaufnahme der Immunfärbung mit dem Uromodulin-Antikörper. H: Die Detailaufnahme zeigt die spezifische Lokalisation des Uromodulins in der luminalen Membran des aufsteigenden Asts der Henle-Schleife.

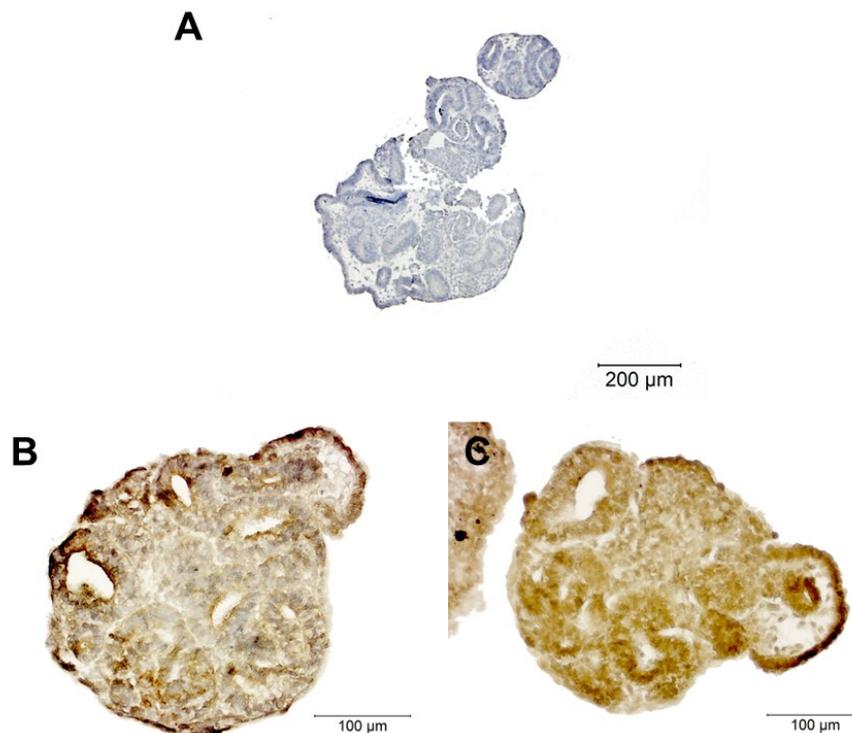


Abb. 15: Immunfärbung von Podozin und Uromodulin an Paraffinschnitten renaler Organoide
 A: Die Übersichtsaufnahme der Negativkontrolle ohne primäre Antikörper. Der Hintergrund weist eine minimale unspezifische Anfärbung auf. B: Immunfärbung von Podozin. Eine eindeutige Markierung Glomeruli-artiger Strukturen ist nicht zu erkennen. C: Immunfärbung von Uromodulin. Der braune Niederschlag weist eine eher disseminierte Verteilung mit einzelnen Foci im Präparat auf.

5.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung der renalen Organoide

5.2.1 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung nach zwei Wochen Kultivierung

Gemeinsam mit dem Elektronenmikroskopischen Zentrum des Universitätsklinikums Jena wurden aus IMR90-Zellen differenzierte Organoide nach etwa zwei Wochen Kultur für die transmissionselektronenmikroskopische Darstellung präpariert. Die Untersuchung dient der Visualisierung der Ultrastrukturen.

In den Organoidpräparaten sind Zell-Zell-Kontakte wie Desmosomen und Tight Junctions als Zeichen eines festen Zellverbandes nachweisbar (Abb. 16 C). Die Zellkerne weisen keine Merkmale von Apoptose auf. Es findet sich eine hohe Anzahl an Mitochondrien und rauem endoplasmatischem Retikulum. Mehrere tubuläre Strukturen sind erkennbar (Abb. 16 A und D). Ihre Zellen weisen eine klare Ausrichtung auf. Die Lumina der tubulären Formationen scheinen z. T. nicht durchgehend zu verlaufen (Abb. 16 A).

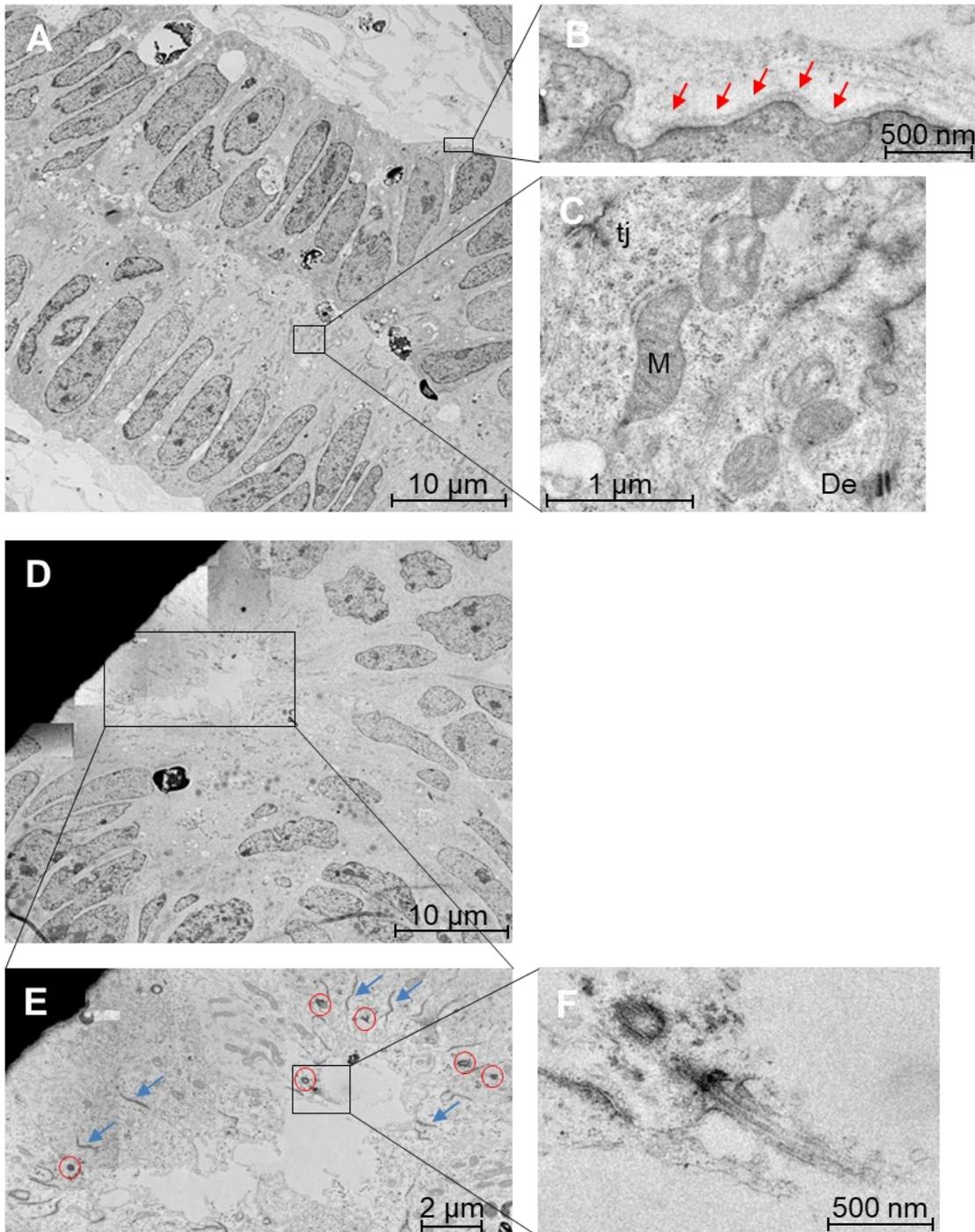


Abb. 16 TEM-Aufnahmen renaler Organoide aus IMR90-Zellen nach zwei Wochen Kultivierung

A-C: Anschnitt einer tubulären Struktur. A: Übersichtsaufnahme. B: Detailaufnahme der möglichen Glykokalyx (rote Pfeile). C: Detailaufnahme der Zellen mit Mitochondrien (M), Desmosomen (De) und Tight Junctions (tj). D-F: Querschnitt einer weiteren tubulären Struktur mit deutlichem Lumen. D: Übersichtsaufnahme. E: Eine Anhäufung von Zentrosomen (rot umrandet) nahe des Lumens. Mehrere Tight Junctions sind mit blauen Pfeilen markiert. F: Detailaufnahme eines Zentrosoms mit in das Lumen ragenden Zilien.

An den nach außen gerichteten Zellmembranen fällt ein hell angefärbter Saum auf, der einer Glykokalyx gleicht (Abb. 16 B). Auffällig an einem weiteren Anschnitt ist die Anhäufung von Zentrosomen um ein zentrales Lumen, von denen z. T. Zilien herausragen (Abb. 16 D-F). Auch wirkt die zum Lumen gewandte Zellmembran zerklüftet (Abb. 16 E).

5.2.2 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung nach vier Wochen Kultivierung

Nach vier Wochen Kultur wurden ultrastrukturelle Untersuchungen an aus BCRT5-Zellen differenzierten renalen Organoiden durchgeführt. Die Präparate zeigen einen dichten Gewebeverband mit variabler Ausrichtung der Zellen (Abb. 17 A). Auffallend sind die Kollagenfaserbündel, die das Präparat durchziehen (Abb. 17 B). Eindeutige tubuläre oder glomeruläre Strukturen sind nicht ausmachbar.

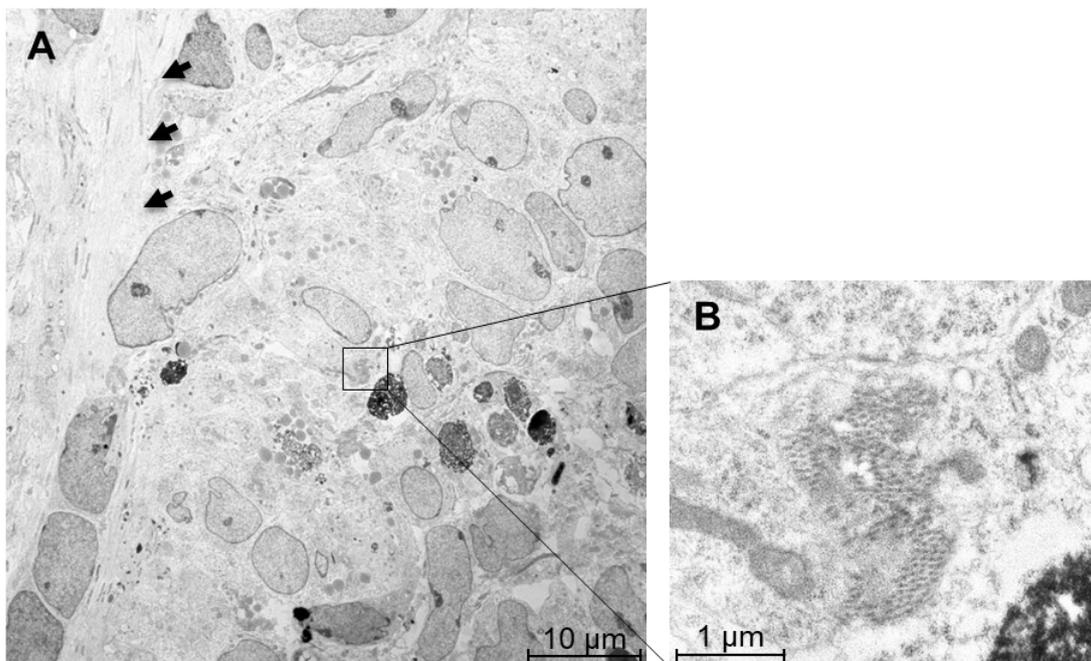


Abb. 17: TEM-Aufnahme eines renalen Organoids aus BCRT5-Zellen nach vier Wochen Kultivierung

A: Ein Ausschnitt aus dem renalen Organoid. Die Zellen sind teils geradlinig, teils bogenförmig ausgerichtet. Die schwarzen Pfeile zeigen auf Faserzüge, die durch das Präparat verlaufen und den Ausschnitt begrenzen. Eindeutige tubuläre oder glomeruläre Strukturen sind nicht zu erkennen. B: Detailaufnahme eines Kollagenfaserbündels im Querschnitt.

5.3 qPCR-Analyse der renalen Organoide

Die Analyse der Expression bestimmter Marker-Gene soll ermöglichen, Schlussfolgerungen über den Grad der Differenzierung zu ziehen und den Stand der

Entwicklung der renalen Organoide zu evaluieren. Die verwendeten Marker-Gene sind in Abb. 9 veranschaulicht.

5.3.1 qPCR-Analyse nach zwei Wochen Kultivierung

Erste qPCR-Analysen wurden nach zwei Wochen Kultur an renalen Organoiden aus IMR90-Zellen und mit Organoiden aus BCRT5-Zellen durchgeführt (Abb. 18 und 19). In den Diagrammen werden die jeweilige minimale und maximale Veränderung der Genexpression angegeben.

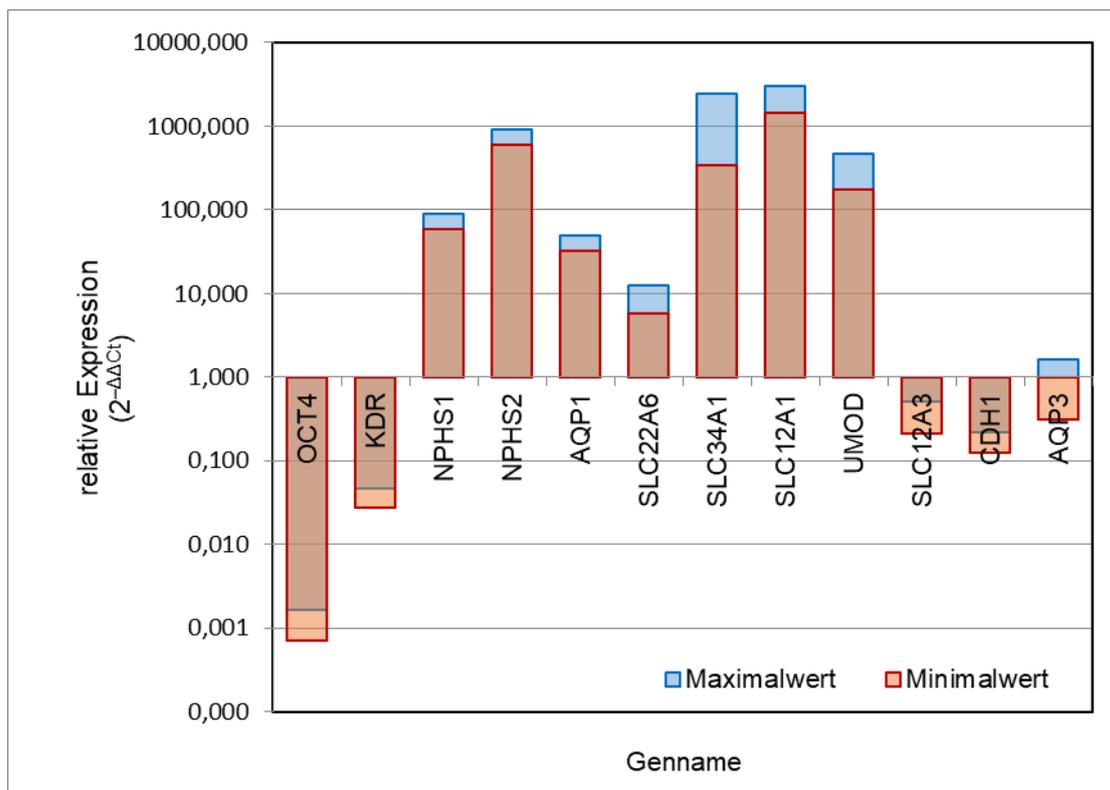


Abb. 18: qPCR-Analyse aus IMR90-Zellen differenzierter renaler Organoide nach zwei Wochen Kultivierung

Die renalen Organoide wurden entnommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen mRNA-Expressionslevel wurden denen der undifferenzierten IMR90-Zellen gegenübergestellt und unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode analysiert. Eine biologische Probe mit drei technischen Replikaten wurde untersucht. Die Mini- und Maximalwerte wurden anhand der Standardabweichungen der technischen Replikate berechnet.

Die Expression des Pluripotenz-Markers OCT4 hat in den renalen Organoiden verglichen mit der in den iPSC abgenommen. KDR als Marker-Gen des Gefäßendothels ist in den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden herunterreguliert, während die Genexpression in den aus BCRT5-Zellen generierten Organoiden etwa 7- bis 26-fach gesteigert ist. Die podozytären Marker sind in den renalen Organoiden beider iPSC-Linien nach zwei Wochen deutlich hochreguliert. Die Expression von NPHS1 wurde maximal um das etwa 100-fache, die von NPHS2

maximal um das etwa 5900-fache gesteigert. Ebenfalls werden die Marker-Gene des proximalen Tubulus AQP1, SLC22A6 und SLC34A1 verstärkt in den renalen Organoiden exprimiert, wobei Schwankungen im Grad der Steigerung zwischen den iPSC-Linien feststellbar sind. So wird z.B. SLC22A6 in den aus BCRT5-Zellen generierten Organoiden mit einem Faktor von maximal etwa 560 hochreguliert. In den aus IMR90-Zellen generierten Organoiden beträgt der Faktor maximal etwa 13.

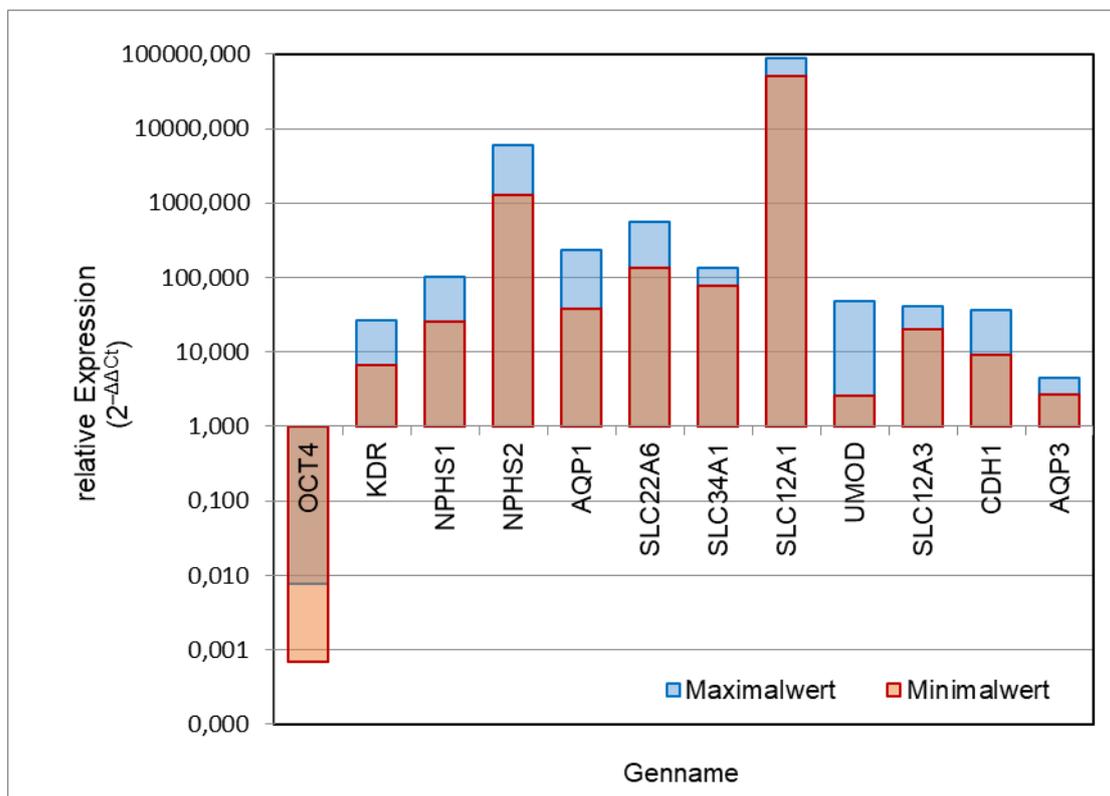


Abb. 19: qPCR-Analyse aus BCRT5-Zellen differenzierter renaler Organoide nach zwei Wochen Kultivierung

Die renalen Organoide wurden entnommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen mRNA-Expressionslevel wurden denen der undifferenzierten BCRT5-Zellen gegenübergestellt und unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode analysiert. Eine biologische Probe mit drei technischen Replikaten wurde untersucht. Die Mini- und Maximalwerte wurden anhand der Standardabweichungen der technischen Replikate berechnet.

SLC12A1 als ein Marker-Gen des dicken aufsteigenden Asts der Henle-Schleife ist deutlich in seiner Expression hochreguliert mit einer maximal etwa 90.000-fachen Steigerung in den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden. Die Expression des zweiten Marker-Gens des dicken aufsteigenden Asts, UMOD, ist in den aus IMR90-Zellen generierten Organoiden um maximal etwa das 470-fache, in den aus BCRT5-Zellen generierten Organoiden um maximal etwa das 50-fache hochreguliert. Die Gene SLC12A3 und CDH1 als Marker der distalen Nephronabschnitte sind in den aus IMR90-Zellen differenzierten renalen Organoiden in ihrer Expression

herunterreguliert. In den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden ist die Expression von SLC12A3 und CDH1 um maximal etwa das 40-fache gesteigert. Das Marker-Gen des Sammelrohres, AQP3, ist in seiner Expression in den aus BCRT5-Zellen generierten Organoiden maximal etwa um den Faktor 5 gesteigert. In den aus IMR90 Zellen generierten Organoiden kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob die Genexpression von AQP3 hoch- oder herunterreguliert ist.

5.3.2 qPCR-Analyse nach vier Wochen Kultivierung

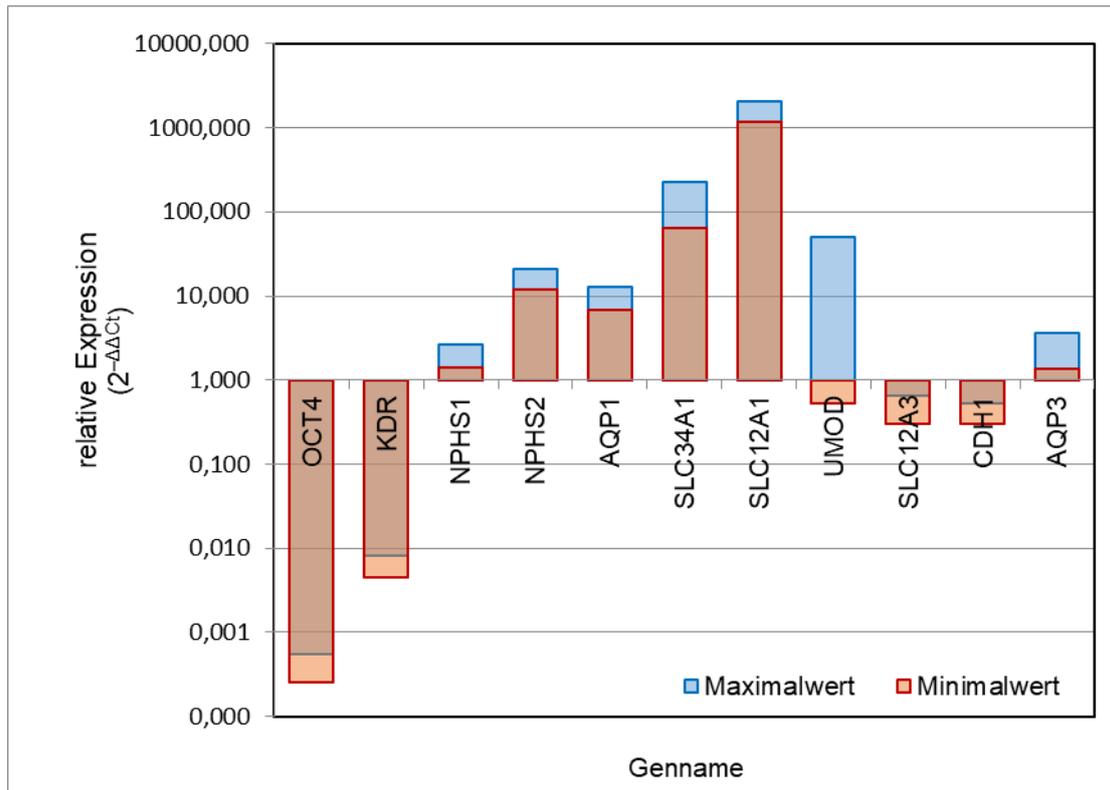


Abb. 20: qPCR-Analyse renaler Organoide nach vier Wochen Kultivierung
Die renalen Organoide wurden entnommen, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relativen mRNA-Expressionslevel wurden denen der undifferenzierten IMR90-Zellen gegenübergestellt und unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode analysiert. Eine biologische Probe mit drei technischen Replikaten wurde untersucht. Die Mini- und Maximalwerte wurden anhand der Standardabweichungen der technischen Replikate berechnet. SLC22A6 als eines der Marker-Gene des proximalen Tubulus ist nicht nachweisbar und daher nicht im Diagramm mitaufgeführt.

Nach vier Wochen Kultivierung wurde eine weitere qPCR-Analyse mit aus IMR90-Zellen differenzierten renalen Organoiden durchgeführt, um Veränderungen zu untersuchen (Abb. 20).

Der Pluripotenz-Marker OCT4 und der Endothel-Marker KDR sind verglichen mit den undifferenzierten IMR90-Zellen in ihrer Expression verringert. Die Genexpression der podozytären Gene NPHS1 und NPHS2 ist um maximal etwa 3-fache bzw. 21-fache gesteigert. Damit sind die Expressionslevel in den renalen Organoiden nicht so

stark erhöht wie nach zwei Wochen Kultur. Diese Entwicklung zeigt sich ebenfalls bei den übrigen Marker-Genen. Es kann nicht eindeutig bestimmt werden, ob die Genexpression von UMOD in den Organoiden nach vier Wochen Kultur hoch- oder herunterreguliert ist.

Eine Ausnahme stellt das Marker-Gen für das Sammelrohr, AQP3, dar, welches um das maximal etwa 2-fache in seiner Expression gesteigert ist. Das Gen SLC22A6 war nach vier Wochen Kultur nicht mehr nachweisbar und entfällt aus dem Diagramm.

5.4 Analyse der NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinien

5.4.1 Steigerung der Expression von NPHS2 und UMOD durch die Verknüpfung mit den Fluorophoren

Die HEK 293-Zellen wurden erfolgreich mit den jeweiligen Guide- und Taggingplasmiden transfiziert und selektiert, sodass stabile NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinien generiert wurden, in denen die Funktionalität der Reporterkonstrukte getestet werden konnte. In den Reporter-Zelllinien wiesen einige Zellen bereits ohne Stimulation der Expression von NPHS2 bzw. UMOD Fluoreszenzsignale auf. In der NPHS2-Reporter-Zelllinie konnten Signale im rötlichen Spektrum, in der UMOD-Reporter-Zelllinie Signale im rötlichen und grünen Spektrum fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. Um zu testen, ob die Expression der Zielgene und damit auch die Expression der verknüpften Fluorophore allein durch das Tagging gesteigert wird, wurde eine qPCR-Analyse durchgeführt. Gleichzeitig sollte geprüft werden, ob sich durch gezielte Stimulation die Genexpression von NPHS2 und UMOD weiter steigern ließe. Mithilfe des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes und Promotor-spezifischen sgRNAs wurde die Transkription der Zielgene stimuliert. Anschließend wurde die Veränderung der Genexpressionslevel von NPHS2 und UMOD in den Reporter-Zelllinien ohne und mit Stimulation analysiert (Abb. 21).

In der NPHS2-Reporter-Zelllinie ist die Expression des Zielgens um maximal das circa 33-fache, minimal das 5-fache erhöht. Nach Stimulation lässt sich eine maximal etwa 9160-fache Steigerung der NPHS2-Expression im Vergleich zur unmodifizierten Grundzelllinie messen. UMOD ist in seiner Expression in der UMOD-Reporter-Zelllinie um maximal das circa 130-fache, minimal das etwa 8-fache hochreguliert. Durch Stimulation lässt sich dieser Faktor auf maximal etwa 5760 steigern.

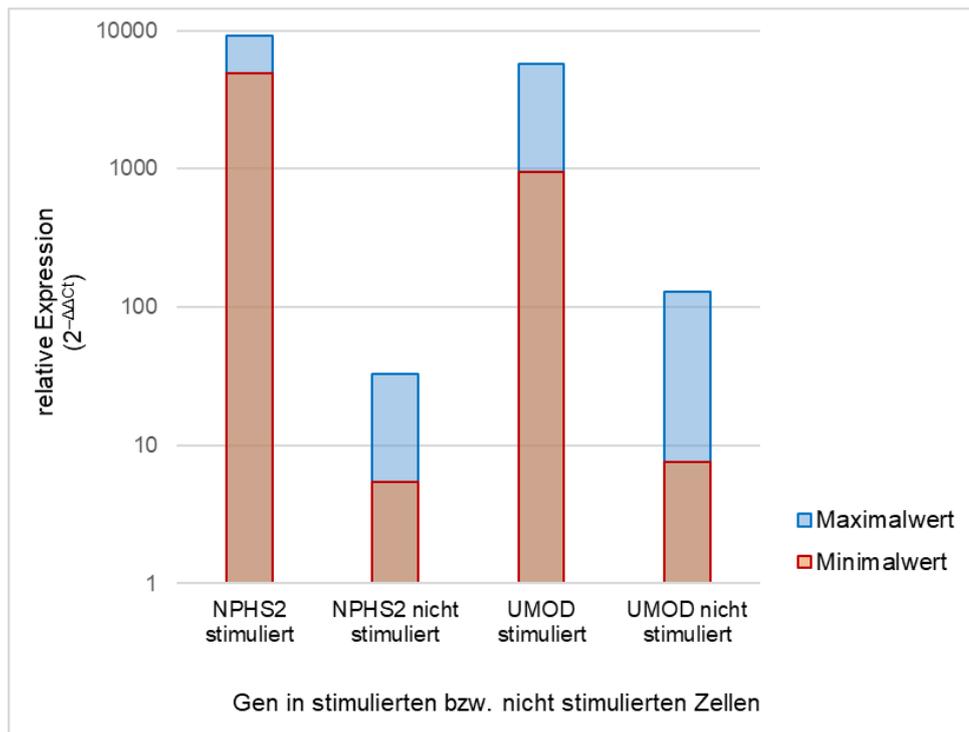
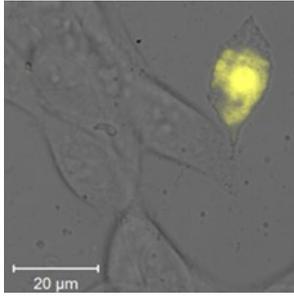


Abb. 21: qPCR-Analyse der relativen Expressionslevel der Zielgene in der NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinie ohne und mit Stimulation

Die relativen mRNA Expressionslevel wurden denen der unmodifizierten Grundzelllinie gegenübergestellt und unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ – Methode analysiert. Drei biologische Replikate der UMOD-Reporter-Zelllinie bzw. zwei biologische Replikate der NPHS2-Reporter-Zelllinie mit jeweils drei technischen Replikaten wurden untersucht. Die Mini- und Maximalwerte wurden anhand der Standardabweichungen der biologischen Replikate berechnet. Bereits in den Reporter-Zelllinien ohne Stimulation sind die Expressionslevel der Zielgene NPHS2 und UMOD erhöht. Eine weitere Steigerung der Genexpression ist durch die gezielte Stimulation mithilfe des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes und Promotor-spezifischen sgRNAs möglich.

5.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Reporter-Zelllinien

Um die in den Reporter-Zelllinien beobachteten Fluoreszenzsignale eindeutig zu identifizieren, wurden Untersuchungen am Konfokalmikroskop (LSM 980, Carl Zeiss Microscopy) durchgeführt. Für die Fluoreszenzsignale von mCherry, mNeonGreen und tdTomato wurden Positivkontrollen erstellt. tdTomato ist in den Guideplasmiden vorhanden. Falls diese nach Transfektion weiterhin in den Zellen verbleiben, wäre dies so nachweisbar und würde die rötlichen Fluoreszenzsignale in der UMOD-Reporter-Zelllinie erklären. Die Negativkontrolle bestand aus Zellen der Grundzelllinie, in denen bis auf Autofluoreszenz keine Signale zu erwarten waren (Abb. 22). Um optimale Signalstärken zu generieren, wurden die Reporter-Zelllinien sowohl ohne als auch mit Stimulation der Genexpression analysiert.



*Abb. 22: Beispielhafter Ausschnitt einer Negativkontrolle
Als Negativkontrolle wurden die HEK 293-Zellen der Grundzelllinie verwendet und auf Autofluoreszenz untersucht. Beispielhaft ist hier das Fluoreszenzsignal einer apoptotischen Zelle abgebildet. Die Spektren der Hintergrund- und Autofluoreszenz wurden aufgenommen.*

UMOD-Reporter-Zelllinie

Die Positivkontrollen wurden analysiert und die Spektren für mNeonGreen und tdTomato aufgenommen (Abb. 23 A bis D). Es folgte die Untersuchung der UMOD-Reporter-Zelllinie ohne Stimulation (Abb. 23 E). Im Zytoplasma der Zellen fanden sich Fluoreszenzsignale im grünen und im rötlichen Spektrum. Um zu verifizieren, dass es sich um mNeonGreen und tdTomato handelt, wurde eine Spektralanalyse durchgeführt und die aufgenommenen Spektren mit denen der Positivkontrollen verglichen (Abb. 23 F; spektrale Analyse von tdTomato in der UMOD-Reporter-Zelllinie nicht abgebildet). Eine Übereinstimmung der Spektren konnte festgestellt werden. Anschließend wurden die Zellen, in denen die Expression von UMOD stimuliert worden war, analysiert. Optisch konnte kein Unterschied in der Anzahl fluoreszierender Zellen oder in der Intensität des Signals festgestellt werden.

NPHS2-Reporter-Zelllinie

Die Positivkontrollen wurden mikroskopiert und die Spektren für tdTomato und mCherry aufgenommen (Abb. 24 A bis D). tdTomato wies nur geringe Signalintensitäten in der Positivkontrolle auf (Abb. 24 D). Anschließend wurde die Reporter-Zelllinie ohne vorherige Stimulation der NPHS2-Expression untersucht. Durch Anregung mit sowohl 594 nm als auch 514 nm konnten im Zytoplasma der Zellen zwei Fluoreszenzsignale im roten Spektrum unterschieden werden (Abb. 24 E und F). Nach Vergleich der Spektren mit denen der Positivkontrollen wurde bestätigt, dass in der NPHS2-Reporter-Zelllinie sowohl mCherry als auch tdTomato exprimiert werden. Anschließend wurde die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der NPHS2-Reporter-Zelllinie nach Stimulation durchgeführt. Optisch konnte keine Veränderung beobachtet werden.

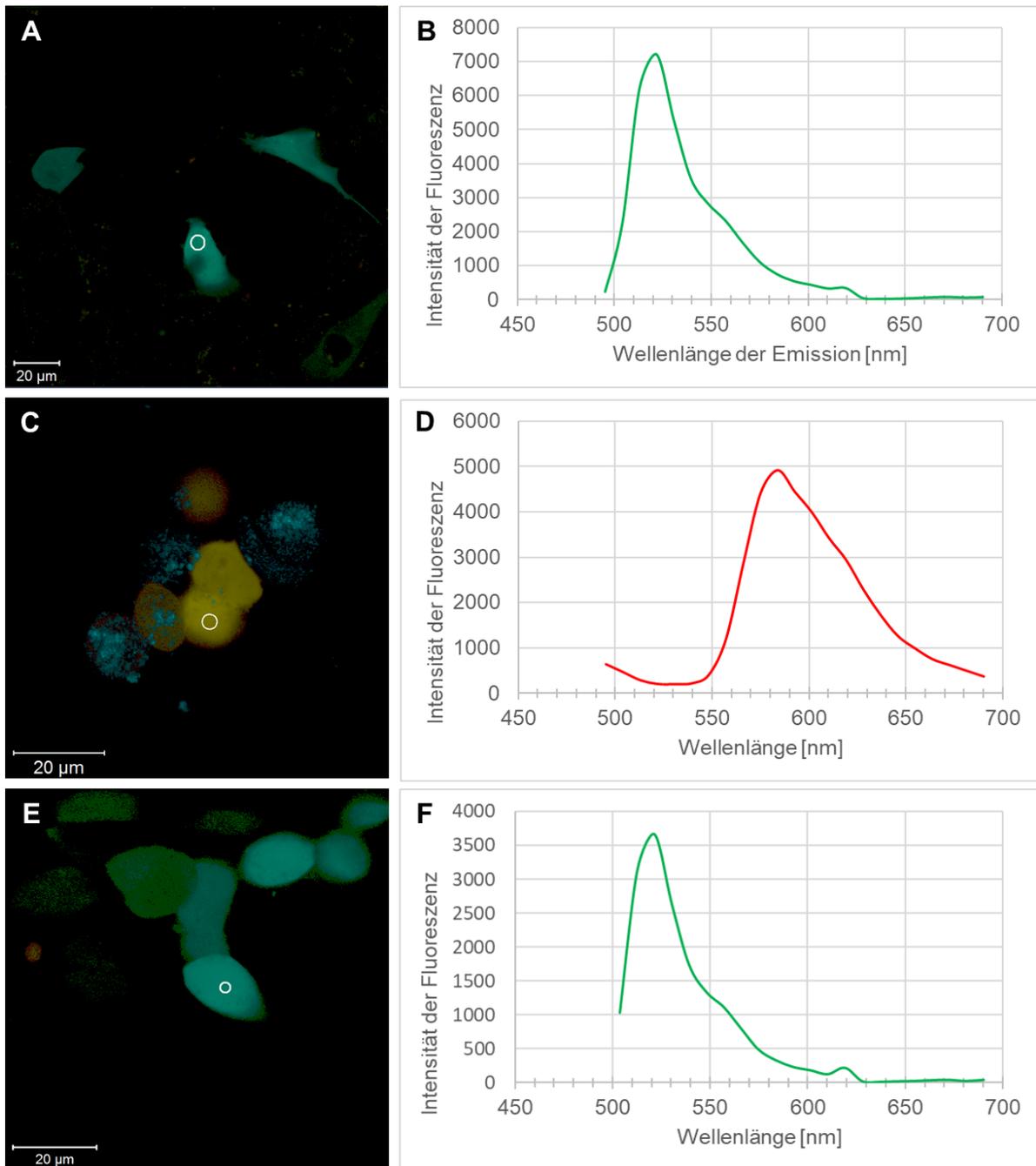


Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der UMOD-Reporter-Zelllinie

A: Positivkontrolle mit mNeonGreen. **B:** Emissionsspektrum mNeonGreens mit Maximum bei 517 nm. **C:** Positivkontrolle mit tdTomato. **D:** Emissionsspektrum tdTomatos mit Maximum bei 581 nm. **E:** Analyse der UMOD-Reporter-Zelllinie. Mehrere Fluoreszenzsignale wurden detektiert und die Spektren aufgenommen. **F:** Eines der aufgenommenen Spektren. Das Maximum liegt bei etwa 517 nm. Das Spektrum stimmt mit dem der Positivkontrolle mNeonGreens überein. Somit exprimieren die UMOD-Reporter-Zellen mNeonGreen. Die spektrale Analyse von tdTomato in den Zellen der UMOD-Reporter-Zelllinie ist nicht abgebildet.

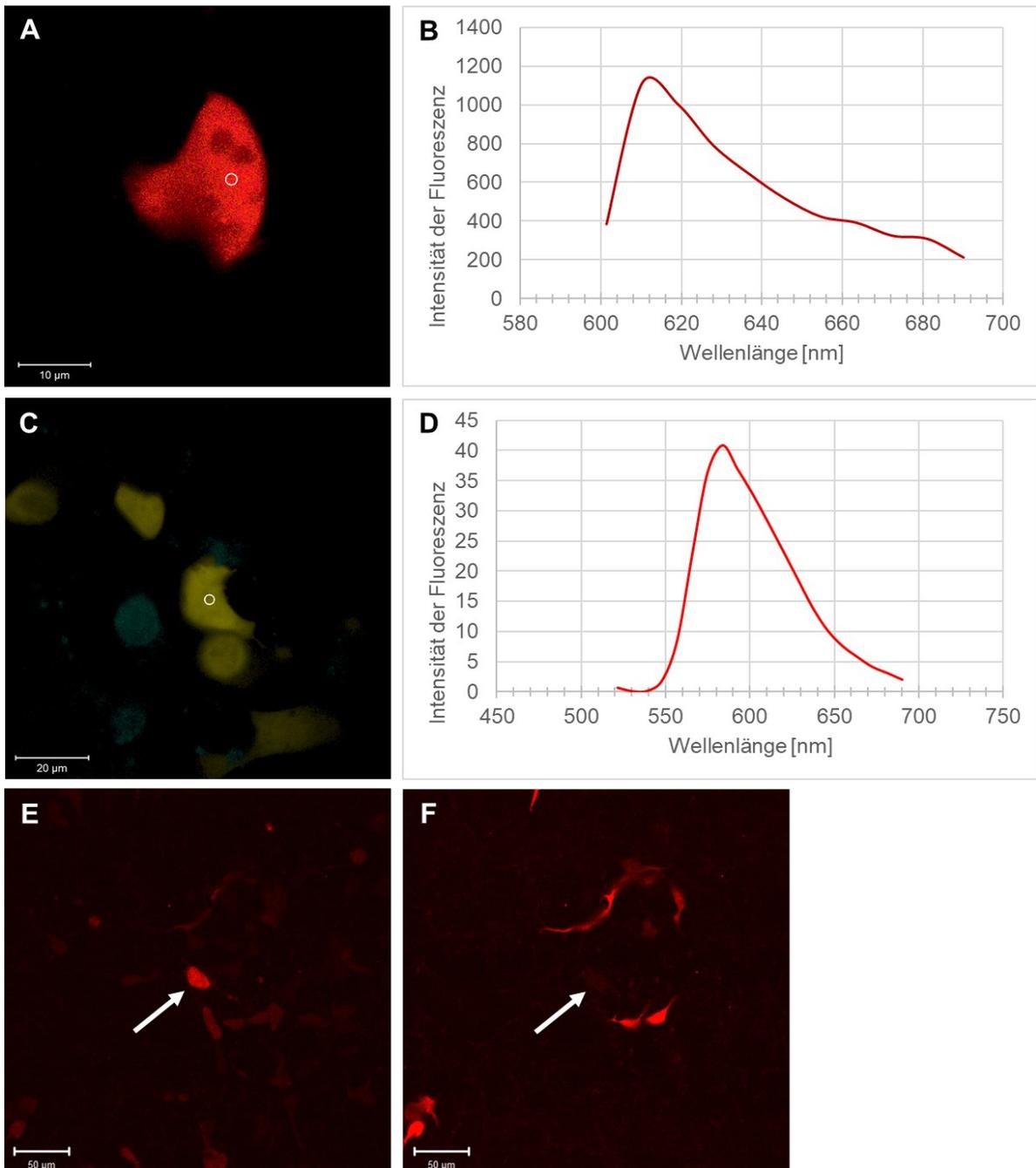


Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der NPHS2-Reporter-Zelllinie
 A: Positivkontrolle mit mCherry. B: Emissionsspektrum mCherrys mit Maximum bei 610 nm.
 C: Positivkontrolle mit tdTomato. D: Emissionsspektrum tdTomatos mit Maximum bei 581 nm. tdTomato weist eine geringe Signalstärke auf, was hinsichtlich des untersuchten Aspekts jedoch ohne Relevanz ist. E: Darstellung der mCherry-positiven Zellen (weißer Pfeil). Durch Verwendung eines 594 nm-Lasers wurde lediglich mCherry optimal angeregt. F: Darstellung der tdTomato-positiven Zellen. Der Bildausschnitt ist identisch mit E. Durch Verwendung eines 514 nm-Lasers wurde hauptsächlich tdTomato angeregt. Der weiße Pfeil deutet auf die Stelle, an der die mCherry-exprimierende Zelle nun kaum noch sichtbar ist.

6 Diskussion

Die Prävalenz der mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehenden CKD ist über die letzten Jahrzehnte hinweg deutlich gestiegen (Jha et al. 2013). Gleichzeitig sind die aktuellen therapeutischen Möglichkeiten insbesondere bei fortgeschrittenem Nierenversagen begrenzt (Asgari et al. 2017). Die Dialyse als Nierenersatzverfahren ist weiterhin der Organtransplantation hinsichtlich des Behandlungserfolgs unterlegen (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2022). Der Einsatz letzterer wiederum wird durch den Mangel an verfügbaren Transplantaten und die Problematik der Immunogenität begrenzt (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2022, Lancaster und Knoblich 2014). Vor diesem Hintergrund ist die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien und die Optimierung bisheriger Optionen von enormer Relevanz (Asgari et al. 2017). Dafür bedarf es neuer, präziser Forschungsmodelle, um Defizite bisheriger Formate wie zweidimensionaler Zellkulturen auszugleichen (Kapalczynska et al. 2018). Ein solcher innovativer Ansatz sind aus humanen iPSC differenzierte renale Organoide (Borestrom et al. 2018). Sie besitzen das Potenzial zur möglichst getreuen *in vitro*-Untersuchung von Physiologie und Pathophysiologie der menschlichen Niere (Lancaster und Knoblich 2014). Auch stellen sie eine potenzielle zukünftige Gewebeersatzstrategie neben Dialyse und Organtransplantation dar (Lancaster und Knoblich 2014). Durch die Möglichkeit der Differenzierung renaler Organoide aus patienteneigenen iPSC könnte die Problematik der Immunogenität und des Transplantatmangels gemildert werden (Lancaster und Knoblich 2014).

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines von Przepiorski *et al.* (2018) publizierten Protokolls zur Differenzierung humaner renaler Organoide aus iPSC. Im Rahmen der Diskussion wurde der Erfolg dessen beurteilt und einzelne Aspekte des Protokolls anderen Methoden gegenübergestellt. Die Qualität der renalen Organoide und ihre Eignung als Modelle der menschlichen Niere wurde anhand diverser Untersuchungen diskutiert. Zuletzt wurden die Funktionalität und die Eigenschaften zweier im Rahmen dieser Arbeit generierter Reporter-Zelllinien mit den nierenspezifischen Zielgenen NPHS2 und UMOD betrachtet. Reportersysteme ermöglichen die Visualisierung zellulärer Vorgänge in Echtzeit (Przepiorski et al. 2022). Ihr Potenzial zur morphologischen Charakterisierung und Beurteilung humaner renaler Organoide *in vitro* wurde evaluiert.

6.1 Generieren der humanen renalen Organoiden aus iPSC

6.1.1 Etablierung des Differenzierungsprotokolls

Das von Przepiorski *et al.* (2018) publizierte Protokoll zur Differenzierung humaner renaler Organoiden wurde anhand von zwei hiPSC-Linien, den IMR90-Zellen und den BCRT5-Zellen, erfolgreich angewandt. Für die Formation der EBs zu Beginn des Protokolls wurde für einige Organoid-Ansätze die Methode der Selbst-Aggregation genutzt, für andere wurden AggreWell™ Platten eingesetzt. Letztlich waren zwischen den renalen Organoiden, die aus beiden Methoden hervorgingen, keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. Ein Nachteil der Selbst-Aggregation ist die stärkere Abhängigkeit der Methode von der Erfahrung der durchführenden Person, welches die Reproduzierbarkeit erschwert.

6.1.2 Nachweis multipler renaler Komponenten in den Organoiden

Durch die qPCR-Analysen der renalen Organoiden nach zwei und vier Wochen Kultur konnte die gesteigerte Expression für Marker-Gene des Glomerulus, des proximalen und distalen Tubulus inklusive Anteilen der Henle-Schleife sowie des Sammelrohrs nachgewiesen werden (Abb. 9, 18-20). Das Marker-Gen endothelialer Zellen, KDR, war nur in den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden in seiner Expression erhöht (Abb. 19). Morphologisch konnte in den histologischen Schnittpräparaten die Ausbildung von Tubuli bestätigt werden (Abb. 12, 13). Da nach zwei Wochen Kultur in den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden insbesondere die Expression der Marker-Gene der proximaleren Tubulusabschnitte gesteigert war, scheinen diese zumindest bei den Organoiden aus den IMR90-Zellen sich vor den distaleren Abschnitten zu entwickeln (Abb. 18). Diese Vermutung wird durch die gesteigerte Hochregulation der Expression von AQP3, dem Marker-Gen des Sammelrohrs, nach erst vier Wochen Kultur in aus den IMR90-Zellen generierten Organoiden unterstützt (Abb. 18, 20; vgl. 6.1.5). Der Pluripotenz-Marker OCT4 war in allen qPCR-Analysen in seiner Expression erniedrigt, welches weiter die erfolgreiche Differenzierung der iPSC bestätigt (Abb. 18, 19, 20). In den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden konnte nach zwei Wochen Kultur eine gesteigerte Expression des Gens SLC12A3 als Marker der *Pars convoluta* des distalen Tubulus beobachtet werden (Abb. 19). Dies ist von besonderem Interesse, da dieser Marker erst spät in der menschlichen Nephrogenese vorkommt (Przepiorski *et al.* 2018). Das ist nicht nur ein Hinweis darauf, dass die Differenzierung der Organoiden Ziellinien-spezifische

Unterschiede aufweisen kann (vgl. 6.1.3), sondern könnte bedeuten, dass die Entwicklung in den renalen Organoiden nicht exakt der der Niere *in vivo* folgt (Liu et al. 2022).

In den TEM-Aufnahmen nach zwei Wochen Kultur konnten ebenfalls Tubuli nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Anhäufung von Zentrosomen und der Nachweis von Zell-Zellkontakten in Umgebung der Lumina sprechen dafür, dass es sich um renale Tubuli handelt (Abb. 16 E). Die luminale Zellmembran wirkt zerklüftet, was der Oberflächenvergrößerung dienen könnte und auf eine beginnende Bildung des Bürstensaums weisen mag. Die nicht durchgehend verlaufenden Lumina bestätigen den juvenilen Entwicklungsstand der Tubuli (Abb. 16 A). Die hohe Zahl an Mitochondrien und an rauem endoplasmatischem Retikulum deutet des Weiteren auf eine gesteigerte Syntheseaktivität, möglicherweise im Rahmen der Differenzierung und Entwicklung der Zellen, hin.

Nach zwei Wochen Kultur waren weder in den histologischen noch in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen eindeutige Glomeruli identifizierbar. Diese Diskrepanz zwischen gesteigerter Expression der Marker-Gene und scheinbar fehlendem morphologischen Korrelat wird unter 6.1.3 thematisiert. Nach vier Wochen Kultur waren in den histologischen Präparaten mit Zellformationen gefüllte Strukturen von anderen, rein tubulären Strukturen abgrenzbar (Abb. 13 D-G). Möglicherweise handelt es sich bei diesen neuartigen Strukturen um juvenile oder aberrante glomeruläre Entitäten.

In allen histologischen, immunhistochemischen und elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist das Stroma der Organoiden sichtbar. Auf ein stromales Marker-Gen wurde in den qPCR-Analysen verzichtet.

Zusammenfassend enthalten die generierten humanen renalen Organoiden proximale und distale Tubuli, Anteile der Henle-Schleife, Sammelrohre, potenzielle juvenile Glomeruli und interstitielle Zellen. Des Weiteren konnten endotheliale Zellen in den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden nachgewiesen werden.

6.1.3 Zelllinien-spezifische Unterschiede und Diskrepanz zwischen Genexpression und Morphologie in den renalen Organoiden

Nach zwei Wochen Kultur waren in den histologischen Präparaten der aus den BCRT5-Zellen differenzierten renalen Organoiden keine eindeutigen Strukturen erkennbar, im Gegensatz zu den Aufnahmen der aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden (Abb. 12). Die Dichteunterschiede in den aus den BCRT5-Zellen

generierten Organoiden deuten möglicherweise auf beginnende Differenzierungsprozesse hin. Damit lässt sich die Vermutung aufstellen, dass BCRT5-Zellen länger für die erfolgreiche Entwicklung in renale Organoide benötigen. Interessanterweise sind die Marker-Gene in der qPCR-Analyse nach zwei Wochen Kultur in den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden durchschnittlich stärker hochreguliert als in den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden (Abb. 18, 19). Ausnahmen bilden die Gene SLC34A1 als Marker für den proximalen Tubulus und UMOD, ein Marker des dicken aufsteigenden Asts der Henle-Schleife. Ihre Genexpression wurde in den aus IMR90-Zellen generierten Organoiden stärker hochreguliert. Der Endothelmarker KDR sowie die Gene des distalen Tubulus SLC12A3 und CDH1 sind nur in den aus BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden in ihrer Expression gesteigert. Eine Expressionssteigerung des Gens AQP3, dem Marker für das Sammelrohr, ist nur fraglich in den aus IMR90-Zellen generierten Organoiden nachweisbar. Die Ergebnisse der qPCR-Analyse ließen daher vermuten, dass die aus BCRT5-Zellen generierten renalen Organoide weiter differenziert wären. Die histologischen Untersuchungen implizieren jedoch das Gegenteil. Dies könnte auf eine Diskrepanz zwischen der Steigerung der Genexpression und der Entwicklung lichtmikroskopisch erfassbarer Strukturen hindeuten. Ein weiterer Hinweis auf eine solche Diskrepanz ist die Immunfärbung von Podozin und Uromodulin in den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden nach zwei Wochen Kultur. Trotz nachweislich gesteigerter Genexpression entstand bei der Immunfärbung ein eher unspezifisches Muster, insbesondere verglichen mit den eindeutigen Ergebnissen in den Mäusenierenpräparaten (Abb. 14, 15). Unterschiede zwischen den Immunfärbungen von Podozin und Uromodulin deuten allerdings auf eine gewisse Spezifität der primären Antikörper hin. Da der Hintergrund der Präparate kaum angefärbt wurde, ist von einer ausreichenden Spezifität des sekundären Antikörpers auszugehen. Combes *et al.* (2019) konnten ebenfalls trotz Nachweis der Expression neuraler Marker via Einzelzell-Sequenzierung diese immunhistochemisch nicht in den Organoiden markieren. Möglicherweise verfügt die Immunhistochemie über keine ausreichende Sensitivität in den frühen Stadien der Differenzierung.

6.1.4 Einfluss des Durchmessers auf Differenzierung, Versorgung, Vaskularisierung und Degeneration der renalen Organoid

Przepiorski *et al.* (2018) konnten beobachten, dass die erfolgreiche Differenzierung der renalen Organoid abhängig vom initialen Durchmesser der EBs ist. Durchmesser von unter 200 μm besitzen vermutlich eine zu niedrige Zellzahl, um die *in vivo*-Gewebedifferenzierung nachzuahmen, und führen nur teilweise zur Entwicklung in renale Organoid (Przepiorski *et al.* 2018). Durchmesser von über 700 μm sind ebenfalls nachteilig für den Differenzierungsprozess (Przepiorski *et al.* 2018). Dies könnte auf eine Limitation der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zurückzuführen sein, die in der Suspensionskultur via Diffusion erfolgt (Przepiorski *et al.* 2018). Die Zellen im Inneren der Organoid erhalten bei größeren Durchmessern eine geringere Konzentration an Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. So konnten Van Winkle *et al.* (2012) feststellen, dass die Sauerstoffkonzentration in EBs mit einem Durchmesser von 400 μm bereits 50% niedriger war als die in 200 μm -großen EBs, ohne jedoch eine kritische Konzentration zu unterschreiten. Przepiorski *et al.* (2018) wiesen einen höheren Anteil apoptotischer Zellen insbesondere im Inneren von Organoiden ab 700 μm Durchmesser nach. Proliferierende Zellen waren hauptsächlich am Rand zu finden (Przepiorski *et al.* 2018). Interessanterweise gelangten Hubert *et al.* (2016) zu einem beinahe gegensätzlichen Ergebnis: Zwar waren die höchsten Proliferationsraten in ihren Versuchen ebenfalls am Rand situiert, jedoch war dort auch die höchste Apoptose-Aktivität nachweisbar (Hubert *et al.* 2016). Deshalb schlussfolgerten Hubert *et al.* (2016), dass der Rand der Organoid ein hochdynamisches Gebiet präsentiert mit einem stabilen inneren Kern. An den Randgebieten der von Takasato *et al.* (2016) generierten Organoid waren die sich entwickelnden Nephrone situiert, während sich im Inneren das renale Interstitium und das endotheliale Netzwerk befanden. Dies könnte ebenfalls die Hypothese von Hubert *et al.* (2016) unterlegen.

Die Erkenntnis von Przepiorski *et al.* (2018), dass Durchmesser von weniger als 200 μm und mehr als 700 μm bereits die initiale Differenzierung hindern würden, konnte im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Unter Verwendung entsprechender Filter können EBs mit inadäquatem Durchmesser jedoch aus der Kultur entfernt werden (Przepiorski *et al.* 2018).

Nach etwa vier Wochen Kultur ließ sich bei den renalen Organoiden ein Verlust der runden Form und die Ausbildung von Stroma-reichen Vorwölbungen feststellen

(Abb. 13). Die Durchmesser der Organoide betragen um die 500 μm und waren damit tendenziell größer als nach zwei Wochen Kultur, zu welchem Zeitpunkt die Durchmesser zwischen 200 μm und 500 μm schwankten (Abb. 12). Dies deutet auf ein exzentrisches Wachstum in Kultur mit Proliferation der randständigen Zellen hin und würde die durch Hubert *et al.* (2016) vorgestellte Hypothese unterstützen. In den TEM-Aufnahmen nach vier Wochen Kultur sind mehrere dunkel angefärbte Zellen sichtbar (Abb. 17). Diese potenziell apoptotischen Zellen sind in den Organoiden im Gegensatz zu den Beobachtungen von Przepiorski *et al.* (2018) jedoch über den Querschnitt hinweg verteilt. Zusätzlich fanden sich in der TEM-Aufnahme multiple Kollagenfaserbündel. Auch nimmt die Expression der Marker-Gene in den renalen Organoiden nach vier Wochen Kultur tendenziell ab (Abb. 20), ein Phänomen, welches wiederholt in der Literatur beschrieben wurde (Kumar *et al.* 2019, Przepiorski *et al.* 2018). Dies könnte zusammen mit den apoptotischen Zellen und der Ablagerung von Kollagen für zunehmenden Stress bei längerer Suspensionskultur sprechen. Ich stelle die Hypothese auf, dass, unabhängig von den negativen Effekten eines zu großen Durchmessers, ein verlängerter Zeitraum in Suspensionskultur zusätzliche degenerative Veränderungen und eine Reorganisation der Organoide hervorrufen könnte. Die Induktion eines Gefäßnetzwerkes anstelle der alleinigen Versorgung der Organoide mittels Diffusion könnte eine Lösung darstellen. In den aus den BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden konnte via qPCR-Analyse bereits die gesteigerte Expression des Endothelmarkers KDR nachgewiesen werden (Abb. 19). Auch Takasato *et al.* (2016) und Czerniecki *et al.* (2018) gelang es endotheliale Zellen nachzuweisen, jedoch fand keine Vaskularisierung ihrer renalen Organoide statt. Eine Zugabe von VEGF erhöhte zwar die Anzahl endothelialer Zellen, führte aber insgesamt nicht zur verbesserten Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes (Czerniecki *et al.* 2018). Homan *et al.* (2019) konnten sowohl bei Gabe als auch bei Inhibition von VEGF in humanen renalen Organoiden negative Effekte hinsichtlich der Vaskularisierung beobachten. Stattdessen nutzten sie eine mikrofluidische Kultur mit adhärenter Gelatine-Fibrin-Matrix, in der durch Superperfusion eine Scherbelastung auf die Organoide wirkt, welche die Gefäßentwicklung fördern soll (Homan *et al.* 2019). In dem von mir angewandten Protokoll zur Differenzierung renaler Organoide werden diese ab Tag 8 zur Bildung einer Scherbelastung bei 90 rpm auf einen Schüttler platziert (Przepiorski *et al.* 2018).

Taguchi *et al.* (2014) gelang eine Vaskularisierung ihrer aus embryonalen Mäusestammzellen generierten EBs nach Transplantation dieser unter die Nierenkapsel einer Maus. Durch Transplantation humaner renaler Organoide unter die Nierenkapsel von Mäusen erzielten auch van den Berg *et al.* (2018) eine verbesserte Gefäßentwicklung im Vergleich zu gleichaltrigen Organoiden, die nicht transplantiert worden waren. Die Methode entspräche eher der *in vivo*-Entwicklung, wo sowohl Angiogenese von außerhalb als auch Vaskulogenese von innerhalb des sich entwickelnden Organs eine Rolle spielen (van den Berg *et al.* 2018). Allerdings limitiert die Transplantation von Organoiden in Mäuse die späteren Anwendungsmöglichkeiten (Liu *et al.* 2022).

Zusammenfassend ist eine ausreichende Vaskularisierung der Organoide für ihre optimale Differenzierung von größter Bedeutung, da ohne ein Gefäßnetzwerk die Versorgung der Organoide mit Nährstoffen rein via Diffusion erfolgt und somit abhängig ist vom Durchmesser (Taguchi *et al.* 2014, van den Berg *et al.* 2018). Zum jetzigen Standpunkt gibt es bereits diverse Ansätze zur Verbesserung der Entwicklung des Gefäßnetzwerkes, jedoch besteht noch weiterer Forschungsbedarf für eine optimale Lösung.

6.1.5 Effekte einer Kultur von über zwei Wochen auf humane renale Organoide

Im vorherigen Abschnitt wurden die degenerativen Auswirkungen einer verlängerten Suspensionskultur diskutiert. Nichtsdestotrotz konnte ich auch positive Effekte, insbesondere hinsichtlich einer fortschreitenden Differenzierung und Wachstum der renalen Organoide, beobachten. Dies widerspricht den Ergebnissen von van den Berg *et al.* (2018). Ihre Organoide wiesen bei verlängertem Kultivierungszeitraum lediglich degenerative Veränderungen ohne weitere Maturation auf (van den Berg *et al.* 2018). Allerdings betrug der Durchmesser der von van den Berg *et al.* (2018) generierten humanen renalen Organoide 5 mm – 7 mm an Tag 7 + 25. Auf den negativen Einfluss eines zu großen Durchmessers ohne ausgebildetes Gefäßnetzwerk wurde bereits in Abschnitt 6.1.4 eingegangen.

Hingegen konnten nach vier Wochen Kultur in den histologischen Aufnahmen der im Rahmen dieser Dissertationsarbeit generierten Organoide neuartige, als potenzielle glomeruläre Entitäten imponierende Strukturen nachgewiesen werden, die nach zwei Wochen Kultur noch nicht sichtbar gewesen waren (Abb. 12, 13). Einige der Tubuli hatten des Weiteren an Größe zugenommen, sodass von einem Wachstum bei längerer Kultur ausgegangen werden kann. Auch ist AQP3 als Marker-Gen des

Sammelrohrs nach vier Wochen Kultur in seiner Expression in den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden stärker hochreguliert als nach zwei Wochen Kultur (Abb. 18, 20). Demnach scheint mit der Zeit die Entwicklung der Sammelrohre in den Organoiden aus den IMR90-Zellen gefördert zu werden. In der TEM-Aufnahme der renalen Organoiden nach vier Wochen Kultur sind keine eindeutigen Strukturen erkennbar (Abb. 17). Dies kann sowohl durch degenerative Veränderungen, aber auch durch einen ungünstig gewählten Anschnitt des Organoids bedingt sein. Letztlich scheint eine lange Suspensionskultur renaler Organoiden unter Berücksichtigung des separaten Einflussfaktors des Durchmessers sowohl positive als auch negative Effekte mit sich zu bringen. Die Degeneration der Organoiden ließe sich durch eine Optimierung der Versorgungssituation insbesondere durch Förderung der Vaskularisierung vermindern, wodurch gleichzeitig die Entwicklung vorangetrieben werden würde (vgl. 6.1.4).

6.1.6 Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms und der Ureterknospe

Die Nephrogenese umfasst sowohl die Ausbildung des metanephrischen Mesenchyms als auch die der Ureterknospe (Abb. 4). Die Frage, ob es möglich ist, im Rahmen eines Protokolls beide Entitäten zu differenzieren, wird kontrovers diskutiert. So konnten weder Morizane *et al.* (2015), Cruz *et al.* (2017) noch Czerniecki *et al.* (2018) Hinweise auf das Vorhandensein von Sammelrohren, welche sich aus der Ureterknospe differenzieren, in den von ihnen generierten Organoiden finden. Taguchi *et al.* (2017) postulierten, dass die Differenzierung des metanephrischen Mesenchyms und der Ureterknospe separate Protokolle verlangt. Marker mehrerer Abschnitte des Nephrons, welche sich aus dem metanephrischen Mesenchym entwickeln, konnten in den qPCR-Analysen der Organoiden im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abb. 18-20). In den aus BCRT5-Zellen generierten Organoiden wurde ebenfalls eine gesteigerte Expression des Marker-Gens der Sammelrohre, AQP3, gemessen (Abb. 19). In den aus IMR90-Zellen differenzierten Organoiden war die Expression von AQP3 nach zwei Wochen Kultur nur fraglich erhöht (Abb. 18). Nach vier Wochen ließ sich jedoch definitiv eine Steigerung der Genexpression nachweisen (Abb. 20). Damit ließe sich vermuten, dass die Entwicklung der Ureterknospe ebenfalls erfolgreich induziert werden konnte. Das von Przepiorski *et al.* (2018) publizierte Protokoll ermöglicht demzufolge die Differenzierung sowohl des metanephrischen Mesenchyms als auch der

Ureterknospe und spricht somit gegen die von Taguchi *et al.* (2017) aufgestellte Hypothese. Ein Problem stellt jedoch die unter den Arbeitsgruppen divergierende Auswahl geeigneter Marker-Gene, insbesondere für das Sammelrohr, dar, was eine Beurteilung solcher Fragestellungen erschwert. In dieser Arbeit wurde auf Empfehlung der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kurtz der Charité das Gen AQP3 gewählt.

6.1.7 Off-target Populationen und der Einsatz von multiplen Wachstumsfaktoren

Viele Differenzierungsprotokolle beinhalten eine große Anzahl an verschiedenen Wachstumsfaktoren (Lancaster und Knoblich 2014). Ein Kritikpunkt an dem Protokoll von Przepiorski *et al.* (2018) ist, dass die Verwendung lediglich eines Wachstumsfaktors, CHIR99021, und von KOSR nicht ausreicht für eine gezielte Differenzierung in renales Gewebe (Kumar *et al.* 2019). Folglich müssten in den nach Przepiorski *et al.* (2018) generierten renalen Organoiden mehr *off-target* Populationen entstehen. Dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden und auch bei Protokollen mit mehreren Wachstumsfaktoren sind *off-target* Populationen eine weit verbreitete Problematik (Kumar *et al.* 2019, Phipson *et al.* 2019, Howden *et al.* 2019, Combes *et al.* 2019, Przepiorski *et al.* 2018). So scheinen *off-target* Populationen nicht einzig durch die Anzahl eingesetzter Wachstumsfaktoren bedingt zu sein. Des Weiteren haben neben Przepiorski *et al.* (2018) u. a. auch Czerniecki *et al.* (2018), Takasato *et al.* (2014, 2016) und van den Berg *et al.* (2018) nur CHIR99021 bzw. CHIR99021 und FGF9 erfolgreich für die Differenzierung renaler Organoiden aus humanen PSC einsetzen können.

6.1.8 Individualität der renalen Organoiden und Reproduzierbarkeit des Protokolls

Um die Reproduzierbarkeit und postulierte universelle Anwendbarkeit des von Przepiorski *et al.* (2018) publizierten Protokolls zu testen, wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene hiPSC-Linien verwendet. Wie beschrieben, konnten Unterschiede zwischen den renalen Organoiden, insbesondere zwischen denen aus verschiedenen iPS-Zelllinien, beobachtet werden, was die Reproduzierbarkeit des Protokolls einschränkt. Phipson *et al.* (2019) beschäftigten sich konkret mit dem Problem der erschwerten Reproduzierbarkeit dreidimensionaler Kulturen (Kapalczyńska *et al.* 2018). Zusammenfassend schlussfolgerten sie, dass die

größten Differenzen auf verschiedene Ansätze zurückzuführen sind, nicht auf unterschiedliche Zelllinien (Phipson et al. 2019). Auch die hohe Komplexität der Niere als Gewebe könnte die Individualität der Organoide mitbedingen (Phipson et al. 2019, Humphreys 2018). Unter Einbezug der Variation in der Auswertung sollte diese jedoch kein relevantes Problem darstellen (Phipson et al. 2019). Auch kann eine gewisse Individualität der renalen Organoide von Vorteil sein für die möglichst realistische Imitation der *in vivo*-Organo- und Pathogenese der Niere (Lancaster und Knoblich 2014).

6.1.9 Große Übereinstimmungen zwischen humanem Nierengewebe und humanen renalen Organoiden

Eine entscheidende Frage ist, inwieweit renale Organoide in der Lage sind, menschliches Nierengewebe zu imitieren. Combes *et al.* (2019) und Boreström *et al.* (2018) haben die Genexpression in humanen renalen Organoiden mit der in fetalem bzw. adultem Nierengewebe verglichen und konnten große transkriptionelle Übereinstimmungen nachweisen. So observierten Combes *et al.* (2019) Gemeinsamkeiten bei der Transkription stromaler und endothelialer Gene sowie für Marker des Nephrons. Unterschiede seien weitgehend durch technische Artefakte bedingt gewesen (Combes et al. 2019). Vergleichspunkt bildete fetales Nierengewebe in der 16. Entwicklungswoche (Combes et al. 2019). Dies weist dadurch gleichzeitig auf die Problematik der unzureichenden Maturation als eine der bestehenden Herausforderungen der Organoid-Technologie hin (Takasato et al. 2016, Przepiorski et al. 2022). Auch Przepiorski *et al.* (2018) führten vergleichende Immunfärbungen mit den Organoiden und fetalem sowie adultem menschlichem Nierengewebe durch. Eine zufriedenstellende Übereinstimmung morphologischer und transkriptioneller Aspekte zwischen den Organoiden und der menschlichen Niere war feststellbar (Przepiorski et al. 2018). Dies bestärkt die Anwendung von Organoiden als möglichst realistische Modelle der Organo- und Pathogenese sowie als Modelle für Medikamenten- und Toxizitätstestungen. Das enorme Potenzial und die Relevanz der Organoid-Technologie werden somit untermauert.

6.2 NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinie

Durch Verwendung von Reportergenen wie z. B. Fluorophorgenen ist es möglich, ausgewählte Zielgene zu markieren (Debnath et al. 2010, Xiang et al. 2019). Mittels Verknüpfung bzw. Tagging auf genomischer Ebene unter Einsatz von

CRISPR/Cas9-Technologie erhält man ein Reportersystem, welches eine *in vitro*-Visualisierung und Charakterisierung von Zellen in Echtzeit ermöglicht (Xiang et al. 2019, Przepiorski et al. 2022, Kain und Ganguly 2001). Eine Kombination von iPSC- und Organoid-Technologie mit Reportersystemen könnte eine herausragende Methode zur Analyse der humanen renalen Organoid während ihrer Differenzierung und Entwicklung darstellen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand daher aus der Entwicklung und Testung zweier Reportersysteme mit den krankheitsrelevanten und nierenspezifischen Zielgenen NPHS2 und UMOD und der anschließenden Beurteilung ihrer Eignung zur Echtzeit-Charakterisierung renaler Organoid (Boute et al. 2000, Knaup und Wiesener 2019). NPHS2 wurde hierbei mit dem rot fluoreszierendem Protein mCherry, UMOD mit dem grün fluoreszierenden mNeonGreen verknüpft.

6.2.1 Steigerung der Genexpression von NPHS2 und UMOD in den Reporter-Zelllinien

Nach Generierung der Reporter-Zelllinien konnten bereits ohne gezielte Stimulation der Genexpression fluoreszenzmikroskopisch Signale in einem Anteil der Zellen beobachtet werden. In den NPHS2-Reporter-Zellen waren Fluoreszenzsignale im rötlichen, in den UMOD-Reporter-Zellen Signale im grünen und im rötlichen Spektrum detektierbar. Daher formte ich die Hypothese, dass allein durch die Verknüpfung mit den Fluorophoren die Zielgene NPHS2 und UMOD in ihrer Expression gesteigert wurden. Um dies zu überprüfen, wurde eine qPCR-Analyse durchgeführt. Gleichzeitig sollte getestet werden, ob durch die gezielte Stimulation die Expression der Zielgene weiter gesteigert werden konnte. Diese Stimulation erfolgte durch den in den Reporter-Zelllinien integrierten CRISPR/Cas9 SAM Komplex unter Einsatz Promotor-spezifischer sgRNAs.

Die qPCR-Analyse zeigt, dass die Genexpression von NPHS2 und UMOD wie vermutet allein durch das Verknüpfen mit den Fluorophoren gesteigert wurde (Abb. 21). Dies ist in dem Maße ungewöhnlich, da die Genomeditierung mithilfe der CRISPR/Cas9-Technologie durchgeführt wurde, welche dafür bekannt ist, die native Genexpression nicht bzw. nur minimal zu beeinflussen (Schwinn et al. 2020, Chen et al. 2018, Fetter et al. 2015). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass durch die gezielte Stimulation wie erhofft eine weitere Steigerung der Genexpression von NPHS2 und UMOD möglich ist (Abb. 21). Da durch Kopplung der Zielgene mit den Fluorophoren auch mNeonGreen bzw. mCherry stärker exprimiert werden, könnte

die Stimulation durch das CRISPR/Cas9 SAM System genutzt werden, um die Fluoreszenzsignale in den Zellen zu verstärken und so eine bessere morphologische Charakterisierung zu ermöglichen. Bei einem rein optischen Vergleich stimulierter und nicht-stimulierter Proben beider Reporter-Zelllinien am Konfokalmikroskop konnte allerdings weder ein Unterschied in der Quantität der Zellen mit Fluoreszenzsignal noch eine Änderung der Intensität des Signals festgestellt werden. Um eine exaktere Beurteilung zu ermöglichen, könnte ein Fluoreszenz-Mikrotiterplatten-Assay durchgeführt werden.

Auch nach Stimulation weist weiterhin nur ein Anteil der Zellen ein Fluoreszenzsignal auf. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Verknüpfung der Zielgene mit den Fluorophoren im Genom heterozygot erfolgte. Laut Borestrom *et al.* (2018) wäre dies hinsichtlich der Funktionalität der Reporter-Zelllinien nicht von Nachteil. Zudem ist die Effizienz der Genomeditierung durch CRISPR/Cas9 wie auch bei allen anderen Verfahren nicht absolut, liefert jedoch insgesamt die besten Ergebnisse (Ghassemi *et al.* 2021, Zhang *et al.* 2015, Ren *et al.* 2014).

6.2.2 Nachweis von tdTomato und Funktionalität der Reporter-Zelllinien

Das beschriebene zusätzliche rötliche Fluoreszenzsignal in der UMOD-Reporter-Zelllinie war unerwartet, da UMOD mit dem grünen Fluorophor mNeonGreen verknüpft worden war. Jedoch enthalten die Guideplasmide, die zur Transfektion der Grundzelllinie eingesetzt worden waren, zur visuellen Kontrolle das rote Fluorophor tdTomato. Daher stellte ich die Hypothese auf, dass in den Zellen der UMOD- und vermutlich auch der NPHS2-Reporter-Zelllinie weiterhin Guideplasmide vorhanden waren. Durch das ähnliche Spektrum von mCherry und tdTomato wären die beiden Fluorophore mittels Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie in den NPHS2-Reporter-Zellen zunächst nicht optisch differenzierbar gewesen.

Um die Hypothese zu testen, wurden Spektralanalysen am Konfokalmikroskop durchgeführt. Hierbei konnte gleichzeitig der definitive Nachweis von mNeonGreen in den UMOD-Reporter-Zellen und von mCherry in den NPHS2-Reporter-Zellen erbracht und somit die Funktionalität beider Reporter-Zelllinien bewiesen werden (Abb. 23, 24). Die Anwesenheit von tdTomato und damit der Guideplasmide in einem Anteil der Zellen wurde ebenfalls bestätigt. Dies zieht diverse Konsequenzen nach sich. Zum einen ist das in den Zellen verbleibende tdTomato-Signal ein potenzieller Störfaktor. Durch gezielte Auswahl der zur Anregung eingesetzten Wellenlänge am Konfokalmikroskop kann dies jedoch ausgeglichen und tdTomato von den anderen

Signalen in den Proben abgegrenzt werden (Abb. 24 E und F). Von Bedeutung ist des Weiteren das durch die Anwesenheit der Guideplasmide verlängerte Zeitfenster der Cas9-Aktivität. Dadurch könnte sich die Wahrscheinlichkeit von *off-target*-Effekten mit der Zeit erhöhen, was wiederum eine genomische Instabilität zur Folge hätte (Sledzinski et al. 2021, Zhang et al. 2015). Eine Lösung könnte die Durchflusszytometrie bieten. Hierdurch ließen sich die Zellen der Reporter-Zelllinien, die weiterhin tdTomato und damit das Guideplasmid enthalten, entfernen (Tung et al. 2004).

Auch wurde untersucht, ob die Expression von mCherry bzw. mNeonGreen und damit die Funktionalität der Reportersysteme von der Anwesenheit des Guideplasmids in den Zellen abhängig ist. Mithilfe der spektralen Analyse konnte festgestellt werden, dass die Expression von tdTomato und mCherry bzw. mNeonGreen nur in einigen Zellen gemeinsam auftritt (Abb. 24). Somit ist nicht von einem kausalen Zusammenhang zwischen Vorhandensein des Guideplasmids und der Expression der Reporterkonstrukte auszugehen.

6.2.3 Möglicher Funktionsverlust der Zielgene durch Expression als Fusionsprotein

Die Fluoreszenzsignale von mCherry und mNeonGreen wurden im Zytoplasma der Zellen detektiert (Abb. 23, 24). Die Produkte von NPHS2 und UMOD, Podozin bzw. Uromodulin, sind jedoch in der Zellmembran von Podozyten integriert bzw. an der Zellmembran der Tubuluszellen des dicken aufsteigendes Asts der Henle-Schleife verankert (Knaup und Wiesener 2019, Boute et al. 2000). Da die Fluorophore als Fusionsprotein mit ihrem jeweiligen Zielgen exprimiert werden, habe ich die Hypothese aufgestellt, dass diese fusionierte Expression die Integration in bzw. Verankerung an die Zellmembran hindert. Als Lösung habe ich eine zweite Klonierungsstrategie mit P2A-Sequenz zwischen Zielgen und Fluorophor entwickelt. P2A gehört zu den selbst-schneidenden 2A-Peptiden, deren Einbau die Translation in zwei separate Proteine erlaubt (Liu et al. 2017). Somit werden Podozin und mCherry bzw. Uromodulin und mNeonGreen als eine mRNA abgelesen, jedoch als zwei Proteine translatiert (Liu et al. 2017).

Ein weiterer möglicher Faktor könnte sein, dass die Kultur im Monolayerverband die Proteinfunktion negativ beeinflusst.

7 Schlussfolgerungen

Im Zuge dieser Arbeit ist es gelungen nach dem Protokoll von Przepiorski *et al.* (2018) humane renale Organoiden aus zwei iPSC-Linien erfolgreich zu differenzieren. Die universelle Anwendbarkeit des Protokolls musste angesichts von Zelllinien-spezifischen Unterschieden relativiert werden. Die generierten renalen Organoiden enthielten nachweislich proximale und distale Tubuli sowie Anteile der Henle-Schleife, Sammelrohre, potenzielle juvenile Glomeruli, stromale Zellen und im Falle der aus den BCRT5-Zellen differenzierten Organoiden auch endotheliale Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen eines einzelnen Protokolls unter Einsatz von lediglich CHIR99021 und KOSR als zentrale Faktoren möglich ist, die Entwicklung des metanephrischen Mesenchyms und der Ureterknospe zu induzieren. Dies verspricht eine enorme Vereinfachung und Ökonomisierung der Differenzierungsprotokolle renaler Organoiden.

Bestimmte Parameter, die Einfluss auf die Organoidendifferenzierung haben, wie der Durchmesser der EBs wurden diskutiert und Erkenntnissen anderer Publikationen gegenübergestellt. Die Entwicklung der renalen Organoiden *in vitro* scheint nicht immer dem Ablauf der Nephrogenese *in vivo* zu folgen. Nichtsdestotrotz zeigen humane renale Organoiden große morphologische und transkriptionelle Übereinstimmungen mit der menschlichen Niere. Dies bezeugt die einzigartige Eignung humaner renaler Organoiden als Forschungsmodell der Organo- und Pathogenese, für Toxizitätstestungen, Medikamentenentwicklung und für die Entwicklung neuer Gewebeersatzstrategien. Patientenspezifische renale Organoiden könnten auch die Problematik der Immunogenität beim Gewebeersatz durch Organtransplantation mindern.

Gleichzeitig gibt es noch diverse Limitationen und Herausforderungen. Hierzu gehören das Ausbleiben der weiteren Maturation der Organoiden (Przepiorski *et al.* 2022, Takasato *et al.* 2016), das Fehlen eines Immunsystems zur präziseren Nachahmung der Pathogenese (Liu *et al.* 2022, Przepiorski *et al.* 2022), die mangelnde Vaskularisierung, die Abwesenheit von Vorläuferzellen (Takasato *et al.* 2014, Taguchi und Nishinakamura 2017) und die umstrittene Reproduzierbarkeit der einzelnen Protokolle (Phipson *et al.* 2019). Humane renale Organoiden als neuartiges Forschungsmodell stellen somit keinen Ersatz, aber eine einzigartige Möglichkeit zur Ergänzung konventioneller Methoden dar. Sie bieten die Chance, *in vivo*-Vorgänge realistischer denn je *in vitro* nachzubilden und ermöglichen die Entwicklung einer

skalierbaren, patientenspezifischen und vielseitig anwendbaren Technologie (Liu et al. 2022). Das Vorantreiben unseres Verständnisses über die menschliche Niere und die Optimierung von Methoden, renales Gewebe *in vitro* zu generieren, könnte es ermöglichen, die global steigende Prävalenz der CKD zu kontern.

Durch Verknüpfung von NPHS2 mit dem Fluorophor mCherry und von UMOD mit mNeonGreen gelang es zwei Reporter-Zelllinien mit nierenspezifischen, krankheitsrelevanten Zielgenen zu generieren. Dies beweist die Funktionalität der klonierten Reporterkonstrukte und deren potenziellen Einsatz zur simplen morphologischen Darstellung und Charakterisierung von Zellen. Da die Expression als Fusionsprotein möglicherweise einen Funktionsverlust von Podozin bzw. Uromodulin nach sich zieht, wurde im Anschluss an die in dieser Arbeit aufgeführten Untersuchungen eine P2A-Sequenz zwischen Ziel- und Reporter gen integriert. Eine weitere Optimierung der Reporter-Zelllinien wäre unter Verwendung von Durchflusszytometrie möglich, um die Zellen, die noch Guideplasmide enthalten, zu entfernen. Eine gezielte Stimulation der Genexpression von NPHS2 bzw. UMOD durch CRISPR/Cas9 SAM zur Steigerung des Fluoreszenzsignals wurde ebenfalls erfolgreich getestet.

Beide Zielgene werden nachweislich bereits früh in der Entwicklung der renalen Organoide exprimiert. Vanslambrouck *et al.* (2019) konnten zeigen, dass iPSC-Reporterlinien zur Charakterisierung von renalen Organoiden dienen können. Bei erfolgreicher Modifikation der hiPSC mit meinen Reporterkonstrukten und anschließender Differenzierung in renale Organoide wäre somit eine nicht-invasive dreidimensionale morphologische Darstellung und Charakterisierung lebendiger humaner renaler Organoide *in vitro* in Echtzeit mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie möglich (Przepiorski et al. 2022). Dies würde die Möglichkeit bieten, die renale Organo- und Pathogenese, insbesondere bei Krankheiten, bei denen NPHS2 und UMOD von Relevanz sind, weiter zu erforschen.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Applied Biosystems, Hrsg. 2008. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR [Handbuch]. Waltham, Massachusetts, USA: Applied Biosystems.
- Asgari MR, Asghari F, Ghods AA, Ghorbani R, Hoshmand Motlagh N, Rahaei F. 2017. Incidence and severity of nausea and vomiting in a group of maintenance hemodialysis patients. *J Renal Inj Prev*, 6 (1):49-55.
- Blazquez C, Cook N, Micklem K, Harris AL, Gatter KC, Pezzella F. 2006. Phosphorylated KDR can be located in the nucleus of neoplastic cells. *Cell Res*, 16 (1):93-98.
- Borestrom C, Jonebring A, Guo J, Palmgren H, Cederblad L, Forslow A, Svensson A, Soderberg M, Reznichenko A, Nystrom J, Patrakka J, Hicks R, Maresca M, Valastro B, Collen A. 2018. A CRISP(e)R view on kidney organoids allows generation of an induced pluripotent stem cell-derived kidney model for drug discovery. *Kidney Int*, 94 (6):1099-1110.
- Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. 2000. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*, 24 (4):349-354.
- Chandrasekaran V, Carta G, da Costa Pereira D, Gupta R, Murphy C, Feifel E, Kern G, Lechner J, Cavallo AL, Gupta S, Caiment F, Kleinjans JCS, Gstraunthaler G, Jennings P, Wilmes A. 2021. Generation and characterization of iPSC-derived renal proximal tubule-like cells with extended stability. *Sci Rep*, 11 (1):11575.
- Chen B, Zou W, Xu H, Liang Y, Huang B. 2018. Efficient labeling and imaging of protein-coding genes in living cells using CRISPR-Tag. *Nat Commun*, 9 (1):5065.
- Clayton NP, Burwell A, Jensen H, Williams BF, Brown QD, Ovwigho P, Ramaiahgari S, Hermon T, Dixon D. 2018. Preparation of Three-dimensional (3-D) Human Liver (HepaRG) Cultures for Histochemical and Immunohistochemical Staining and Light Microscopic Evaluation. *Toxicol Pathol*, 46 (6):653-659.
- Combes AN, Zappia L, Er PX, Oshlack A, Little MH. 2019. Single-cell analysis reveals congruence between kidney organoids and human fetal kidney. *Genome Med*, 11 (1):3.
- Czerniecki SM, Cruz NM, Harder JL, Menon R, Annis J, Otto EA, Gulieva RE, Islas LV, Kim YK, Tran LM, Martins TJ, Pippin JW, Fu H, Kretzler M, Shankland SJ, Himmelfarb J, Moon RT, Paragas N, Freedman BS. 2018. High-Throughput Screening Enhances Kidney Organoid Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells and Enables Automated Multidimensional Phenotyping. *Cell Stem Cell*, 22 (6):929-940 e924.
- Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. 2010. Reporter Gene. In: Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities* Erste Aufl. Dordrecht: Springer Netherlands, 71-84.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation, Hrsg. 2022. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2021 [Bericht]. Nastätten: Lindner & Steffen GmbH.
- Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Kottgen A, Levey AS, Levin A. 2013. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*, 382 (9887):158-169.

- Edgar L, Pu T, Porter B, Aziz JM, La Pointe C, Asthana A, Orlando G. 2020. Regenerative medicine, organ bioengineering and transplantation. *Br J Surg*, 107 (7):793-800.
- Elsner A. 2004. Organspende: Mangel nicht beseitigt. *Dtsch Arztebl International*, 101 (40):2662-.
- Fetter J, Samsonov A, Zenser N, Zhang F, Zhang H, Malkov D. 2015. Endogenous gene tagging with fluorescent proteins. *Methods Mol Biol*, 1239:231-240.
- Forster IC, Hernando N, Biber J, Murer H. 2006. Proximal tubular handling of phosphate: A molecular perspective. *Kidney Int*, 70 (9):1548-1559.
- Ghassemi B, Jamalkhah M, Shokri G, Kehtari M, Soleimani M, Shamsara M, Kiani J. 2021. Improved efficiency of genome editing by constitutive expression of Cas9 endonuclease in genetically-modified mice. *3 Biotech*, 11 (2):56.
- Gupta N, Dilmen E, Morizane R. 2020. 3D kidney organoids for bench-to bedside translation. *J Mol Med (Berl)*.
- Hale LJ, Howden SE, Phipson B, Lonsdale A, Er PX, Ghobrial I, Hosawi S, Wilson S, Lawlor KT, Khan S, Oshlack A, Quinlan C, Lennon R, Little MH. 2018. 3D organoid-derived human glomeruli for personalised podocyte disease modelling and drug screening. *Nat Commun*, 9 (1):5167.
- Hara-Chikuma M, Verkman AS. 2006. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 17 (1):39-45.
- Hariharan K, Reinke P, Kurtz A. 2019. Generating Multiple Kidney Progenitors and Cell Types from Human Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol*, 1926:103-115.
- Homan KA, Gupta N, Kroll KT, Kolesky DB, Skylar-Scott M, Miyoshi T, Mau D, Valerius MT, Ferrante T, Bonventre JV, Lewis JA, Morizane R. 2019. Flow-enhanced vascularization and maturation of kidney organoids in vitro. *Nat Methods*, 16 (3):255-262.
- Howden SE, Vanslambrouck JM, Wilson SB, Tan KS, Little MH. 2019. Reporter-based fate mapping in human kidney organoids confirms nephron lineage relationships and reveals synchronous nephron formation. *EMBO Rep*, 20 (4).
- Hubert CG, Rivera M, Spangler LC, Wu Q, Mack SC, Prager BC, Couce M, McLendon RE, Sloan AE, Rich JN. 2016. A Three-Dimensional Organoid Culture System Derived from Human Glioblastomas Recapitulates the Hypoxic Gradients and Cancer Stem Cell Heterogeneity of Tumors Found In Vivo. *Cancer Res*, 76 (8):2465-2477.
- Humphreys BD. 2018. Mapping kidney cellular complexity. *Science*, 360 (6390):709-710.
- Inoue H, Nagata N, Kurokawa H, Yamanaka S. 2014. iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J*, 33 (5):409-417.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. 2013. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 382 (9888):260-272.
- Kain SR, Ganguly S. 2001. Overview of genetic reporter systems. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 9:Unit9 6.
- Kapalczynska M, Kolenda T, Przybyla W, Zajaczkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Blizniak R, Luczewski L, Lamperska K. 2018. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*, 14 (4):910-919.
- Knaup KX, Wiesener MS. 2019. Autosomal-dominante tubulointerstitielle Nierenerkrankungen (ADTKD). *Der Nephrologe*, 14 (2):112-119.

- Kolios G, Moodley Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85 (1):3-10.
- Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, Hsu PD, Habib N, Gootenberg JS, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 517 (7536):583-588.
- Kumar SV, Er PX, Lawlor KT, Motazedian A, Scurr M, Ghobrial I, Combes AN, Zappia L, Oshlack A, Stanley EG, Little MH. 2019. Kidney micro-organoids in suspension culture as a scalable source of human pluripotent stem cell-derived kidney cells. *Development*, 146 (5).
- Lambert TJ. 2019. FPbase: a community-editable fluorescent protein database. *Nat Methods*, 16 (4):277-278.
- Lancaster MA, Knoblich JA. 2014. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345 (6194):1247-1255.
- Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. 2020. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*, 5:1.
- Lichtman JW, Conchello JA. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*, 2 (12):910-919.
- Liu B, Saber A, Haisma HJ. 2019. CRISPR/Cas9: a powerful tool for identification of new targets for cancer treatment. *Drug Discov Today*, 24 (4):955-970.
- Liu M, Cardilla A, Ngeow J, Gong X, Xia Y. 2022. Studying Kidney Diseases Using Organoid Models. *Front Cell Dev Biol*, 10:845401.
- Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Qian L, Liu J. 2017. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep*, 7 (1):2193.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25 (4):402-408.
- Malecha O. 2019. Cis-Regulatory Significance of Intron 1 for Renin Transcription Regulation [Masterarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Miyoshi T, Hiratsuka K, Saiz EG, Morizane R. 2020. Kidney organoids in translational medicine: Disease modeling and regenerative medicine. *Dev Dyn*, 249 (1):34-45.
- Moes AD, van der Lubbe N, Zietse R, Loffing J, Hoorn EJ. 2014. The sodium chloride cotransporter SLC12A3: new roles in sodium, potassium, and blood pressure regulation. *Pflugers Arch*, 466 (1):107-118.
- Morizane R, Lam AQ, Freedman BS, Kishi S, Valerius MT, Bonventre JV. 2015. Nephron organoids derived from human pluripotent stem cells model kidney development and injury. *Nat Biotechnol*, 33 (11):1193-1200.
- Mrowka R, Kirchner S, Reuter S. 2018. How to switch on genes with CRISPR/Cas9? *Acta Physiol (Oxf)*, 224 (1):e13087.
- Mulisch M, Welsch U. 2015. *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19te Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Parreira KS, Debaix H, Cnops Y, Geffers L, Devuyst O. 2009. Expression patterns of the aquaporin gene family during renal development: influence of genetic variability. *Pflugers Arch*, 458 (4):745-759.
- Phipson B, Er PX, Combes AN, Forbes TA, Howden SE, Zappia L, Yen HJ, Lawlor KT, Hale LJ, Sun J, Wolvetang E, Takasato M, Oshlack A, Little MH. 2019. Evaluation of variability in human kidney organoids. *Nat Methods*, 16 (1):79-87.

- Prozialeck WC, Lamar PC, Appelt DM. 2004. Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC Physiol*, 4:10.
- Przepiorski A, Sander V, Tran T, Hollywood JA, Sorrenson B, Shih JH, Wolvetang EJ, McMahon AP, Holm TM, Davidson AJ. 2018. A Simple Bioreactor-Based Method to Generate Kidney Organoids from Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 11 (2):470-484.
- Przepiorski A, Vanichapol T, Espiritu EB, Crunk AE, Parasky E, McDaniels MD, Emler DR, Salisbury R, Happ CL, Verneti LA, MacDonald ML, Kellum JA, Kleyman TR, Baty CJ, Davidson AJ, Hukriede NA. 2022. Modeling oxidative injury response in human kidney organoids. *Stem Cell Res Ther*, 13 (1):76.
- Ren X, Yang Z, Xu J, Sun J, Mao D, Hu Y, Yang SJ, Qiao HH, Wang X, Hu Q, Deng P, Liu LP, Ji JY, Li JB, Ni JQ. 2014. Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. *Cell Rep*, 9 (3):1151-1162.
- Renz M. 2013. Fluorescence microscopy-a historical and technical perspective. *Cytometry A*, 83 (9):767-779.
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD. 2014. Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc*, 2014 (10):pdb top071795.
- Sasaki S, Hasegawa K, Higashi T, Suzuki Y, Sugano S, Yasuda Y, Sugimoto Y. 2016. A missense mutation in solute carrier family 12, member 1 (SLC12A1) causes hydrallantois in Japanese Black cattle. *BMC Genomics*, 17 (1):724.
- Schwinn MK, Steffen LS, Zimmerman K, Wood KV, Machleidt T. 2020. A Simple and Scalable Strategy for Analysis of Endogenous Protein Dynamics. *Sci Rep*, 10 (1):8953.
- Scolari F, Izzi C, Ghiggeri GM. 2015. Uromodulin: from monogenic to multifactorial diseases. *Nephrol Dial Transplant*, 30 (8):1250-1256.
- Semb H, Christofori G. 1998. The tumor-suppressor function of E-cadherin. *Am J Hum Genet*, 63 (6):1588-1593.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 22 (12):1567-1572.
- Shirzadeh E, Najafi M, Nazarzadeh M, Fazli G, Falanji F, Aldaghi LS, Rad A. 2018. Expression of Pluripotency Markers, SOX2 and OCT4, in Pterygium Development. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 28 (2):155-162.
- Sledzinski P, Dabrowska M, Nowaczyk M, Olejniczak M. 2021. Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. *Biotechnol Adv*, 49:107737.
- Sternecker JL, Reinhardt P, Schöler HR. 2014. Investigating human disease using stem cell models. *Nature Reviews Genetics*, 15 (9):625-639.
- Taguchi A, Nishinakamura R. 2017. Higher-Order Kidney Organogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 21 (6):730-746 e736.
- Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, Sharmin S, Ogawa M, Sasaki H, Nishinakamura R. 2014. Redefining the in vivo origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 14 (1):53-67.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4):663-676.

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131 (5):861-872.
- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Little MH. 2016. Generation of kidney organoids from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 11 (9):1681-1692.
- Takasato M, Er PX, Becroft M, Vanslambrouck JM, Stanley EG, Elefanty AG, Little MH. 2014. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney. *Nat Cell Biol*, 16 (1):118-126.
- Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, Parton RG, Wolvetang EJ, Roost MS, Chuva de Sousa Lopes SM, Little MH. 2015. Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 526 (7574):564-568.
- Torres AM, Dnyanmote AV, Bush KT, Wu W, Nigam SK. 2011. Deletion of multispecific organic anion transporter Oat1/Slc22a6 protects against mercury-induced kidney injury. *J Biol Chem*, 286 (30):26391-26395.
- Tung JW, Parks DR, Moore WA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*, 110 (3):277-283.
- van den Berg CW, Ritsma L, Avramut MC, Wiersma LE, van den Berg BM, Leuning DG, Liewers E, Koning M, Vanslambrouck JM, Koster AJ, Howden SE, Takasato M, Little MH, Rabelink TJ. 2018. Renal Subcapsular Transplantation of PSC-Derived Kidney Organoids Induces Neo-vasculogenesis and Significant Glomerular and Tubular Maturation In Vivo. *Stem Cell Reports*, 10 (3):751-765.
- Van Winkle AP, Gates ID, Kallos MS. 2012. Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. *Cells Tissues Organs*, 196 (1):34-47.
- Vanslambrouck JM, Wilson SB, Tan KS, Soo JY, Scurr M, Spijker HS, Starks LT, Neilson A, Cui X, Jain S, Little MH, Howden SE. 2019. A Toolbox to Characterize Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Kidney Cell Types and Organoids. *J Am Soc Nephrol*, 30 (10):1811-1823.
- Welsch U, Kummer W, Deller T. 2014. *Lehrbuch Histologie*. Vierte Aufl. München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Xiang X, Li C, Chen X, Dou H, Li Y, Zhang X, Luo Y. 2019. CRISPR/Cas9-Mediated Gene Tagging: A Step-by-Step Protocol. *Methods Mol Biol*, 1961:255-269.
- Zhang XH, Tee LY, Wang XG, Huang QS, Yang SH. 2015. Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, 4:e264.
- Zhuo L, Huang L, Yang Z, Li G, Wang L. 2019. A comprehensive analysis of NPHS1 gene mutations in patients with sporadic focal segmental glomerulosclerosis. *BMC Med Genet*, 20 (1):111.
- Zilles K, Tillmann BN. 2010. *Anatomie*. Erste Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag Berlin Heidelberg.

9 Anhang

9.1 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Tab. 13: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung

Gelbe Farbmarkierung: Schnittstellen der Restriktionsenzyme; grüne Farbmarkierung: Überhänge der Guidesequenzen für die Stimulation mit CRISPR/Cas9 SAM. qPCR-Primer, deren Sequenz von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Kurtz vom BCRT der Charité übermittelt wurden, sind blau unterlegt.

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3') |
|--|--|
| Guidesequenzen für das Tagging | |
| O_DIR_Podo_G1_F | cggcccatgttataggaaggatg |
| O_DIS_Podo_G1_R | aaaccatccttctataacatggg |
| O_DIT_Podo_G2_F | cggcccatccttctataacat |
| O_DIU_Podo_G2_R | aaacatgttataggaaggatggg |
| O_DKM_UMOD-G1_F | cgggtgcagtcactgaaaagtca |
| O_DKN_UMOD_G1_R | aaactgacttttcagtgactgaca |
| Primer zur Amplifikation der Homologie-Arme | |
| O_DII_Podi_LA_F_NotI | agctcgggccgctgctgccacatagtagatgctcag |
| O_DIH_Podi_LA_R_PacI | gtcattaataacatgggagagtcttcttttaggattagtggc |
| O_DIK_Podi_RA_F_AarI | acgtcacctgcgtgcttaacataatgtgactgtaaaggggctgc |
| O_DIL_Podi_RA_R_AscI | Agctggcgcgccggtgtgaggaattcagggtggagc |
| O_DKP_UMOD_LA_F_notI | Agctcgggccgcaggctggagtgcagtggtgaaatc |
| O_DKO_UMOD_LA_R_pacI | Gtcattaataactgaaaagtcagggtcaagggtggc |
| O_DKR_UMOD_RA_F_AarI | Acgtcacctgcgtgcttaagaaagccctgtgctccatggctg |
| O_DKS_UMOD_RA_R_AscI | Agctggcgcgcccacactcttaaggagatggggggcc |
| Primer zur Amplifikation des Fluorophorgens mCherry | |
| O_DIN_mCherry_F_pacI | Cagcgttaataacgtgagcaagggcgaggaggataac |
| O_DIO_mCherry_R_MluI | Gtcaacgcgtttactgtacagctcgtccatgccg |
| Nachweis der Genomeditierung | |
| Nachweis Podozin: | |
| O_DKL_genomic_Podocin_F | ctgtctcccagctcaagacccttcag |
| O_DMK_mCherry_R | gcggtctgggtgccctcgtag |

Nachweis Uromodulin:

O_DUT_ITR_F agctccaagcggcgactgagatgtc
O_DUU_UMOD_R gactgtgaactccatgaggacagtgtgg

Nachweis Fluorophorgene:

O_DIN_mCherry_F_pacl cagcgttaattaacgtgagcaagggcgaggaggataac
O_DEY_P2A_F ctgcttcagcaggctgaagtagtagc

Guidesequenzen für die Stimulation mit CRISPR/Cas9 SAM

O_DIP_NPHS2_G1_F Caccg ggggtggggctgagggcgag
O_DMM_NPHS2_G1_R Aaacctcgcctcagccccaccgc
O_DMN_NPHS2_G2_F Caccgcgggacaccggggccgcggg
O_DMO_NPHS2_G2_R Aaacccgcggccccgggtgtccgc
O_DMP_NPHS2_G3_F Caccgctgggtgggagagccggccc
O_DMR_NPHS2_G3_R Aaacggcggctctcccaccagc
O_DNH_Guide1_UMOD_F Caccgaacagtgacctgtatttc
O_DNI_Guide1_UMOD_R Aaacggaaatacaaggctactgttc
O_DNK_Guide2_UMOD_F Caccgcaggggtgggatcaaggagcc
O_DNL_Guide2_UMOD_R Aaacggctcctgatcccaccctgc
O_DNM_Guide3_UMOD_F Caccgtggggggtcacacctgtgcc
O_DNN_Guide3_UMOD_R Aaacggcacaggtgtgacccccac

qPCR-Primer

O_ALD_h_qTBP_fwd1 Ggcgtgtgaagataaccaagg
O_ALE_h_qTBP_rev1 Cgctggaactcgtctcact
O_ALH_h_qEMC7_fwd1 Tcctgacatgagacgggaaatg
O_ALI_h_qEMC7_rev1 Cgctgctagattgccagatg
O_DXY_KDR_qPCR_for Accggctgaagctaggttaag
O_DXZ_KDR_qPCR_rev Cgatgctcactgtgtgttc
O_DXW_NPHS1_qPCR_for Tcatgtgtacaaggactcgc
O_DXX_NPHS1_qPCR_rev Tcccagatttctccacgctg
O_DPY_NPHS2_F caaatcctccggcttagggg
O_DPZ_NPHS2_R Agcagatgtcccagtcggaa
O_DRV_AQP1_for Aagctcttctggagggag

| | |
|---------------------|--------------------------|
| O_DRW_AQP1_rev | Caccttcacgttgctcctggaccg |
| O_DSB_SLC22A6_for | Tctactcctgggttcatt |
| O_DSC_SLC22A6_rev | Cggagtacctccataactcaa |
| O_DSF_SLC34A1_for | Ctgggtcacaggctactttg |
| O_DSG_SLC34A1_rev | Gcctctcaatgctgatcac |
| O_DSH_SLC12A1_for | Tttggagctgttttgctg |
| O_DSI_SLC12A1_rev | Atgggtccccctgtaagac |
| O_DSK_UMOD_for | aagagtctgggcttcgacaa |
| O_DSL_UMOD_rev | Gctgtaagtggcatgggttt |
| O_DRZ_SLC12A3_for | Caccaagaggtttgaggacat |
| O_DSA_SLC12A3_rev | Gacagtggcctcatccttga |
| O_DYA_CDH1_qPCR_for | Gaggaccaggactttgactt |
| O_DYB_CDH1_qPCR_rev | Agataccgggggacactca |
| O_DRX_AQP3_for | Gacgctgggagccttctt |
| O_DRY_AQP3_rev | Gctgggtgtcggcgaag |
| O_DWV_qPCR_Oct4_F | Cctgaagcagaagaggatcacc |
| O_DWW_qPCR_Oct4_R | Aaagcggcagatggctgcttgg |

9.2 Ursprung der Mäusenieren

Tab. 14: Daten der durch die Arbeitsgruppe Morrison des FLI in Jena bereitgestellten Mäusenieren

| | Maus 1 | Maus 2 |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Identifizierungsnummer | MOR-018938 | MOR-018939 |
| Labor-Identifizierungsnummer | 153 | 154 |
| Lizenznummer | FLI-18-017 | FLI-18-017 |
| Geschlecht | männlich | männlich |
| Geburtsdatum | 05.02.2020 | 05.02.2020 |
| Sterbedatum | 08.06.2020 | 08.06.2020 |
| Sterbegrund | Experimentende | Experimentende |
| Methode | CO ₂ | CO ₂ |
| Durchführende Person | Dr. Michael Reuter | Dr. Michael Reuter |
| Linie | C.129S6(Cg)- Ccl11tm1Mer/J | C.129S6(Cg)- Ccl11tm1Mer/J |
| Hintergrund | 129S6/SvEvTac | 129S6/SvEvTac |
| Typ | Wildtyp | Wildtyp |

9.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abb. 1: Funktionen der Niere, angelehnt an Eckardt et al. (2013)..... | 12 |
| Abb. 2: Entwicklung der globalen Prävalenz der CKD für alle Geschlechter und Altersgruppen von 1990 bis 2019 | 13 |
| Abb. 3: Das Generieren humaner renaler Organoiden und deren Anwendungen, angelehnt an Lancaster und Knoblich (2014) | 15 |
| Abb. 4: Schema für die Differenzierung von hiPSC in renale Organoiden..... | 16 |
| Abb. 5: Lokalisation von Podozin (rot) und Uromodulin (grün) im Nephron | 18 |
| Abb. 6: Vereinfachtes Schema für die Planung der Reporterkonstrukte..... | 23 |
| Abb. 7: Gegenüberstellung des klassischen CRISPR/Cas9 Systems und des CRISPR/Cas9 SAM Komplexes zur gezielten Stimulation ausgewählter Gene | 32 |
| Abb. 8: Schema für die Differenzierung renaler Organoiden aus hiPSC basierend auf Przepiorski et al. (2018)..... | 40 |
| Abb. 9: Schematische Übersicht der in der qPCR untersuchten Marker-Gene der Niere | 43 |
| Abb. 10: Schematische Übersicht der Präparation der renalen Organoiden | 46 |
| Abb. 11: Schematische Übersicht der Immunfärbung | 49 |
| Abb. 12: Lichtmikroskopische Aufnahmen exemplarischer renaler Organoiden im Querschnitt nach zwei Wochen Kultivierung..... | 52 |
| Abb. 13: Lichtmikroskopische HE-Übersichtsaufnahmen exemplarischer renaler Organoiden im Querschnitt nach vier Wochen Kultivierung..... | 53 |
| Abb. 14: Immunfärbung von Podozin und Uromodulin in Mäusenierenschnitten..... | 55 |
| Abb. 15: Immunfärbung von Podozin und Uromodulin an Paraffinschnitten renaler Organoiden..... | 56 |
| Abb. 16: TEM-Aufnahmen renaler Organoiden aus IMR90-Zellen nach zwei Wochen Kultivierung..... | 57 |
| Abb. 17: TEM-Aufnahme eines renalen Organoids aus BCRT5-Zellen nach vier Wochen Kultivierung..... | 58 |
| Abb. 18: qPCR-Analyse aus IMR90-Zellen differenzierter renaler Organoiden nach zwei Wochen Kultivierung..... | 59 |
| Abb. 19: qPCR-Analyse aus BCRT5-Zellen differenzierter renaler Organoiden nach zwei Wochen Kultivierung..... | 60 |
| Abb. 20: qPCR-Analyse renaler Organoiden nach vier Wochen Kultivierung..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Abb. 21: qPCR-Analyse der relativen Expressionslevel der Zielgene in der NPHS2- und UMOD-Reporter-Zelllinie ohne und mit Stimulation..... | 63 |
| Abb. 22: Beispielhafter Ausschnitt einer Negativkontrolle..... | 64 |
| Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der UMOD-Reporter-Zelllinie..... | 65 |
| Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der NPHS2-Reporter-Zelllinie..... | 66 |

Abb. 1, 3, 5, 6, 7 und 9 wurden mit BioRender.com generiert.

9.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tab. 1: Komponenten für die PCR..... | 24 |
| Tab. 2: Protokoll der PCR..... | 24 |
| Tab. 3: Komponenten für die enzymatische Spaltung | 25 |
| Tab. 4: Komponenten für die Ligation mit T4 DNA Ligase..... | 26 |
| Tab. 5: Komponenten für die Überprüfung der Plasmide mithilfe enzymatischer Spaltung | 27 |
| Tab. 6: Komponenten für die Dephosphorylierung | 28 |
| Tab. 7: Protokoll der qPCR..... | 35 |
| Tab. 8: Zusammensetzung des Mediums für Tag 0 bis 3 des Protokolls (Stadium I-Medium)..... | 41 |
| Tab. 9: Zusammensetzung des Stadium II-Mediums..... | 42 |
| Tab. 10: Ablauf der manuellen Entwässerung | 47 |
| Tab. 11: Ablauf des Entparaffinierens | 47 |
| Tab. 12: Protokoll für die HE-Färbung der Paraffinschnitte | 48 |
| Tab. 13: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung..... | 87 |
| Tab. 14: Daten der durch die Arbeitsgruppe Morrison des FLI in Jena bereitgestellten Mäusenieren..... | 89 |

9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

mir die geltende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten oder eigener Prüfungsarbeiten ohne Kennzeichnung übernommen und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben habe,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Ralf Mrowka, Dr. Stefanie Reuter, Isabel Auge, Dr. Sandor Nietzsche, Dr. Jan Richter, Lisa Wirker,

die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,

eine gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation nicht eingereicht wurde.

Ballenstedt, 22.05.2023

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

9.6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Mrowka für die Chance bedanken, in der Arbeitsgruppe Experimentelle Nephrologie der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Jena meine Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für die großartige Betreuung, für Ihre Geduld, Ihre Motivation und die vielen Anregungen!

Mein Dank gilt auch den übrigen Mitarbeitern der AG, vor allem Dr. Stefanie Reuter, Isabel Auge und Silke Nossmann für ihre unermüdliche Unterstützung. Ohne euch wäre dies nicht möglich gewesen. Aber auch Dr. Kathrin Groeneveld, Anne Schön, Olha Malecha, Talitha Feuerhake und allen anderen aus dem Team – vielen Dank nicht nur für euer fachliches Wissen, sondern auch für den Spaß an der Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Andreas Kurtz, Dr. Krithika Hariharan und bei Benjamin Kurtze vom BCRT der Charité für die Unterstützung bei der Etablierung des Protokolls für die Differenzierung der humanen renalen Organoide und für alle weiteren Hinweise.

Für fachlichen Rat und für das Anfertigen und Färben unzähliger histologischer Präparate geht mein Dank an Dr. Jan Richter und Lisa Wirker aus der Anatomie II des Universitätsklinikums Jena, sowie an alle anderen Mitarbeiter der AG.

Die elektronenmikroskopischen Präparate wurden angefertigt durch die Mitarbeiter des Elektronenmikroskopischen Zentrums am Universitätsklinikum Jena. Besonderer Dank gilt Dr. Sandor Nietzsche für die geduldige Auswertung der Präparate sowie für das Erstellen der Aufnahmen.

Auch bedanke ich mich bei Dr. Michael Reuter für das bereitwillige und rasche Bereitstellen der Mäusenieren.

Ein Großteil meiner praktischen Tätigkeit wurde durch das Promotionsstipendium des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) finanziert. Für diese Unterstützung sowie für die wissenschaftlichen Beiträge und das Schaffen einer Gemeinschaft zwischen uns Doktoranden bedanke ich mich herzlichst bei allen Mitgliedern und Mitarbeitern des IZKFs und des IZKF-Graduierten-Programmes, insbesondere bei Prof. Dr. Otto Witte, Prof. Dr. Regine Heller, Frau Simone Möhring-Moldenhauer und Frau Anne Knierim.

Der letzte - aber nicht geringste - Dank gilt meinen Freunden und meiner Familie. Anna, ohne dich wäre ich nicht dort, wo ich heute bin.