

Theresa Leonie Fluhr

Dr. med.

Entwicklung eines patientenspezifischen Krankheitsmodells der autosomal-rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD) mittels induzierter pluripotenter Stammzellen

Fach/Einrichtung: Kinderheilkunde

Doktorvater: Prof. Dr. med. Franz Schaefer

Inhalt dieser Dissertation ist die Entwicklung von zwei neuen induzierten pluripotenten Stammzelllinien sowie die Generierung patientenspezifischer Nierenorganoide als Krankheitsmodell der autosomal rezessiven polyzystischen Nierenerkrankung (ARPKD). Grundlage für die Entwicklung der patientenspezifischen induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) bildeten periphere Blutzellen von zwei Patientinnen des Zentrums für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Heidelberg.

Die Reprogrammierung der iPSCs erfolgte mit Hilfe eines Sendai-Virus Vektors. Bei der Zelllinie Neph001 liegt eine compound-heterozygote (c.6331A>G; c.7717C>T), bei der Zelllinie Neph005 eine homozygote (c.8285A>T) Mutation im PKHD1-Gen vor.

Bei Klon Neph001 D sowie den Klonen Neph005 A und B gelang eine vollständige iPSC-Charakterisierung. Diese umfasst den qualitativen und quantitativen Nachweis von Pluripotenzenmarkern, den Nachweis des Differenzierungspotentials in Zellen aller drei Keimblätter, den Ausschluss chromosomaler Aberrationen sowie einer Integration von viralen Reprogrammierungsvektoren in das Wirtsgenom, den Nachweis der Patientenspezifität sowie einen Mutationsnachweis im PKHD1-Gen von iPSCs und Patientenzellen. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Klone Neph001 D und Neph005 B wurden im Stem Cell Research Journal publiziert. Beide Stammzelllinien sind beim Human Pluripotent Stem Cell Registry registriert. Die neu etablierten ARPKD-iPSCs wurden im Anschluss zur Generierung patientenspezifischer Nierenorganoide verwendet. Für die Organoidentstehung wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche experimentelle Ansätze gewählt und miteinander verglichen.

Dem ersten Ansatz liegt ein Protokoll von Takasato et. al mit Modifikationen nach Howden et al. und Uchimura et. al zugrunde. Organoide entstehen hierbei in einer sogenannten Air Liquid Interface Kultur, bei der die Oberfläche der Organoide der Luft ausgesetzt ist, während die Unterseite über einen Filter mit dem Zellkulturmedium und den darin gelösten Wachstumsfaktoren in Verbindung steht.

Im zweiten Ansatz wurden Organoide unter Anwendung des STEMdiff™ Kidney Organoid Kits (Stemcell Technologies) gezüchtet, welches auf einem Protokoll von Freedman et al. basiert. Organoide entwickeln sich in diesem Fall eingebettet in eine feste extrazelluläre Matrix über die Zwischenstufe sogenannter kavierter Sphäroide.

Mit beiden Protokollen gelang die Generierung patientenspezifischer Nierenorganoide beider Stammzelllinien mit Nachweis renaler Strukturen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Bei Organoiden der iPSC-Linien Neph001 D, Neph005 A und Neph005 B sowie einer Wildtypkontrolle ließen sich unabhängig vom verwendeten Protokoll Podozyten sowie proximale und distale Tubulusepithelzellen nachweisen. Organoide nach Takasato et. al exprimierten zudem eine Basallamina, Organoide des STEMdiff™ Kidney Organoid Kits Endothelzellen. Um den klinischen Phänotyp der ARPKD nachzustellen, wurden die Organoide unter Verwendung des Adenylatcyclase-Induktors Forskolin nach Vorbild einer Publikation von Low et. al zur Zystogenese angeregt. Während sich in den Patienten-Organoiden unter Forskolinbehandlung Zysten in den proximalen und distalen Tubuli entwickelten, blieb die Zystenbildung bei Wildtyp-Organoiden nahezu vollständig aus.

Die im Rahmen dieser Dissertation generierten Nierenorganoide stellen ein patienten- und spezies-spezifisches Krankheitsmodell der ARPKD dar. Langfristig sollen sie im Rahmen von Hochdurchsatz-Medikamentenscreenings der Entwicklung zystenmodifizierender Substanzen dienen.

Neben den Ergebnissen der iPSC-Charakterisierung, Organoidgenese und Zysteninduktion werden in dieser Arbeit die vielen neuen und bahnbrechenden Möglichkeiten der Organoid-Forschung aufgezeigt und Limitationen identifiziert, die es in Zukunft zu adressieren und überwinden gilt.