

Aus der Klinik für Nephrologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Lars-Christian Rump

Akkumulation von Uromodulin P236L im ER verhindert  
die Positionierung des Harnsäuretransporters GLUT9 in  
der Plasmamembran

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Clara Gertrud Thea Porwoll

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. med. Lorenz Sellin

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Meinen Eltern

## Zusammenfassung

Die Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung (ADTKD) ausgelöst durch Mutationen im Uromodulin-Gen (*UMOD*) ist eine meist über mehrere Jahrzehnte progrediente Nierenerkrankung. Sie manifestiert sich oft im frühen Kindesalter durch Gichtattacken, welche durch einen erhöhten Serumharnsäurespiegel verursacht werden. Im Verlauf der Erkrankung kann es zur Entstehung von Nierenzysten, langstreckigen nicht-sklerotischen Nierenarterienstenosen und einer tubulointerstitiellen Nephritis kommen. Diese führt zur Nierenfibrose und durchschnittlich zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr zum terminalen Nierenversagen (*End Stage Renal Disease* = ESRD). Eine kausale Behandlungsmöglichkeit besteht nicht. Symptomatisch kann die Hyperurikämie mit Urikosurika oder Urikostatika wie Allopurinol behandelt werden. Diese Therapie verhindert jedoch nicht die Krankheitsprogression, sodass bei Eintreten des Nierenversagens Nierenersatzverfahren eingesetzt werden. Mittlerweile konnte der Pathomechanismus, der zur Entstehung von ADTKD-*UMOD* führt, weiter entschlüsselt werden. Wie genau es jedoch zum Auftreten der Hyperurikämie kommt, ist bisher ungeklärt. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass Umod P236L zu einem großen Teil im Endoplasmatischen Retikulum (ER) retiniert wird und dort akkumuliert. Durch fehlgefaltete Proteine und deren subzelluläre Akkumulation wird vermutlich eine *Unfolded Protein Response* (UPR) ausgelöst, ein zellulärer Mechanismus, der diese zu eliminieren versucht. Gelingt dies nicht und dauert diese Zellreaktion an, werden über verschiedene Mechanismen und Signalwege inflammatorische Prozesse ausgelöst. Diese resultieren letztendlich vermutlich in einer interstitiellen Inflammation und Nierenfibrose und könnten den progredienten Krankheitsverlauf erklären.

Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass der Harnsäuretransporter Glucosetransporter 9 (GLUT9) in Anwesenheit von Umod P236L ebenfalls subzellulär im ER akkumuliert und dort retiniert wird. Er gelangt in geringerer Menge an die Plasmamembran als in Anwesenheit von Wildtyp-(WT) Umod. Durch den verminderten Einbau von GLUT9 in die Plasmamembran kommt es vermutlich zu einer geringeren Exkretion von Harnsäure ins Tubuluslumen. Dies könnte die Hyperurikämie und das Auftreten von Gichtattacken bei Patienten, die an ADTKD-*UMOD* leiden, erklären.

## **Abstract**

*Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease (ADTKD), caused by mutations in the Uromodulin gene (UMOD), is a progressive kidney disease that proceeds for several decades. Patients often suffer from gout attacks early on in their childhood due to an elevated serum uric acid level. As the disease progresses kidney cysts, non-sclerotic small caliber renal arteries and tubulointerstitial nephritis may develop. This leads to renal fibrosis and may result in end-stage renal disease (ESRD) at the average age of 40 to 50. Up until now there is no known cure for the disease. The hyperuricemia can be treated symptomatically with uricosuric or uricostatic drugs such as Allopurinol. However, these drugs do not prevent disease progression so that kidney replacement therapy is necessary once end-stage renal disease is reached. At present the pathological mechanisms leading to ADTKD-UMOD have been incompletely investigated and only partially solved. The cause for hyperuricemia still remains unknown. In our investigations we were able to show that trafficking of mutated Umod P236L to the plasma membrane is hampered and leads to retention and accumulation in the endoplasmic reticulum (ER). Misfolded proteins and their subcellular retention trigger the Unfolded Protein Response (UPR). This cellular mechanism acts to eliminate these misfolded proteins. If elimination and degradation fail cellular reaction continues and inflammatory responses are initiated through several signaling pathways and mechanisms. These may result in tubulointerstitial nephritis and renal fibrosis and might be responsible for disease progression.*

*Furthermore, we were able to show that in the presence of Umod P236L uric acid transporter glucose transporter 9 (GLUT9) also accumulates and is retained within the ER, whereas in the presence of wildtype (WT) Umod trafficking to the plasma membrane does occur. Due to the decreased insertion in the plasma membrane of GLUT9 in the presence of the Umod P236L mutation, excretion of uric acid to the tubular lumen may be decreased. This might explain the elevated serum uric acid levels and gout attacks in patients suffering from ADTKD-UMOD.*

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Beschreibung</b>
°C	Grad Celsius
a	Jahre
a.d.	aqua destillata
Abb.	Abbildung
<b>ABCG2</b>	ATP-Bindungskassette Superfamilie G-Mitglied 2
<b>ADTKD</b>	<i>Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease</i> = Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>ATCC</b>	<i>American Tissue Culture Collection</i>
<b>ATF6</b>	<i>activating transcription factor 6</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>BiP</b>	<i>binding protein</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Calciumchlorid
<b>CIP</b>	<i>Alkaline Calf Intestine Phosphatase</i>
cm	Zentimeter
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>cos7</b>	<i>CV-1 of Origin, carrying SV40</i>
<b>Cy</b>	Cyanin
<b>DAPI</b>	Diamedin-2-phenylindol
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>ECL</b>	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EEA1</b>	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ESRD</b>	<i>End Stage Renal Disease</i> = terminales Nierenversagen
<b>Fc</b>	<i>Fragment crystallisable</i>
<b>FCS</b>	<i>Fetal Calf Serum</i>
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanat

<b>FJHN</b>	<i>Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy</i> = Familiäre Juvenile Hyperurikämische Nephropathie
<b>g</b>	Gramm
<b>g</b>	G-Zahl
<b>g/l</b>	Gramm/Liter
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>GLUT9</b>	Glucosetransporter 9
<b>GRP78</b>	<i>78 kDa glucose-regulated protein</i>
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HCl</b>	Chlorwasserstoffsäure
<b>HcRed</b>	<i>Heteractis crispa</i> Red
<b>HEBS</b>	<i>Hepes Buffered Saline Solution</i>
<b>HEK</b>	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
<b>HNF1B</b>	<i>hepatocyte nuclear factor 1 β</i> -Gen
<b>HPLC</b>	<i>High performance liquid chromatography</i>
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IRE1</b>	<i>Inositol requiring enzyme 1</i>
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>KDIGO</b>	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcome</i>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>LB</b>	<i>Lysogeny broth</i>
<b>M</b>	Mol/Liter
<b>m<sup>2</sup></b>	Quadratmeter
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MCKD</b>	<i>Medullary Cystic Kidney Disease</i> = Medulläre Zystische Nierenerkrankung
<b>MDCK-CII</b>	<i>Madin Darby Canine Kidney Cells</i>
<b>mg</b>	Milligramm
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar

<b>ms</b>	Millisekunden
<b>MUC</b>	Mucin-1-Gen
<b>mV</b>	Millivolt
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	di-Natriumhydrogenphosphat
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O</b>	di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaOH</b>	Natriumhydroxid
<b>NaPO<sub>4</sub></b>	Natriumphosphat
<b>NF-kB</b>	<i>nuclear factor „kappa light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
<b>NRF1</b>	<i>Nuclear respiratory factor 1</i>
<b>OAT4</b>	Organischer Anionentransporter 4
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PDGF A-chain</b>	<i>platelet derived growth factor A-chain</i>
<b>PERK</b>	<i>double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>REN</b>	Renin-Gen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROMK</b>	<i>Renal Outer Medullary Potassium Channel</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
<b>t</b>	Zeit
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TAL</b>	<i>Thick Ascending Limb</i> = dicker aufsteigender Ast der Henle-Schleife
<b>Temed</b>	Tetramethylethylenediamine
<b>THP</b>	Tamm-Horsfall-Protein = Umod
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U</b>	<i>Units</i>
<b>U/ml</b>	<i>Units/Milliliter</i>
<b>UAKD</b>	<i>Uromodulin Associated Kidney Disease</i> = Uromodulin-Assoziierte Nierenerkrankung
<b>Umod</b>	Uromodulin = THP
<b>UMOD</b>	Umod-Gen
<b>Uox</b>	Uratoxidase

<b>URAT1</b>	Urat-Austauscher 1
<b>WGA</b>	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µg/ml</b>	Mikrogramm/Milliliter
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	I
<i>Abstract</i> .....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis .....	IX
Tabellenverzeichnis .....	X
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Chronische Nierenerkrankung .....	1
1.2 Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung .....	2
1.2.1 Klinische Charakteristika.....	3
1.3 Mutation P236R im <i>UMOD</i> -Gen.....	5
1.4 Uromodulin.....	7
1.4.1 Struktureller Aufbau und Reifungsprozess von Umod.....	8
1.4.2 Proteinbiosynthese von mutiertem Umod .....	10
1.5 Hyperurikämie als zentrales Symptom der ADTKD .....	11
1.5.1 Die Rolle von GLUT9 in der Harnsäureexkretion.....	12
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	13
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1 Material .....	15
2.1.1 Geräte und Software .....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien .....	16
2.1.4 Spezielle Materialien.....	17
2.1.5 Herstellung rekombinanter DNA .....	18
2.1.6 Antikörper.....	19
2.1.7 Lösungen und Puffer.....	20
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Zellkultur.....	22
2.2.2 Retrovirale Transduktion .....	25
2.2.3 Immunfluoreszenz.....	26
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie .....	29
2.2.5 Bildbearbeitung und statistische Auswertung .....	30
2.2.6 Subklonierung und Vervielfältigung von Plasmid DNA .....	30
2.2.7 DNA-Gelelektrophorese .....	33

2.2.8	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1	MDCK II-Zellen - Duale Färbungen.....	36
3.1.1	Endoplasmatisches Retikulum .....	36
3.1.2	Golgi-Apparat.....	37
3.1.3	Endosomen .....	38
3.1.4	Plasmamembran .....	39
3.2	Cos7-Zellen.....	41
3.2.1	Duale Färbungen .....	42
3.2.2	<i>Triple</i> -Färbung.....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>53</b>
4.1	Umod WT lokalisiert an der Plasmamembran während Umod P236L im ER akkumuliert.....	53
4.1.1	Kolokalisation im Tiermodell .....	54
4.1.2	Mutiertes Umod gelangt teilweise an die Plasmamembran .....	55
4.2	Akkumulation von mutiertem Umod löst ER-Stress aus .....	56
4.3	Umod ist für die Positionierung von GLUT9 in der Plasmamembran verantwortlich .....	57
4.3.1	Abwesenheit von GLUT9 führt zu verminderter Harnsäureexkretion.....	58
4.3.2	Hyperurikämie als Risikofaktor für Niereninsuffizienz .....	58
4.4	Limitationen der Arbeit .....	60
4.4.1	Lokalisation von Umod in MDCK II-Zellen .....	60
4.4.2	Harnsäureexkretion <i>in vitro</i> und im Tiermodell.....	60
4.5	Ausblick.....	61
4.6	Schlussfolgerung.....	62
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>73</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der ADTKD- <i>UMOD</i> .....	5
Abb. 2: Stammbaum deutsch-polnischer Familie mit Umod-Mutation P236R.....	7
Abb. 3: Aufbau von Umod.....	9
Abb. 4: Modell der Uromodulinreifung, -exkretion und -polymerisation.....	10
Abb. 5: Subzelluläre Fraktionierung von Umod- und GLUT9- exprimierenden Zellen .....	14
Abb. 6: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung des ER.....	37
Abb. 7: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung des Golgi-Apparates .....	38
Abb. 8: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Endosomen.....	39
Abb. 9: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Plasmamembran .....	40
Abb. 10: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt .....	40
Abb. 11: Quantitative Auswertung Umod WT oder Umod P236L exprimierender cos7-Zellen.....	42
Abb. 12: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung des ER.....	43
Abb. 13: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung des Golgi-Apparates.....	44
Abb. 14: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Endosomen.....	45
Abb. 15: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Plasmamembran .....	46
Abb. 16: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt. ....	46
Abb. 17: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, <i>Triple</i> -Färbung mit Färbung des ER .....	48
Abb. 18: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, <i>Triple</i> -Färbung mit Färbung der Endosomen .....	49
Abb. 19: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, <i>Triple</i> -Färbung mit Färbung der Endosomen, vergrößerter Zellausschnitt .....	49
Abb. 20: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, <i>Triple</i> -Färbung mit Färbung der Plasmamembran .....	50
Abb. 21: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, <i>Triple</i> -Färbung mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt .....	51
Abb. 22: Konfokale Mikroskopie von WT-, C126R-, und C223R-Umod-exprimierenden HeLa-Zellen.....	54

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CKD und Risiko für Nierenversagen.....	1
Tabelle 2: Geräte und Software .....	15
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien.....	17
Tabelle 5: Zellkultur .....	18
Tabelle 6: Plasmide.....	18
Tabelle 7: Antibiotika und Bakterien.....	18
Tabelle 8: Enzyme und Puffer .....	19
Tabelle 9: Marker .....	19
Tabelle 10: Antikörper.....	20
Tabelle 11: Lösungen und Puffer.....	22

# 1 Einleitung

## 1.1 Chronische Nierenerkrankung

Als chronische Nierenerkrankung (*Chronic Kidney Disease* = CKD) bezeichnet man nach den Leitlinien der *Kidney Disease: Improving Global Outcome* (KDIGO) eine funktionelle oder strukturelle Nierenstörung mit gesundheitlichen Auswirkungen über einen Zeitraum > 3 Monate. Zu den Diagnosekriterien zählen Anomalien im Urinsediment, in histologischen Untersuchungen oder bildgebenden Verfahren sowie eine Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Sie umfasst 5 verschiedene Stadien (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2013). Als wichtigster Prognosefaktor dient der Wert der Albuminurie, mit dessen Hilfe die Einteilung erweitert wird. Einen Überblick mit dem daraus entstehenden Risiko für die Entwicklung einer CKD und eines Nierenversagens gibt folgende Tabelle.

			Persistierende Albuminurie		
			A1	A2	A3
			Normal bis leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
Stadien	Bezeichnung	GFR ml/min/1,73 m <sup>2</sup>	< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30mg/mmol
<b>G1</b>	Normal oder erhöht	> 90			
<b>G2</b>	Leicht reduziert	60-89			
<b>G3a</b>	Leicht bis moderat reduziert	45-59			
<b>G3b</b>	Moderat bis stark reduziert	30-44			
<b>G4</b>	Stark reduziert	15-29			
<b>G5</b>	Nierenversagen	< 15			

**Tabelle 1: Stadieneinteilung der CKD und Risiko für Nierenversagen**

Grün: geringes Risiko (keine CKD, solange keine Nierenerkrankung vorliegt). Gelb: moderat erhöhtes Risiko. Orange: hohes Risiko. Rot: stark erhöhtes Risiko. (modifiziert nach: Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013) (ml=Milliliter, min=Minute, m<sup>2</sup>=Quadratmeter Körperoberfläche, mg=Milligramm, mmol=Millimol)

Die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankung weltweit liegt zwischen 8-16% (Jha et al., 2013, Eckardt et al., 2013), in Deutschland bei rund 2,3% (Girndt et al., 2016). Ende des Jahres 2018 waren in Deutschland etwa 75.000 Patienten dialysepflichtig (Gemeinsamer Bundesausschuss, 2019). Gegen Ende des Jahres 2018 befanden sich 7526 Patienten auf der Warteliste für eine Nierentransplantation (Deutsche Stiftung für Organspende, 2018). Damit stellt die CKD durch steigende Inzidenz und Prävalenz ein globales Problem mit steigenden Kosten für das Gesundheitssystem dar (Eknoyan et al., 2004). Zu den Ursachen der CKD zählen neben den am häufigsten sekundären Nierenerkrankungen wie der hypertensiven und diabetischen Nephropathie auch primär renale angeborene oder erworbene Funktionsstörungen. Da die Niere das zentrale Organ des Wasser-, Elektrolyt- und Säuren-Basen-Haushaltes darstellt, kommt es bei Nierenschädigung zu Störungen sowohl der exkretorischen als auch der inkretorischen Funktionen. Häufig stellt sich eine chronische Nierenerkrankung als Zufallsbefund dar, da eine leichte Funktionsstörung oft keine oder nur eine milde Symptomatik hervorruft. Eine Progression der Erkrankung zeigt sich im Ausfall der vielfältigen renalen Funktionen, die mit Hypertonie, Anämie, Elektrolytstörungen, Hypervolämie, metabolischer Azidose, Störungen im Vitamin- und Hormonhaushalt und einer gestörten Immunkompetenz einhergehen können. Auch das kardiovaskuläre Risiko zeigt sich dadurch erhöht (Gansevoort et al., 2013). Durch die verminderte Eliminationsfunktion der Niere kommt es zur Akkumulation harnpflichtiger Substanzen, die im Vollbild der Urämie resultieren können. Der Therapie einer chronischen Nierenerkrankung liegt oft ein multimodales Konzept zugrunde, und sie gestaltet sich häufig als komplex. Einen großen Stellenwert besitzen daher prophylaktische und progressionshemmende Maßnahmen. Lässt sich ein Voranschreiten der Erkrankung nicht aufhalten, stehen Nierenersatzverfahren zur Verfügung. Diesen Behandlungsmethoden ist die Nierentransplantation als Ultima Ratio jedoch überlegen (Kuhlmann et al., 2015, Herold, 2019, Classen/Diehl/Kochsiek, 2009).

## **1.2 Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung**

Zu den primären genetisch bedingten Nierenerkrankungen gehört unter anderem die „Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung“ (*Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease* = ADTKD) (Eckardt et al., 2015). Unter diesem

Begriff werden etliche Krankheitsbilder zusammengefasst, die durch verschiedene genetische Mutationen verursacht werden. Es umfasst die Genmutationen, die für *Uromodulin (UMOD)*, für *mucin-1 (MUC)*, *renin (REN)* und *hepatocyte nuclear factor 1  $\beta$  (HNF1B)* kodieren (Lindner et al., 1999, Zivna et al., 2009, Eckardt et al., 2015). ADTKD, verursacht durch Mutationen im *UMOD*-Gen (*ADTKD-UMOD*), stellt dabei mit einer Prävalenz von 9 aus 1 Million die häufigste genetische Nierenerkrankung nach dem Krankheitsbild der „Autosomal Dominanten Polyzystischen Nierenerkrankung“ dar (Gast et al., 2018).

Mutationen im *UMOD*-Gen beispielsweise sind für die Krankheitsbilder der „Medullären Zystischen Nierenerkrankung Typ 2“ (*Medullary Cystic Kidney Disease type 2 = MCKD type 2*), der „Familiären Juvenilen Hyperurikämischen Nephropathie“ (*Familial Juvenile Hyperuricemic Nephropathy = FJHN*) und der „Uromodulin-Assoziierten Nierenerkrankung“ (*Uromodulin-Associated Kidney Disease = UAKD*) verantwortlich (Hart, 2002, Wolf et al., 2003, Dahan et al., 2001, Bleyer et al., 2017). Bisher sind über 100 verschiedene Mutationen bekannt, die *ADTKD-UMOD* verursachen. Das Krankheitsbild der MCKD Typ 1 wird durch Mutationen im *MUC1*-Gen ausgelöst (Kirby et al., 2013).

Da sich zeigte, dass das Auftreten von Nierenzysten nicht pathognomonisch für die Erkrankungen ist, stellte sich die Fachterminologie teilweise als irreführend dar. Dieser Umstand und der Mangel einheitlicher Diagnosekriterien erschwerten die Diagnosestellung und Erforschung der Krankheitsbilder. Aufgrund dessen wurde eine Empfehlung der KDIGO ausgesprochen, diese Krankheitsbilder unter dem Namen „Autosomal Dominante Tubulointerstitielle Nierenerkrankung“ zusammenzufassen (Eckardt et al., 2015).

### **1.2.1 Klinische Charakteristika**

Aufgrund des autosomal dominanten Vererbungsmodus weisen Patienten mit ADTKD häufig eine positive Familienanamnese auf. Oftmals werden jedoch nicht alle betroffenen Familienmitglieder mit dieser Erkrankung diagnostiziert, sei es aufgrund eines frühen Versterbens oder einer unterschiedlichen Krankheitsmanifestation und -progression (Eckardt et al., 2015). ADTKD zeigt sich als sehr heterogenes Krankheitsbild, eine Genotyp-Phänotyp-Assoziation besteht nicht. Auch innerhalb einer Familie, bei der die Familienmitglieder dieselbe genetische Mutation aufweisen,

kann sich der Krankheitsverlauf sehr variabel gestalten. Vermutlich spielen dabei Umweltfaktoren und *modifier genes* eine Rolle (Bollee et al., 2011).

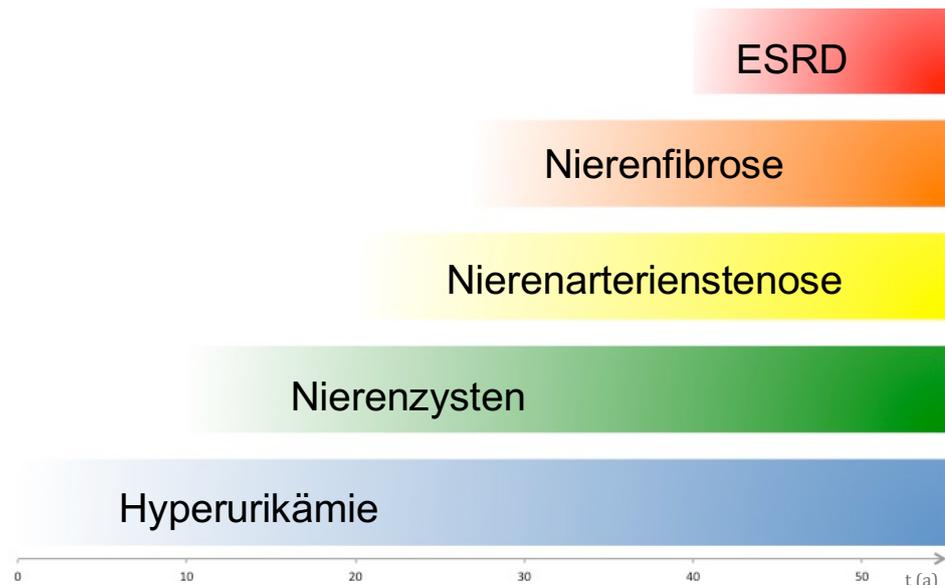
Typischerweise kommt es bereits im Kindesalter zum Auftreten einer Hyperurikämie, die jedoch bei fehlendem Auftreten von Gichtattacken inapparent verläuft (Eckardt et al., 2015). Die Ursache der Hyperurikämie ist noch ungeklärt, und ihre Aufklärung ist Ziel dieser Arbeit. Patienten weisen darüber hinaus eine verminderte Fähigkeit zur Harnkonzentration auf, die mit Polyurie und Polydipsie einhergehen kann (Dahan et al., 2003).

In Abbildung 1 wird der Krankheitsverlauf über die Jahre gezeigt. Es kann zur Entstehung von Nierenzysten kommen, welche sich häufig als Zufallsbefund in der Nierensonographie zeigen (Bollee et al., 2011). Eine mögliche Erklärung für das Entstehen dieser Zysten ist das Auftreten von Umod im Bereich primärer Zilien des Tubulussystems (Zaucke et al., 2010). In Nierenbiopsien von Patienten mit Umod-Mutationen ließen sich eine geringere Anzahl primärer Zilien im Tubulussystem nachweisen als im Vergleich zur Kontrollgruppe. Mit Hilfe von Immunfluoreszenz und Elektronenmikroskopie zeigte sich eine Expression von WT-Umod im Bereich primärer Zilien, nicht jedoch von mutiertem Umod. Darüber hinaus kolokalisierte Umod mit Nephrocystin, welches im Bereich des Zentromers von Mitosespindel nachgewiesen werden konnte (Zaucke et al., 2010). Zilien detektieren den Urinfluss und unterstützen somit die Zellorientierung bei der Zellteilung. Durch eine veränderte Zellpolarität kann es zur Entstehung von Zysten kommen (Nauli et al., 2003).

Ein weiteres klinisches Charakteristikum ist das Auftreten von langstreckigen nicht-sklerotischen Nierenarterienstenosen (Prejbisz et al., 2015). Rao et al. konnten zeigen, dass Harnsäure zur Entstehung von *platelet derived growth factor A-chain (PDGF A-chain)* beiträgt, welches das Wachstum vaskulärer glatter Muskelzellen fördert (Rao et al., 1991). Des Weiteren erhöht Harnsäure die Expression von Angiotensin II und trägt damit ebenfalls zur Zellproliferation bei. Unter der Medikation mit Losartan und Captopril, welche die Bildung von Angiotensin II hemmen, bildete sich dieser Effekt signifikant zurück (Corry et al., 2008). Die Patienten entwickeln im Laufe der Erkrankung eine tubulointerstitielle Nephritis, die zur Nierenfibrose führt und letztendlich durchschnittlich zwischen der 4. und 5. Lebensdekade im *End Stage Renal Disease (ESRD)* resultiert (Bleyer et al., 2017). Histologische Untersuchungen von Nierenbiopsien betroffener Patienten weisen neben fibrotischen Veränderungen und

tubulären Atrophien außerdem intrazelluläre Aggregate von Uromodulin auf (Scolari et al., 2004, Rampoldi et al., 2003).

Die auslösenden Mechanismen dieser Nephritis sind noch nicht vollständig geklärt, vermutlich spielt der Pathomechanismus der *Unfolded Protein Response* (UPR) eine Rolle (s. Abschnitt 4.2). Bis auf Nierenersatzverfahren stehen bislang keine Therapieoptionen für diese Erkrankung zur Verfügung.



**Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der ADTKD-UMOD**

Dargestellt ist die Krankheitsentwicklung in Lebensjahren. Bereits im Kindesalter weisen die Patienten eine Hyperurikämie auf, die bei fehlendem Auftreten von Gichtattacken inapparent verläuft. Im Laufe der Erkrankung kann es zum Auftreten von Nierenzysten oder langstreckigen Nierenarterienstenosen kommen. Die Erkrankung führt zu einer tubulointerstitiellen Inflammation, die in einer Nierenfibrose und später im ESRD resultiert. (t=Zeit, a=Jahre)

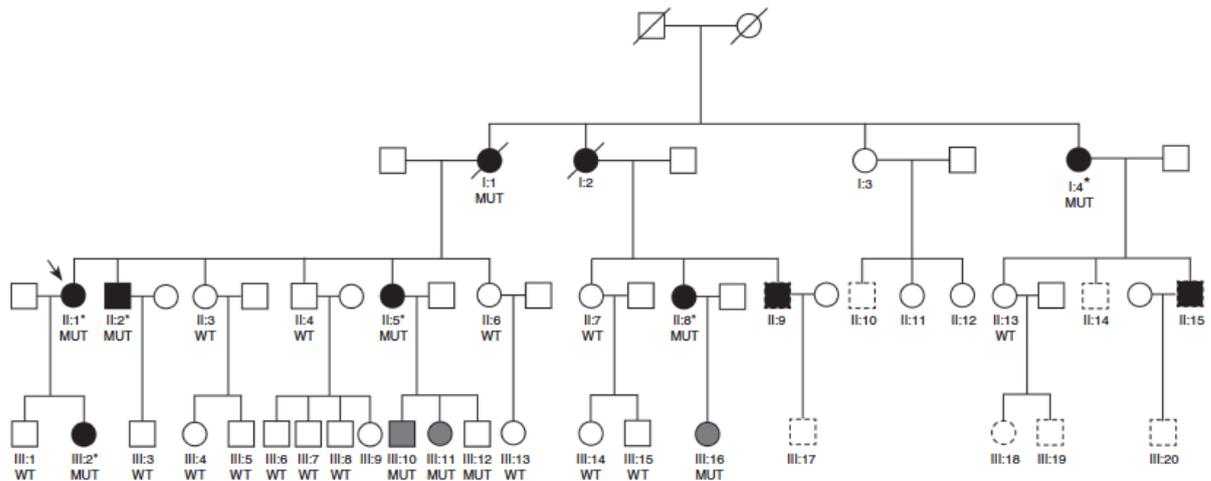
### 1.3 Mutation P236R im *UMOD*-Gen

Anlass zur Erstellung dieser Arbeit sind die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gemeinsam mit Kollegen der Universität Warschau. Abbildung 2 zeigt den Stammbaum einer deutsch-polnischen Familie, in der auffällig viele Familienmitglieder an Hyperurikämie und Niereninsuffizienz litten (Prejbisz et al., 2015). Darüber hinaus wiesen einige Familienmitglieder bilaterale langstreckige nicht-sklerotische Nierenarterienstenosen in der Computertomographie (CT) bzw. Magnetresonanztomographie (MRT) auf. Dabei wurden insgesamt 39 Familienmitglieder identifiziert, von denen 33 genanalytisch untersucht wurden. In dieser Analyse konnte bei den betroffenen Familienmitgliedern die Mutation c.707C>G im *UMOD*-Gen festgestellt werden, die zu einem Aminosäureaustausch an Stelle p.P236R führt.

Insgesamt ließ sich die Mutation bei 11 Familienmitgliedern nachweisen. Alle Mutationsträger, bis auf das jüngste, männliche Familienmitglied (11 Jahre), zeigten erhöhte Serumharnsäurewerte. Einige darunter wiesen bereits eine eingeschränkte Nierenfunktion auf. Ebenso zeigten alle erwachsenen betroffenen Mitglieder langstreckige nicht-arteriosklerotische Nierenarterienstenosen auf. Bei 4 Patienten konnten kortikale oder kortikomedulläre Nierenzysten nachgewiesen werden. Zwei der Patienten besaßen eine unilateral verkleinerte Niere. Histopathologisch konnten in der Nierenbiopsie eines Patienten krankheitstypische Veränderungen, wie irreguläre Formation der Tubulusepithelzellen und eine verdichtete Umod-Expression, nachgewiesen werden. In Abhängigkeit vom Nierenarteriendurchmesser zeigte sich ebenfalls ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR), während der Serumharnsäurespiegel mit Abnahme des Nierenarteriendurchmessers stieg (Prejbisz et al., 2015). Diese Ergebnisse präsentieren einen neuen Phänotyp, der vor allem mit vaskulären Veränderungen einhergeht und bilden die Grundlage, diese klinischen Charakteristika auf molekularer Ebene zu untersuchen.

In dieser Genanalyse konnte die Punktmutation Umod P236R nachgewiesen werden. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde aufgrund der Verfügbarkeit die Mutation Umod P236L verwendet. Während es bei Umod P236L zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Arginin kommt (Prejbisz et al., 2015), wird im Fall der Mutation Umod P236L Prolin durch die Aminosäure Leucin ausgetauscht. Arginin besitzt polare Seitenketten, die bei neutralem pH positiv geladen sind. Leucin gehört zu den apolaren, hydrophoben Aminosäuren. Diese unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften wirken sich unter anderem auf die Proteinstruktur sowie die Enzymaktivität aus (Berg et al., 2013b). Beide Mutationen sind in der D8C-Domäne lokalisiert, die aus 8 Cysteinresiduen besteht und deren genaue Funktion bisher noch unklar ist (Rampoldi et al., 2011). Sie konnten beide als Ursache für die Entstehung von ADTKD-*UMOD* in verschiedenen Familien identifiziert werden (Bernascone et al., 2006, Kudo et al., 2004).

Die Mutation Umod P236L wurde bisher zuvor einmalig in einer japanischen Familie untersucht. Mitglieder dieser Familie litten ebenfalls an Hyperurikämie, Gichtanfällen sowie progredienter Niereninsuffizienz (Yokota et al., 1991). Mittels Gensequenzierung ließ sich bei ihnen die Mutation Umod P236L feststellen (Kudo et al., 2004).



**Abb. 2: Stammbaum deutsch-polnischer Familie mit Umod-Mutation P236R**

Insgesamt sind 4 Generationen dargestellt. Indexpatientin II:1 mit Pfeil markiert. MUT = mutiert, WT = Wildtyp. Die schwarzen Symbole zeigen Patienten mit Niereninsuffizienz und Hyperurikämie. Die grauen Symbole zeigen Patienten mit Hyperurikämie. Rechtecke repräsentieren männliche Patienten, Kreise repräsentieren weibliche Patientinnen. Familienmitglieder mit nachgewiesenen langstreckigen nicht-sklerotischen Nierenarterienstenosen sind mit einem Stern (\*) markiert. Gestrichelt umrandete Symbole weisen auf anamnestische Informationen hin. Durchgestrichene Symbole stehen für verstorbene Familienmitglieder. (Prejbisz et al., 2015)

## 1.4 Uromodulin

Uromodulin (Umod), auch als Tamm-Horsfall Protein (THP) (Pennica et al., 1987) bezeichnet, wird von den Nierenepithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife (*Thick Ascending Limb* = TAL) und des distalen Konvoluts in das Tubuluslumen sezerniert. Mit einer Sekretionsrate von 50-100 mg pro Tag ist es das am reichlichsten vorhandene Protein im Harn von Gesunden (Cavallone et al., 2001). Es ist vor allem an der apikalen, aber auch an der basolateralen Plasmamembran lokalisiert (Bachmann et al., 1985). Die genaue Funktion des Proteins ist bisher unklar. Bekannt ist, dass Uromodulin im Menschen an der Bildung hyaliner Zylinder beteiligt ist und in der Entstehung dieser im Rahmen einer akuten tubulären Nekrose eine Rolle spielt (Wangsiripaisan et al., 2001).

In Tierversuchen konnten darüber hinaus unter anderem immunmodulierende Eigenschaften von Uromodulin aufgezeigt werden. So ließ sich nachweisen, dass Umod via *Toll-like-receptor 4* (TLR4) nicht nur zur Reifung dendritischer Zellen beiträgt, sondern auch Monozyten und neutrophile Granulozyten aktiviert (Saemann et al., 2005, Darisipudi et al., 2012). Vermutlich bildet es dadurch einen wichtigen Baustein in der Infektionsabwehr des Urogenitalsystems.

In weiteren Experimenten fanden sich bei THP  $-/-$  Mäusen im Vergleich zu THP  $+/+$  Mäusen nach transurethraler Inokulation mit *Escherichia coli* nicht nur eine erhöhte bakterielle Kolonisation der Harnblase, sondern auch renale Mikroabszesse und Pyelonephritiden (Bates et al., 2004, Mo et al., 2004b). Umod bindet Typ 1 Fimbrien von *Escherichia coli* und verhindert somit deren Anheftung an das Urothel über Uroplakinrezeptoren (Orskov et al., 1980, Pak et al., 2001).

Darüber hinaus spielt Umod eine wichtige Rolle bei der Konzentrierung des Harns. Es interagiert sowohl mit dem *Renal Outer Medullary Potassium Channel 2* (ROMK2) als auch mit dem Na-K-2Cl-Cotransporter, welche für den Elektrolythaushalt und somit für die Wasserabsorption essentiell sind. Umod führt zu einer verstärkten Expression dieser Kanäle an der Plasmamembran, während es unter THP-Defizienz zu einer vesikulären Akkumulation der Kanäle kommt (Mutig et al., 2011, Renigunta et al., 2011). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass THP  $-/-$  Mäuse unter Wasserdeprivation eine verminderte Fähigkeit der Urinkonzentrierung zeigen (Bachmann et al., 2005).

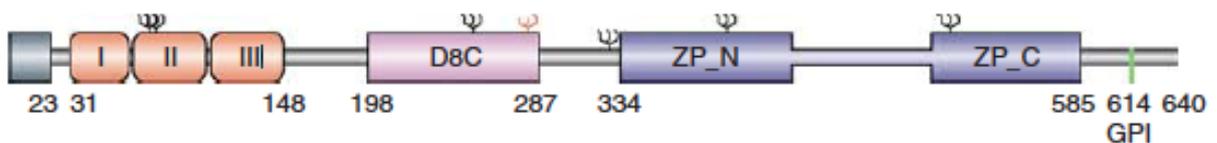
Weiterhin besitzt Umod calciumbindende Eigenschaften. Dadurch sorgt es dafür, dass die Calcium-Konzentration unter den Schwellenwert der Kristallformation sinkt und die Ausbildung von Nierensteinen verhindert wird. THP-defiziente Mäuse neigen nicht nur dazu, spontan Nierensteine auszubilden, unter Vitamin D3-Zufuhr und oxalatreicher Diät kommt es darüber hinaus im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Mäusen zur verstärkten Nephrolithiasis (Mo et al., 2004a).

Trotz dieser Erkenntnisse *in vivo* bleibt die genaue Funktion von Umod im Menschen weiterhin unklar, da das Auftreten von Harnwegsinfekten oder Nierensteinen in Patienten mit einer Umod-Mutation und erheblich verminderter Umodkonzentration im Urin nicht signifikant erhöht ist (Rampoldi et al., 2011, Bleyer et al., 2003).

#### **1.4.1 Struktureller Aufbau und Reifungsprozess von Umod**

In Abbildung 3 ist der strukturelle Aufbau von Umod gezeigt. Es besteht aus 640 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 80-95 kDa (Cavallone et al., 2001). Ein Signalpeptid leitet den Modifikations- und Sekretionsprozess ein. Weiterhin besteht Umod aus drei Wachstumsfaktordomänen (*epidermal growth factor* = EGF-Domäne I, II, III), die calciumbindende Eigenschaften besitzen. Eine zentrale Domäne enthält 8 Cysteinresiduen und wird daher als D8C bezeichnet. Die genaue Funktion ist bisher unbekannt. Des Weiteren besteht Umod aus einer Zona pellucida-Domäne,

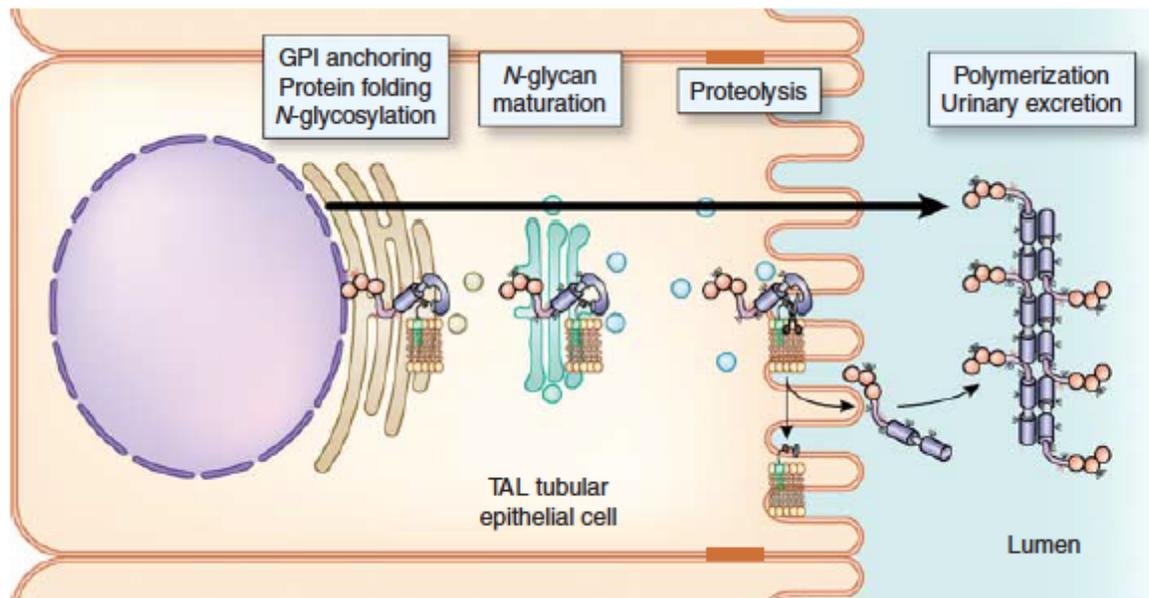
welche vermutlich der extrazellulären Polymerisation dient (Jovine et al., 2002, Bokhove et al., 2016), und einer Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerdomäne am Aminosäurerest 614 (Rampoldi et al., 2011). Zusätzlich besitzt Umod eine *high*-Mannose Kette am Aminosäureresiduum Asn 274, welche unter anderem die Infektionsabwehr uropathogener Bakterien wie *Escherichia coli* vermittelt, und insgesamt 7 N-Glykosylierungsdomänen. In Abhängigkeit der Kationenkonzentration besitzen Uromodulinpolymere die Fähigkeit, hyaline Zylinder und dadurch eine wasserimpermeable Barriere zu bilden (Wiggins, 1987, Bernascone et al., 2010).



**Abb. 3: Aufbau von Umod**

Umod besteht aus einer Sequenz von 640 Aminosäuren. Neben einem Führungspeptid enthält es drei calciumbindende epidermale Wachstumsfaktordomänen, eine zentrale Domäne (D8C), eine Zonapellucida-Domäne und einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker. Am Residuum Asn 274 befindet sich eine *high*-Mannose-Kette (in Rot dargestellt). Insgesamt enthält Umod 7 N-Glykosylierungsdomänen. (Rampoldi et al., 2011).

Wie in Abbildung 4 dargestellt, erfolgt die Translation der Basensequenz der Umod-mRNA in eine Aminosäuresequenz in den ribosomalen Untereinheiten des Endoplasmatischen Retikulums (ER). Dadurch entsteht die Primärstruktur des Proteins (Löffler/Petrides, 2014). Ebenso kommt es dort zur Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur durch Bildung von Disulfidbrücken, Formation des GPI-Ankers, welcher der Verankerung des Proteins in der Plasmamembran dient, und der N-Glykolisierung. Von dort aus gelangt Umod zum Golgi-Apparat, in dem die weitere Reifung, wie die Glykanmodifikation, stattfindet. Umod wird an die Plasmamembran transportiert, kann jedoch aufgrund zweier hydrophobischer Einheiten nicht polymerisieren. Erst durch die proteolytische Spaltung der Protease Hepsin (Brunati et al., 2015) entsteht ein Monomer, welches polymerisieren und ins Tubuluslumen sezerniert werden kann. Dort besitzt Uromodulin eine Halbwertszeit von 16 h im Menschen und 9 h im Kaninchen (Rampoldi et al., 2011).



**Abb. 4: Modell der Uromodulinreifung, -exkretion und -polymerisation**

Uromodulin-mRNA wird im ER in eine Aminosäuresequenz translatiert. Diese wird modifiziert, indem ein GPI-Anker und Disulfidbrücken ausgebildet werden. Zudem findet dort die N-Glykosylierung statt. Umod gelangt zum Golgi-Apparat, in welchem die Glykan-Ketten modifiziert werden. In Vesikeln wird Umod an die Plasmamembran transportiert. Vor der Polymerisation findet die Proteolyse hydrophobischer Domänen durch die Protease Hepsin (dargestellt als Schere) statt. Umod kann nun polymerisieren und wird in das Tubuluslumen sezerniert (Rampoldi et al., 2011).

### 1.4.2 Proteinbiosynthese von mutiertem Umod

Im Rahmen von ADTKD kommt es durch Mutationen im *UMOD*-Gen zur Entstehung von mutiertem Umod (Hart, 2002). Dieses wird fehlgefaltet und kann nicht weiter prozessiert werden, sodass es subzellulär verbleibt und dadurch in geringerer Konzentration an die Plasmamembran gelangt (Bernascone et al., 2006). Folglich wird es dort weniger in das Tubuluslumen sezerniert, was zu einer reduzierten Umodmenge im Urin führt (Dahan et al., 2003). Jedoch verbleibt nicht das gesamte mutierte Protein subzellulär, ein Teil gelangt an die Plasmamembran und von dort in das Tubuluslumen. Mutiertes Umod kann jedoch keine geordneten Polymere bilden, sondern aggregiert an der Plasmamembran. Schaeffer et al. vermuten, dass dies erklären könnte, weshalb sich mutiertes Umod in Urinproben von Patienten nachweisen lässt (Schaeffer et al., 2012). Andere Arbeitsgruppen stellten die Hypothese auf, dass durch diese intrazelluläre Akkumulation ER-Stress ausgelöst wird und darüber Pathomechanismen der *Unfolded Protein Response* (UPR) ausgelöst werden (Piret et al., 2017, Zhang and Kaufman, 2008). Über diese Signalkaskaden könnte ein Zellschaden entstehen, der in interstitieller Inflammation mündet und somit in der Entstehung der Nierenfibrose und progredienten Nierenschädigung eine Rolle spielt (Schaeffer et al., 2017, Kemter et al., 2017).

## 1.5 Hyperurikämie als zentrales Symptom der ADTKD

Zentrales Symptom der ADTKD stellt die Hyperurikämie dar. Oftmals präsentiert sie sich als primäre Krankheitsmanifestation in Form von Gichtattacken bereits im Kindesalter (Eckardt et al., 2015). Insgesamt leiden etwa 80% der Patienten mit Umod-Mutation an erhöhten Serumuratleveln (Bollee et al., 2011). Trotz intensiver Untersuchungen ist die Ursache dieser Hyperurikämie bislang ungeklärt. Als Hyperurikämie wird die Erhöhung des Harnsäurespiegels im Blut bezeichnet. Harnsäure entsteht durch den Abbau purinhaltiger Stoffe, die endogen anfallen oder von außen zugeführt werden. Häufig tritt diese im Rahmen eines metabolischen Syndroms begleitet von anderen kardiovaskulären Risikofaktoren auf. Normwertig liegt die Obergrenze bei männlichen Erwachsenen bei 7 mg/dl, bei weiblichen Erwachsenen bei 6 mg/dl im Serum (Johnson et al., 2003). Bei Erhöhung dieses Grenzwertes oder bei Überschreitung des Löslichkeitsproduktes kann es zum Ausfall von Uratkristallen kommen, welche sich bevorzugt in Gelenken, insbesondere im Großzehengrundgelenk (Podagra), aber auch in den Knie- (Gonagra) oder Fingergelenken (Chiragra) ablagern. Dies äußert sich in einer meist schmerzhaften aseptischen Arthritis, welche als Gichtattacke bezeichnet wird (Fathallah-Shaykh and Cramer, 2014, Kuhlmann et al., 2015, Kiltz et al., 2016). Wird die Erkrankung nicht behandelt, kann es zur chronischen Gichtarthropathie und Ablagerung von Uratkristallen als Gichttophi in den Weichteilen kommen (Kiltz et al., 2016).

Darüber hinaus führt ein erhöhter Serumharnsäurespiegel nicht nur zu einer Arteriopathie mit Verdickung der Gefäßmembran durch Proliferation glatter vaskulärer Muskelzellen, sondern auch zu einer arteriellen Hypertonie und stellt damit einen eigenständigen kardiovaskulären Risikofaktor dar (Mazzali et al., 2002, Corry et al., 2008). Die Akuttherapie besteht neben konservativen Maßnahmen wie Ernährungsumstellung in der Gabe nicht-steroidaler Antiphlogistika. Zur Dauertherapie werden bevorzugt Urikostatika wie Allopurinol oder Urikosurika wie Probenecid eingesetzt, um Folgekomplikationen wie die Uratnephropathie zu verhindern (Herold, 2019, Choi et al., 2005a, Classen/Diehl/Kochsiek, 2009). Durch eine Hemmung des Enzyms Xanthinoxidase, welches im Abbauprozess von Purinen beteiligt ist, wird die Harnsäurebildung reduziert (Stamp et al., 2016). Die akkumulierenden, wasserlöslichen Zwischenstufen können über den Harn ausgeschieden werden.

Neben diesen gesundheitsschädlichen Folgen der Hyperurikämie werden auch förderliche Aspekte diskutiert. So wird vermutet, dass die antioxidativen Eigenschaften der Harnsäure einen neuroprotektiven Effekt haben und somit mit einem verminderten Risiko für das Auftreten von Parkinson-Erkrankungen (Weisskopf et al., 2007) und Alzheimerdemenz (Lu et al., 2016) einhergehen. Darüber hinaus erzielten Patienten mit erhöhten Harnsäurespiegeln bessere kognitive Ergebnisse im *Mini Mental State Test* und in neuropsychologischen Testbatterien als ihre Kontrollgruppe (Euser et al., 2009).

### **1.5.1 Die Rolle von GLUT9 in der Harnsäureexkretion**

Anfallende Purine werden über mehrere enzymatische Schritte zu Harnsäure abgebaut (Fathallah-Shaykh and Cramer, 2014). Die meisten Säugetiere besitzen das Enzym Urikase, welches Harnsäure zu gut wasserlöslichem Allantoin degradiert. Beim Menschen ist dieses Enzym im Rahmen der Evolution durch Gen-*Silencing* inaktiviert worden (Wu et al., 1992). Aus diesem Grund weist der Mensch generell höhere Serumharnsäurespiegel auf, wodurch eine Hyperurikämie schneller symptomatisch wird (Johnson and Rideout, 2004).

Urat verhält sich als schwache Säure und liegt bei physiologischem pH als Anion vor (Choi et al., 2005a). Aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit werden andere Mechanismen zur Uratexkretion genutzt (Wright et al., 2010). Die Harnsäureausscheidung erfolgt zu etwa 60% renal und zu 30% intestinal. Sie geschieht in einem komplexen Zusammenspiel aus Absorption und Sekretion. Zu den wichtigsten Harnsäuretransportern gehören der Urat-Austauscher 1 (URAT1) (Enomoto et al., 2002), der vor allem im proximalen Tubulus lokalisiert ist, sowie der Glucosetransporter 9 (GLUT9). Auch andere Transporter wie der organische Anionentransporter 4 (OAT4) oder das ATP-Bindungskassette Superfamilie G-Mitglied 2 (ABCG2) spielen eine Rolle im Harnsäuretransport (Hagos et al., 2007, Woodward et al., 2009).

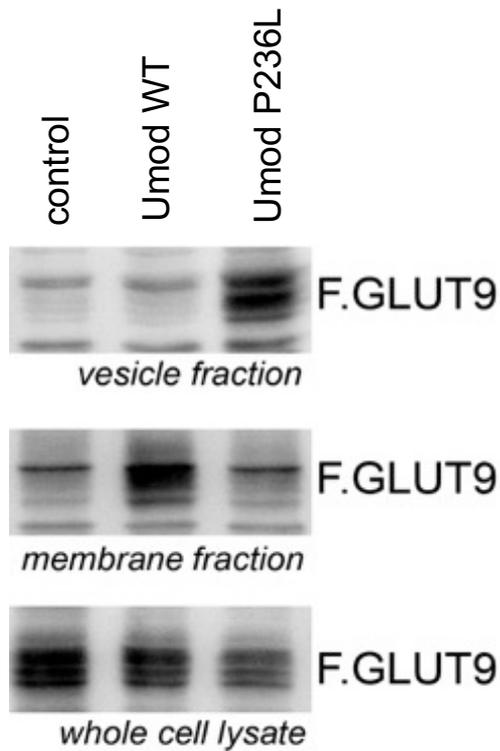
Fast die gesamte im Blut zirkulierende Harnsäure wird durch die glomeruläre Filtrationsbarriere filtriert. Etwa 90% der filtrierten Harnsäure werden im proximalen Tubulus durch apikal im Nierenepithel lokalisierte Transporter wieder reabsorbiert. Im Verlauf wird etwa die Hälfte wiederum ins Tubuluslumen sezerniert. Postsekretorisch kommt es erneut zu einer Harnsäureresorption von etwa 40%, sodass circa 10% der

filtrierten Harnsäure mit dem Urin ausgeschieden werden (Wang et al., 2019, Maiuolo et al., 2016).

GLUT9 gehört zur Familie der Glucosetransporter, die für den transmembranären Glucosetransport verantwortlich sind (Phay et al., 2000, Caulfield et al., 2008). Der Transporter scheint spannungsgesteuert zu arbeiten und ebenfalls vom extrazellulären pH-Wert abhängig zu sein (Anzai et al., 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass weniger Zuckermoleküle, als vielmehr Harnsäure das Substrat des Transporters darstellen (Anzai et al., 2008). GLUT9 kommt vor allem in Niere, Leber, Darm und Leukozyten vor. Er existiert in zwei Isoformen (GLUT9 und GLUT9 $\Delta$ N) und ist in der Niere sowohl an der apikalen als auch an der basolateralen Zellmembran proximaler Tubuluszellen und Epithelzellen des TAL lokalisiert. Dort dient GLUT9 somit dem transepithelialen Transport (Augustin et al., 2004). *In vivo* Untersuchungen zeigten, dass eine Defizienz des Transporters sowohl zu einer Hyperurikämie und Urikosurie als auch zu Zeichen des metabolischen Syndroms führt. Somit spielt dieser Transporter eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der renalen und intestinalen Harnsäurehomöostase (Preitner et al., 2009, DeBosch et al., 2014).

## **1.6 Zielsetzung dieser Arbeit**

Es konnte bereits für andere Umod-Mutationen gezeigt werden, dass mutiertes Umod vor allem im ER retiniert wird und dort akkumuliert. Nach Identifikation der Mutation P236R beziehungsweise P236L, die einen neuen vaskulären Phänotyp der ADTKD-*UMOD* verursacht, stellt sich die Frage, ob auch diese Mutation eine ER-Akkumulation verursacht. Darüber hinaus ist der Pathomechanismus, der zur Entstehung der Hyperurikämie von ADTKD-Patienten führt, noch immer ungeklärt. Möglicherweise wirkt sich mutiertes Umod auf den Transport von Harnsäuretransportern an die Plasmamembran aus und sorgt dafür, dass diese ebenfalls subzellulär akkumulieren. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe, durchgeführt von Dr. med. Paul Probst (Abbildung 5), konnte mit Hilfe einer subzellulären Fraktionierung gezeigt werden, dass GLUT9 in Anwesenheit von Umod P236L vermehrt in der Vesikelfraktion und weniger in der Membranfraktion zu finden war. Stattdessen war der Transporter in Anwesenheit des Umod WT-Proteins vermehrt in der Membranfraktion zu finden und schien verstärkt an der Plasmamembran zu lokalisieren.



**Abb. 5: Subzelluläre Fraktionierung von Umod- und GLUT9- exprimierenden Zellen**

Im Westernblot ist die Expression von F.Glut9 dargestellt. In Anwesenheit des mutierten Proteins Umod P236L verbleibt der Harnsäuretransporter GLUT9 vermehrt in der Vesikelfraktion (*vesicle fraction*). Stattdessen ist er in Anwesenheit von Umod WT weniger in der Vesikel-, sondern verstärkt in der Membranfraktion (*membrane fraction*) zu finden (Dr. med. Paul Probst).

Daraus resultieren drei Fragenstellungen, die mit Hilfe von Immunfluoreszenzuntersuchungen in der folgenden Arbeit bearbeitet werden:

1. In welcher subzellulären Struktur befinden sich Umod WT und Umod P236L?
2. Beeinflusst mutiertes Umod den Transport von GLUT9 an die Plasmamembran?
3. Wo akkumuliert der Harnsäuretransporter GLUT9 in Abhängigkeit von Umod WT und P236L?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Axiobserver Z1-Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Spot Pursuit 1.4 MPixel Kamera	Diagnostic Instruments Inc., USA
Spot Pursuit Power Supply	Diagnostic Instruments Inc., USA
Zeiss EPLAX VP232-2 Power Supply	Carl Zeiss AG, Oberkochen
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zellkultur Mikroskop HBO50	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Imager	Alpha Innotec Deutschland GmbH, Kasendorf

Software	Hersteller
AlphaView	Proteinsimple, San Jose, USA
FluorChem FC2 (Imager)	Alpha Innotec GmbH, Kasendorf
ImageJ	National Institut of Health, MD, USA
VisiView	Visitron Systems, Puchheim
GraphPad PRISM 8	GraphPad Software, San Diego, USA

Tabelle 2: Geräte und Software

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Zellkulturschale 100mmx20mm	Corning Incorporated, NY, USA
Costar® 12 well Culture plate	Corning Incorporated, NY, USA
Nitrozellulosemembran	Protan Whatman, Dassel
Nunc™ Cell Culture Treated EasyFlasks™, 25 cm <sup>2</sup> (T25)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nunc™ Cell Culture Treated EasyFlasks™, 75 cm <sup>2</sup> (T75)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Deckgläser (rund, 12mm)	VWR International, Langenfeld

Objektträger (76x26x1mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
--------------------------	--

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

### 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Agarose, low gelling temperature	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Albumine bovine serum, protease-free	VWR International GmbH, Langenfeld
Ammoniumpersulfat (APS)	Biomol, Hamburg
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CaCl <sub>2</sub> 0,25 M	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem GmbH, Darmstadt
EDTA (Titriplex III)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (99,9 %) (v/v)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromidlösung 0,025 % (w/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Luminol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Hepes Acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol (99,8 %) (v/v)	VWR International GmbH, Darmstadt
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KGaA Darmstadt
Methanol	VWR International GmbH, Langenfeld
NaCl	VWR International GmbH, Langenfeld
NaPO <sub>4</sub>	Merck KGaA Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Honeywell Riedel de Haen, Seelze
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (4 % in PBS pH 7,4) (PFA)	Morphisto GmbH, Frankfurt
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

ProLong Gold Antifade Mountant w/ Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Life Technologies Inc., Carlsbad, CA, USA
Acrylamid (37,5 %) (w/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %) (w/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Biomol GmbH, Hamburg
Temed (99 %) (w/v)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

**Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien**

## 2.1.4 Spezielle Materialien

### 2.1.4.1 Zellkultur

Material	Hersteller
Dulbecco's MEM 1,0 g/L D-Glucose, 3,7 g/L NaHCO <sub>2</sub> , L-Glutamin, very low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dulbecco's VLE-MEM 4,5 g/L D-Glucose, 3,7 g/L NaHCO <sub>2</sub> , L-Glutamin, very low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin
FCS	Biochrom GmbH, Berlin
Geneticin (G-418 Sulfate) 50 mg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lipofectamine ® 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MEM Earle's	Biochrom GmbH, Berlin
Opti-MEM ® I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin
Pencillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin

Zellen	Herkunft
COS 7	American Tissue Culture Collection (ATCC)
HEK 293T	American Tissue Culture Collection (ATCC)
MDCK C-II	PD Dr. med. Johannes Stegbauer, Düsseldorf
MDCK C-II plegfp.N1	Dr. med. Eva Königshausen, Clara Porwoll
MDCK C-II plegfp.F.Umod WT	Dr. med. Eva Königshausen, Clara Porwoll
MDCK C-II plegfp.Umod P236L	Dr. med. Eva Königshausen, Clara Porwoll

Tabelle 5: Zellkultur

## 2.1.5 Herstellung rekombinanter DNA

### 2.1.5.1 Plasmide

Name	Herkunft
CDM8.slg.GLUT9.cyt	Prof. Dr. med. Lorenz Sellin, Image Clone (Source Bioscience, BC013740.1), Düsseldorf
CDM8.F.UmodWT	Prof. Ing. Stanislav Kmoch, CSc., Prag
CDM8.Umod P236L	Prof. Ing. Stanislav Kmoch, CSc., Prag
plegfp.F.UmodWT	Dr. med. Eva Königshausen, Clara Porwoll, Düsseldorf
plegfp.N1	Dr. med. Thomas Grunwald, Bochum
plegfp.UmodP236L	Dr. med. Eva Königshausen, Clara Porwoll, Düsseldorf

Tabelle 6: Plasmide

### 2.1.5.2 Antibiotika und Bakterien

Name	Hersteller
Ampicillin Na-salt	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
LB-Agar (Luria Bertani Agar powder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen, Darmstadt
Tetracyclin hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ultracom MC1061 E.coli	invitrogen, Darmstadt
Ultracom MC1061 P3 E.coli	invitrogen, Darmstadt
Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden

Tabelle 7: Antibiotika und Bakterien

### 2.1.5.3 Enzyme und Puffer

Enzyme	Hersteller
Alkaline Calf Intestine Phosphatase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Hind III (20.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Mlu I (10.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Not I (10.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Puffer 2 10x Concentrate	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Puffer 3 10x Concentrate	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Puffer T4 DNA Ligase with 10 mM ATP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
T4 DNA Ligase (400.000 U/ml)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Tabelle 8: Enzyme und Puffer

### 2.1.5.4 Marker

Name	Hersteller
Blue Prestained Protein Marker, broad range #P 7708S (bis 15.12.2015)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Blue Prestained Protein Standard, broad range (11-190 kDa) #P 7006S (ab 15.12.2015)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
$\lambda$ - DNA- BstE II Digest	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
100 bp DNA ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Tabelle 9: Marker

### 2.1.6 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller
Anti-EEA1-antibody	abcam, Cambridge, UK
Alexa Fluor® 488 anti-Giantin antibody	BioLegend Inc., San Diego, USA
Anti-Calnexin antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
GLUT9 (C-16) antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
THP (B-2) antibody	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA
UMOD purified MaxPab mouse polyclonal antibody (B01P)	abnova, Taipeh, Taiwan

Wheat Germ Agglutinin, Alexa Fluor® 555 Conjugate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
---	--

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege IgG	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Maus IgG	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen IgG	Invitrogen, Darmstadt
Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus IgG	Dianova, Darmstadt
Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Kaninchen IgG	Invitrogen, Darmstadt
Fluorescein (FITC) AffiniPure Schaf Anti-Maus IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA
Texas-Red dye-conjugated AffiniPure Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA

Tabelle 10: Antikörper

### 2.1.7 Lösungen und Puffer

<b>Blockierungsgemisch</b>	4% BSA in PBS Triton X-100 (Konzentrationen s. Punkt 1.2.3)
<b>enhanced chemiluminescence (ECL) Lösung A</b>	100 mM Tris pH 8,5 2,5 mM Luminol 0,4 mM Coumarinsäure
<b>ECL Lösung B</b>	100 mM Tris pH 8,5 0,02 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>EDTA-(Ethyldiamintetraessigsäure) Puffer</b>	0,54 mM EDTA 136,9 mM NaCl 2,68 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,1-7,3
<b>Einfriermedium</b>	55 % Medium 30 % FCS 10 % DMSO

<b>Laufpuffer</b>	23,9 mM Tris Base 191,8 mM Glycin 3,47 mM SDS
<b>Lysogeny broth (LB)-Agar</b>	32 g/l LB-Agar 3mM NaOH
<b>LB-Medium + Ampicillin</b>	20g/l LB Broth Base 0,269 mM Ampicillin
<b>LB-Medium + Ampicillin und Tetracyclin</b>	20 g/L LB Broth Base 0,067 mM Ampicillin 0,016 mM Tetracyclin
<b>Lösung für ein 10 % SDS-Sammelgel</b>	0,267 ml Acrylamid 0,567 ml a.d. 0,832 ml Sammelgelpuffer 20 µl 10 % APS 2,5 µl Temed (99%)
<b>Lösung für ein 10 % SDS-Trenngel</b>	1,5 ml Acrylamid 0,75 ml a.d. 2,25 ml Trenngelpuffer 45 µl 10 % APS 7,5 µl Temed (99%)
<b>Phosphate buffered saline (PBS)</b>	136,9 mM NaCl 2,68 mM KCl 4,29 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Proteinwaschpuffer</b>	13 mM Tris pH 7,5 130 mM NaCl 0,13 % Tween 20
<b>Stammlösung Ampicillin</b>	26,92 mM Ampicillin
<b>Stammlösung Tetracyclin</b>	2,08 mM Tetracyclin
<b>Sammelgelpuffer</b>	484 mM Tris HCl 16 mM Tris Base 14 mM SDS

<b>Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer</b>	40 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 20 mM Essigsäure
<b>Transferpuffer</b>	31 mM Tris Base 240 mM Glycin 20 % Methanol
<b>Trenngelpuffer</b>	360 mM Tris HCl 1,14 M Tris Base 14 mM SDS
<b>Agaroselösung</b>	1,5 % Agaroselösung in TAE 4 Tropfen 0,025 % Ethidiumbromid
<b>low melting Agarose-Lösung</b>	1,5 % Agaroselösung in TAE 4 Tropfen 0,025 % Ethidium-Bromid
<b>2-fach Laemmli + Dithiothreitol (DTT)</b>	0,09 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 M DTT 18 % Glycerin 3,6 % SDS 1,8 % Bromphenol blau
<b>2-fach Hepes buffered saline (HEBS)</b>	280 mM NaCl 49,94 mM Hepes acid 1,48 mM NaPO <sub>4</sub> pH 7,05 mit 5 M NaOH

Tabelle 11: Lösungen und Puffer

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Alle nachfolgend genannten gentechnischen Untersuchungen unterliegen der Genehmigung des Regierungspräsidiums Düsseldorf (Aktenzeichen 53.02.01-D-1.45/10).

#### 2.2.1.1 MDCK II-Zellen

Als Versuchszellen wurden *Madin Darby Canine Kidney Cells* (MDCK-CII), Nierenepithelzellen des Cocker Spaniels, verwendet. Diese wurden von Herrn PD Dr. Johannes Stegbauer, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

### **2.2.1.1.1 Kultivierung**

Die Zellen wurden in Kultur genommen. Dazu wurden sie aus dem Stickstofftank in ein Wasserbad überführt und bei 37 °C rasch aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wurden die Zellen nach Überführung in ein mit Medium (Earle's Medium mit 10 % FCS und 100 U/ml Penicillin mit 100 µg/ml Streptomycin) gefülltes Gefäß bei 260 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Das Gemisch wurde in T75-Flaschen überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Beim Erreichen einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und anschließend mit 5 ml des EDTA-Puffers (siehe Punkt 1.1.7) einmal gewaschen. Daraufhin wurden sie mit 5 ml des Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffers für etwa 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung wurde der Puffer abgesaugt und die Zellen für rund 10 Minuten mit 5 ml Trypsin/EDTA inkubiert. Nach abermaliger mikroskopischer Kontrolle ließen sich die Zellen durch leichtes Schlagen der Flasche vom Boden ablösen, wurden mit 10 ml des Mediums in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 Minuten bei 260 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Das Gemisch wurde abhängig vom vorher bestimmten Splitverhältnis in mit Medium vorbereitete T75 Flaschen überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Mit jeder Passage wurde die Anzahl der Passagen um die Anzahl 1 erhöht.

### **2.2.1.1.2 Einfrieren**

Zum Einfrieren wurden die Zellen in T75-Flaschen ausgesät und am darauffolgenden Tag abhängig von der Dichte in normalem Medium und zu gleichen Teilen Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen zu je 1 ml aliquotiert. Diese wurden mit Hilfe von 100 %igem Isopropanol in einem Einfrierbehälter bei -80 °C eingefroren und am nächsten Tag in den Stickstofftank (-160 °C) zur Asservation überführt.

### **2.2.1.2 cos7-Zellen**

Als Versuchszellen wurden cos7-Zellen, Fibroblasten der Meerkatze, verwendet. Diese wurden über die *American Tissue Culture Collection* bezogen.

#### **2.2.1.2.1 Kultivierung**

Die Zellen wurden in Kultur genommen. Dazu wurden sie aus dem Stickstofftank in ein Wasserbad überführt und bei 37 °C rasch aufgetaut. Nach Überführung in ein mit

Medium (Dulbecco's MEM mit 4,5 g/l D-Glucose + 10 % FCS) gefülltes Gefäß unter sterilen Bedingungen wurden sie bei 260 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Das Gemisch wurde in 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturschalen überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium unter der Sterilbank abgesaugt und die Zellen mit 5 ml *Phosphate buffered saline* (PBS) gespült. Nach Absaugen dieser Lösung wurde 1 ml Trypsin/EDTA Lösung zur Zellablösung auf die Zellen geträufelt und diese für 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung unter Trypsin wurde Medium hinzugegeben und das Zellgemisch abhängig vom vorher gewählten Splitverhältnis in Zellkulturschalen mit frischem Medium überführt. Die Zellen wurden bis zur erneuten Passagierung für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Mit jeder Passage wurde die Anzahl der Passagen um 1 erhöht.

#### **2.2.1.2.2 Transfektion**

Die Zellen wurde mit Hilfe des Lipofectamine 2000 ® Reagenz transfiziert. Dieses Reagenz nutzt die Methode der Lipofektion, bei der die anionische Plasmid-DNA ein Aggregat mit kationischen Liposomen formt und somit über die Plasmamembran ins Zellinnere gelangen kann.

Am Vorabend wurden 12 mm große, runde Objektträger in jedes *well* einer 12-*well* Platte platziert und darauf  $2 \times 10^4$  Zellen ausgesät. Am nächsten Morgen erfolgte die Transfektion nach Herstellerangaben. Pro *well* wurden 0,5 µg Plasmid und 1 µg Lipofectamin verwendet. Die Plasmid-DNA wurde vorgelegt und 25 µl Opti-MEM Medium pro *well* hinzugefügt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden zum Lipofectamine ebenfalls 25 µl Opti-MEM Medium pro *well* hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden diese Gemische zusammengeführt. Nach weiteren 20 Minuten wurden je 50 µl DNA-Lipid-Komplex pro *well* hinzugefügt und die Zellen ruhten einen Tag. Am darauffolgenden Tag wurde die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

#### **2.2.1.3 HEK 293T-Zellen**

Als Versuchszellen wurden HEK 293T, humane embryonale Nierenzellen, verwendet. Diese wurden über die *American Tissue Culture Connection* bezogen.

#### **2.2.1.3.1 Kultivierung**

Diese Zelllinie wurde wie die oben beschriebenen cos7-Zellen kultiviert. Zum Erhalt wurde zu gleichen Teilen DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose (+10 % FCS) und DMEM mit 1,0 g/l D-Glucose (+10 % FCS) verwendet.

#### **2.2.1.3.2 Transfektion**

Die Transfektion mit Hilfe der Calcium-Phosphat Methode wird dazu genutzt, Plasmid-DNA in Zellen einzuschleusen. Die zu übertragende DNA bindet an Calcium-Phosphat Präzipitate, welche von den Zellen via Endozytose aufgenommen werden.

Dazu wurden die Zellen am Abend vorher so ausgesät, dass sie einzeln vorlagen. Als Medium wurde Dulbeccos's MEM mit 1,0 g/l D-Glucose verwendet.

Am nächsten Morgen wurden 10 µg DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und dazu 500 µl 0,25M CaCl<sub>2</sub> hinzugegeben. Danach wurden unter vortexen 500 µl 2-fach HEBS beigemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden 1 ml des Gemisches auf die Zellen geträufelt. Ein Mediumwechsel erfolgte mit 10 ml 1,0 g/l D-Glucose Medium nach 6-8 Stunden.

#### **2.2.1.3.3 Ernte**

Die Ernte der Zellen fand am Tag nach der Transfektion statt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Daraufhin wurden zu jeder Schale 400 µl kochendes 2x Laemmli + Dithiothreitol (DTT) gegeben und gleichmäßig in der Schale verteilt. Das Gemisch wurde in Reaktionsgefäße überführt und für 20 Minuten bei 20800 g zentrifugiert. Anschließend konnten die Proben für die Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate* = SDS) -Gelelektrophorese verwendet werden.

### **2.2.2 Retrovirale Transduktion**

#### **2.2.2.1 Synthese der Retroviren mittels Transfektion**

Hek293T Zellen wurden am Abend zuvor mit einer Zellzahl von etwa 10<sup>6</sup> Zellen pro Flasche in T25-Schalen ausplattiert. Das Transfektionsgemisch wurde erstellt. Dazu wurden 2 µg des Plasmids pHIT60, 3 µg des Plasmids pHIT-G und 5 µg des Zielplasmids gemischt. 5 Stunden vor Transfektion wurde das Medium gewechselt (5 ml DMEM mit 1,0 g/l D-Glucose). Zum Transfektionsgemisch wurden jeweils 250 µl 0,25 M CaCl<sub>2</sub> hinzugegeben sowie unter vortexen anschließend 250 µl 2x HEBS. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden jeweils 500 µl des Gemisches in die entsprechende Flasche geträufelt. 15 Stunden später wurde das Medium erneut mit 5

ml des 1,0 g/l Glucose-Mediums ausgetauscht, und die Zellen ruhten für 2 Tage. Am Tag 5 wurde der Überstand abpipettiert und in ein 15 ml Gefäß überführt. Der Zelldetritus wurde bei 215 g für 10 Minuten in der Zellzentrifuge herunterzentrifugiert und anschließend durch ein 0,45 µm Zellfilter filtriert. Der Überstand wurde dann zu je 1 ml aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

#### **2.2.2.2 Transduktion von MDCK II-Zellen**

Die MDCK II-Zellen wurden am Abend vorher in T25-Flaschen mit  $5 \times 10^4$  Zellen/Flasche ausplattiert. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 1 ml der jeweiligen Viruspartikel versetzt. Nach 5,5 Stunden wurden je 4 ml Medium hinzugegeben. Nach 2 Tagen wurde mit dem Selektionsprotokoll begonnen (2.2.2.3).

#### **2.2.2.3 Selektionierung**

Zu Beginn der Selektionierung wurden 800 µg/ml Geneticin G418 verwendet. Nach mehrmaligem Mediumwechsel konnten die Zellen dann in eine T75-Flasche überführt werden. Nach 8 Tagen wurde die Konzentration des Geneticin G418 auf die Hälfte (400 µg/ml) reduziert und zum Erhalt weiterverwendet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben kultiviert.

### **2.2.3 Immunfluoreszenz**

Mit Hilfe dieser Methode können bestimmte Zielstrukturen in einer Zelle sichtbar gemacht werden, wodurch eine Kolokalisation der Strukturen überprüft werden kann. Zuerst werden die Zellen mit einem Primärantikörper inkubiert, der gegen ein bestimmtes Epitop der Strukturen gerichtet ist. Daraufhin erfolgt eine Inkubation mit einem Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Teil (*fragment crystallisable*) des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen ist.

#### **2.2.3.1 MDCK II-Zellen**

Die bereits transduzierten Zellen wurden am Vorabend vor Durchführung der Immunfluoreszenz in 12-well Platten ausgesät. Dazu wurden pro well  $10^4$  Zellen ausgesät.

##### **2.2.3.1.1 Färbung des Endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Apparates und der Endosomen**

Zuerst wurden die Primär- und Sekundärantikörper in 4 %-igem BSA, gelöst in PBS, verdünnt und das Blockierungsgemisch (siehe Punkt 2.1.7) vorbereitet. Bei der

Fixierungsmethode mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) wurde zum Blocken und Permeabilisieren eine Lösung von 4 % BSA in PBS und 0,5 % Triton X-100 verwendet. Das Medium wurde abgesaugt und die *wells* mit 500 µl PBS pro *well* gespült. Daraufhin wurde 4 %-iges PFA als Fixans (500 µl/*well*) hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Nachdem das Fixans abpipettiert worden war, wurde mit PBS wiederum gespült. Zum Blocken und Permeabilisieren wurden pro *well* 500 µl des Gemischs aus 4 % BSA und 0,5 % Triton X-100 in PBS hinzugefügt und für 5 Minuten inkubiert.

Nach Absaugen dieser Lösungen wurde Uromodulin (Umod = Tamm-Horsfall-Protein: THP) angefärbt. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten mit 250 µl/*well* des Primärantikörper anti-THP (1:50) inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die *wells* drei Mal mit jeweils 500 µl PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl/*well* des Sekundärantikörpers anti-Maus-IgG-FITC (1:500) für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Darauf folgte die Färbung der Organellen. Als Primärantikörper wurden Calnexin für das Endoplasmatische Retikulum (ER) (1:400) bzw. *Early Endosome Antigen 1* (EEA1) (1:1000) verwendet. Als Sekundärantikörper wurden TexasRed Esel anti-Kaninchen (für Calnexin, 1:500) und Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Kaninchen (für EEA1, 1:1000) benutzt. Für die Färbung des Golgi-Apparates wurde der Antikörper Alexa Fluor® 488 anti-Giantin (1:500) verwendet, der bereits mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff versehen war. Die Inkubationsdauer betrug auch hier jeweils 30 Minuten. Als Sekundärantikörper für Umod diente in diesem Fall Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Maus (1:1000). Nach wiederholtem Waschvorgang konnten die Glasplättchen mit den fixierten Zellen mit *Prolong Antifade* mit (Diamidin-2-phenylindol) DAPI eingedeckelt und auf gläsernen Objektträgern fixiert werden.

#### **2.2.3.1.2 Färbung der Plasmamembran**

Bei der Färbung der Plasmamembran wurde das Lektin *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) Alexa Fluor® 555 (1:200) verwendet, welches bereits mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff markiert war. Nach Blockierung mit 4 %igem BSA in PBS wurden die Zellen ohne vorherige Permeabilisation für 20 Minuten mit WGA inkubiert. Nach einem Waschvorgang erfolgte die Permeabilisation mit 0,1 % Triton X-100 in 4 %-igem BSA in PBS für 5 Minuten. Es wurde eine niedrigere Konzentration verwendet, da bei erhöhter Konzentration eine zu intensive Anfärbung der Zellkernmembran erfolgte und dadurch die Bildbearbeitung erschwerte.

Anschließend wurde die Umod-Färbung wie oben beschrieben durchgeführt.

## **2.2.3.2 cos7-Zellen**

### **2.2.3.2.1 Färbung des Endoplasmatischen Retikulums, Golgi-Apparates und Endosomen**

Die Immunfluoreszenz wurde wie unter 1.2.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Zur Färbung des Umods wurde der polyklonale Primärantikörper *UMOD purified MaxPab* Maus (c = 10 µg/ml) verwendet. Die Zellen wurden bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Sekundärantikörper diente auch hier der FITC anti-Maus Antikörper (1:500).

### **2.2.3.2.2 Färbung der Plasmamembran**

Die Färbung der Plasmamembran wurde wie unter 2.2.3.1.2 beschrieben durchgeführt, wobei zur Permeabilisation 0,3 % Triton X-100 in BSA verwendet wurde. Bei dieser Zelllinie wurde die Konzentration des Tritons erhöht, da sich bei einer verminderten Konzentration von 0,1% eine sehr schwache Färbung und somit geringe Farbintensität des Umod zeigte.

### **2.2.3.2.3 Triple-Färbung**

Um das subzelluläre Verteilungsmuster des Harnsäuretransporters Glucosetransporter9 (GLUT9) in Anwesenheit des Umod WT und der Mutante Umod P236L zu beurteilen, wurden Dreifach-Färbungen gegen Umod, die jeweilige Zellorganelle, ER, Plasmamembran oder EEA1, und den Transporter GLUT9 durchgeführt.

Dazu wurden die Zellen bereits bei der Transfektion sowohl mit GLUT9 und entweder Umod WT oder Umod P236L co-transfiziert. Die Immunfluoreszenz wurde wie unter 2.2.3.2.1 durchgeführt.

Um eine Interaktion des GLUT9-Sekundärantikörpers (anti-Ziege) mit dem Sekundärantikörper von Umod und Calnexin (aus Ziege) zu vermeiden, färbten wir zuerst Umod mit dem polyklonalen Primärantikörper *UMOD purified MaxPab* Maus (10 µg/ml) und danach mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 647® Ziege anti-Maus (1:1000). Als nächstes erfolgte die Färbung des ER durch den Primärantikörper anti-Calnexin (1:400) und den Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen (1:1000). Anschließend wurde der Transporter mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 (1:50) gefärbt. Als Sekundärantikörper wurde Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege (1:1000) genutzt. Die Farbspektren wurden bewusst gewählt, sodass die Emissionsspektren von Umod und GLUT9 nicht überlappend waren und eine

eindeutige Zuordnung der Farbemission gegeben war. Die Inkubationszeit dauerte jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Färbung der Plasmamembran wurde wie unter 2.2.3.1.2 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde gegen Umod und GLUT9 wie oben beschrieben gefärbt.

## **2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Präparate wurden mit dem Mikroskop Axioobserver Z-1 im standardisierten Verfahren mikroskopiert. Dazu wurden pro Präparat etwa 100 Zellen verblindet mikroskopiert und pro Versuch etwa 15-20 vom Anfärbeverhalten gleichartige Zellen fotografiert.

### **2.2.4.1 MDCK II-Zellen**

Die Zellen wurden in 100facher Vergrößerung mikroskopiert. Dazu wurde der Zellkern der Zellen mit dem Filter DAPI für 50-100 ms belichtet und ein Foto aufgenommen. Zur Darstellung der mit Fluorescein isothiocyanate (FITC) markierten Strukturen wurden diese mit dem Filter für grün fluoreszierendes Protein (GFP) für 500 ms belichtet und fotografiert, entsprechend mit Alexa Fluor® 488 markierte Strukturen wurden mit demselben Filter für 1000 ms belichtet. Mit TexasRed markierte Strukturen wurden für 500 ms mit dem Filter HcRed belichtet und fotografiert. Mit Alexa Fluor® 555 markierte Strukturen wurden entsprechend mit dem Filter Cyanine3 (Cy3) für 1000 ms belichtet. Mit Alexa Fluor® 647 markierte Strukturen wurden mit dem Filter Cyanine 5 (Cy5) für 1000 ms belichtet und fotografiert. Diese Belichtungszeiten wurden so gewählt, dass die Farbtintensitäten der verschiedenen Strukturen ähnlich und vergleichbar waren.

### **2.2.4.2 Cos-7 Zellen**

Die Zellen wurden mit 63facher Vergrößerung mikroskopiert. Auch hier wurde der Zellkern mit dem Filter DAPI für 50-100 ms belichtet. Die mit FITC markierten Strukturen wurden mit dem Filter GFP für 500 ms, die Alexa Fluor® 488 markierten Strukturen für 1000 ms belichtet und fotografiert. Mit Alexa Fluor® 555 markierte Strukturen wurden mit dem Filter für Cy3 für 1000 ms belichtet und fotografiert. Für Strukturen, die mit Alexa Fluor® 647 markiert waren, wurde der Filter Cy5 benutzt und diese für 1000 ms belichtet.

## **2.2.5 Bildbearbeitung und statistische Auswertung**

Anschließend wurden die Bilder mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ eingefärbt. Mit Hilfe der Software GraphPad PRISM 8 wurde die weitere statistische Auswertung durchgeführt. Zur Testung wurden die *2-way analysis of variance* (ANOVA) sowie der *Tukey's multiple comparison test* mit den unter 3.2 beschriebenen Standardabweichungen und Mittelwerten verwendet.

### **2.2.5.1 MDCK II-Zellen**

Für die MDCK II-Zellen wurde der mit DAPI belichtete Zellkern in blau gefärbt, die mit GFP-belichteten Bilder grün und die mit dem HcRed oder Cy3 bzw. Cy5 Filter belichteten Bilder in rot.

### **2.2.5.2 Cos7-Zellen**

Für die cos7-Zellen wurde ebenfalls der mit DAPI belichtete Zellkern in blau eingefärbt. Um eine bessere farbliche Unterscheidung der einzelnen Organellen zu Umod und GLUT9 zu ermöglichen, wurden in der Dreifach-Färbung die mit GFP-belichteten Bilder in grün, die mit Cy5 belichteten Bilder in magenta und die mit Cy3-belichteten Bilder in rot eingefärbt.

Die Farbintensitäten der einzelnen Bilder wurden mit Hilfe des Bearbeitungsprogrammes so einander angeglichen, dass sie nahezu gleich waren und ein gutes Kontrast-Rausch-Verhältnis mit wenig Hintergrundfluoreszenz gegeben war. Beim Fusionieren der Bilder konnte dann eine Kolokalisation durch Überlagerung der Farben überprüft werden.

## **2.2.6 Subklonierung und Vervielfältigung von Plasmid DNA**

Bei der Subklonierung von Plasmid DNA wird vorhandene DNA (Vektor und Ziel-DNA) mit spezifischen Restriktionsenzymen verdaut, auf ein Agarosegel aufgetragen und die benötigte DNA (Vektor und Ziel-DNA) aus dem Gel herausgeschnitten. Anschließend wird eine Ligation von Vektor und Ziel-DNA (Insert) durchgeführt.

### **2.2.6.1 Ligation**

Zur Vorbereitung der Ligation wurde ein Verdau angesetzt. Dazu wurden zu 1,5 µg DNA jeweils 10 bzw. 20 Units der benötigten Restriktionsenzyme hinzugegeben. Nach Zugabe von 3 µl des spezifischen Puffers (10x) wurde das Gemisch auf 30 µl mit *high performance liquid chromatography* (HPLC) H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Im Heizblock erfolgte die Inkubation für 3 Stunden bei 37 °C, wobei nach 2,5 Stunden 1 µl des Enzyms *Calf*

*Intestine Phosphatase* (CIP) zur Vektor-DNA hinzugefügt wurde. Ein 1,5 %-iges Agarosegel mit *low melting* Agarose wurde gegossen.

Anschließend wurden 15 µl der Proben in die Taschen eingefüllt und das Gel lief für 40 Minuten bei 85 mV. Die benötigten Banden wurden unter UV-Licht im *Imager* aus dem Gel herausgeschnitten und bei -20 °C asserviert. Die tiefgefrorenen Proben wurden bei 70 °C erwärmt. In einem Kontroll-Gefäß wurden 35 µl HPLC Wasser vorgelegt und 5 µl des 10x Puffer T4 DNA-Ligase hinzugegeben. Daraufhin wurden 0,4 µl der T4 DNA-Ligase und 2 µl des Vektors hinzugefügt. Aus diesem Kontroll-Gefäß wurden 21 µl in ein weiteres Gefäß für die Ligation überführt und 4 µl des Inserts hinzugegeben. Das Ligationsgemisch wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin bei -20 °C zur Aufbewahrung eingefroren.

#### **2.2.6.2 Transformation**

Die Transformation wird durchgeführt, um Plasmid-DNA zu amplifizieren. Die freie DNA wird in Bakterien eingeschleust und durch die Teilung dieser ebenfalls vervielfältigt. Da die eingeschleuste Plasmid-DNA Antibiotika-Resistenzen trägt, wachsen nur erfolgreich transformierte Bakterien auf mit Antibiotikum versetzten Agarplatten. Mit Hilfe der Maxi-Präparation wird die DNA aus den Bakterien isoliert.

Zur Herstellung des Transformationsgemisches wurden zu jeweils 5 µl der Ligation (Vektor+Insert) und der Kontrolle (Vektor) 50 µl des passenden Bakteriengemisches hinzugefügt. Für CDM8-Vektoren wurden *Ultracom MC1061 P3 E. coli* benutzt (Ampicillin/Tetrazyclin-Resistenz), für andere Vektor-DNA *Ultracom MC1061 E. coli* (Ampicillin-Resistenz).

Das Gemisch aus Plasmid-DNA und Bakterien wurde für 15 Minuten auf Eis gebracht. In dieser Zeit lagerte sich die Plasmid-DNA an die Zellwand der Bakterien an. Anschließend wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Dies diente zur Öffnung der bakteriellen Poren und zur Aufnahme der DNA in die Bakterien. Daraufhin wurde es für wenige Minuten wieder auf Eis gelagert, damit sich die Poren schlossen.

Beim Ausstreichen auf einer mit Antibiotikum beimpften Agarplatte wurde diese mit einer Markierung in zwei Hälften geteilt. Auf der einen Seite wurde der Ligationsansatz ausgestrichen, auf der anderen der Kontrollansatz. Die Agarplatten wurden über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C gelagert. Die Transformation war erfolgreich, wenn auf der Ligationsseite Bakterienkulturen angewachsen waren, auf der Kontrollseite jedoch nicht.

### **2.2.6.3 Mini-Kultur**

Zum Anlegen der Mini-Kulturen wurde am darauffolgenden Tag eine Lösung aus *lysogeny broth* (LB-) Medium und dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt. 3 ml dieser Lösung wurden in ein 15 ml Gefäß überführt. Daraufhin wurde eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt und in das Röhrchen überführt. Für 8 Stunden wurden die Röhrchen bei 37 °C bei 225 rpm geschüttelt, sodass sich das Medium durch das bakterielle Wachstum trüb färbte.

### **2.2.6.4 Maxi-Kultur**

Um Maxi-Kulturen anzulegen, wurden in sterile 500 ml Erlenmeyer-Kolben jeweils 200 ml LB-Medium und entsprechendes Antibiotikum gegeben. Aus den bebrüteten Mini-Kulturen wurden jeweils 200 µl in den entsprechenden Erlenmeyer-Kolben überführt. Die Maxi-Kulturen wurden dann über Nacht bei 37 °C bei 225 rpm geschüttelt, sodass sich das Medium trüb färbte.

### **2.2.6.5 Maxi Präparation**

Die DNA-Fällung wurde mit Hilfe des Plasmid Maxi Kits nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Bakteriensuspension aus den Erlenmeyer Kolben wurde bei 4 °C und 4150 g für 15 Minuten pelletiert und mit 10 ml des Puffers P1 resuspendiert. Zu diesem Gemisch wurden 10 ml des Puffers P2 (*Lysis Buffer*) hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 10 ml des Puffers P3 (*Neutralization Buffer*) zur Fällung der Proteine hinzugefügt, für 20 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 4150 g und 4 °C 1 Stunde lang zentrifugiert. Nach dieser Zeit wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Die Säulen zur DNA-Fällung wurden mit 10 ml des Puffers QBT (*Equilibration Buffer*) equilibriert und mit dem DNA-Gemisch gefüllt. Nach einem 2-maligen Waschvorgang mit je 30 ml QC-Puffer wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer (*Elution Buffer*) eluiert. Zu diesem Eluat wurden 10,5 ml 100 % Isopropanol hinzugegeben und nach kräftigem Schütteln erneut für 1 Stunde zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abdekantiert. Zu dem Pellet wurden 5 ml 70 %iges Ethanol hinzugegeben und für 15 Minuten zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abermals abdekantiert und das Pellet wurde über Nacht an der Luft getrocknet.

Am nächsten Morgen wurde es in 200 µl HPLC H<sub>2</sub>O aufgelöst und die Konzentration mit dem NanoDrop 2000c gemessen.

## **2.2.7 DNA-Gelelektrophorese**

Bei der DNA-Gelelektrophorese mit Ethidiumbromid werden Nukleinsäure in einem Agarosegel ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Nukleinsäuren und macht diese dadurch sichtbar.

Es wurde eine 1 %ige Agaroselösung erstellt und mit der entsprechenden Menge an Ethidiumbromid versetzt. Es wurden 10 µl DNA-Marker und jeweils 7 µl der Proben in die Taschen eingefüllt. Das Gel lief für 30 Minuten bei 90 mV. Anschließend wurde es im Imager mit der Software FluorChemFC2 entwickelt und die Bandengröße anhand der Markerbanden verifiziert.

## **2.2.8 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot**

### **2.2.8.1 SDS-Gelelektrophorese**

Zur Gelelektrophorese wurde SDS verwendet. Dieses dient dazu, die Faltung der Proteine aufzulösen, sodass diese im linearen Zustand vorliegen. Zudem überdeckt es mit seiner negativen Ladung die Eigenladungen der Proteine, damit diese nur in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt werden und zur Anode wandern.

Zuerst wurde das Trenn-, dann das Sammelgel zwischen zwei Glasplatten gegossen. Ein Kamm mit vorgeformten Taschen wurde in das Sammelgel geschoben. Nach Aushärten des Gels konnte dieser entfernt und das Gel in die entsprechende Halterung gespannt werden. Die Taschen wurden mit Laufpuffer gesäubert und mit 10 µl der Probe bzw. 5 µl des Proteinmarkers beladen. Die Kammer wurde mit Laufpuffer gefüllt. Die Proteine liefen für 30 Minuten bei 70 V in Richtung der Anode und wurden daraufhin im Trenngel voneinander separiert. Dieser Vorgang dauerte 90 Minuten bei 20 mA. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Western Blot durchgeführt.

### **2.2.8.2 Western Blot**

Mit dieser Methode werden Proteine von einem SDS-Gel durch eine horizontal angelegte Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen.

Die Blot-Vorrichtung wurde dabei in eine mit methanolhaltigem Transferpuffer gefüllte Kammer gehängt und lief bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA für 90 Minuten.

Nach dem Blotten wurde die Membran in 5 % BSA in Waschpuffer bei 37 °C für 60 Minuten bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das Albumin im BSA wurde dazu benutzt, um an unspezifische Bindungsstellen anzulagern und diese zu blockieren.

Die Chemilumineszenz-Reaktion diente anschließend dazu, bestimmte Strukturen mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen.

Die Antikörper wurden zuerst in Waschpuffer gelöst. Die Membran wurde daraufhin mit dem Primärantikörper in entsprechender Konzentration für 60 Minuten bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler bei 60 rpm inkubiert. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Membran 3-mal mit Proteinwaschpuffer für jeweils 5 Minuten auf dem Schüttler (60 rpm) gewaschen. Nach diesem Vorgang wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper in entsprechender Konzentration wiederum für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dieser Sekundärantikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (*Horseradish*-Peroxidase: HRP) gekoppelt. Dieses Enzym wurde dazu verwendet, um die Chemilumineszenzreaktion von Luminol zu katalysieren. Erneut erfolgte ein 3-maliger Waschvorgang. Daraufhin wurde die Visualisierungslösung ECL aus ECL-Lösung A und B im Verhältnis 1:1 hergestellt und auf die Membran geträufelt. Das Luminol in Lösung A wurde durch Wasserstoffperoxid in Lösung B und unter Katalysierung von HRP oxidiert und dadurch in einen energiereicheren Zustand versetzt. Durch Überführung in den Grundzustand wurden Photonen emittiert, welche von einer Fotokamera detektiert wurden. Mithilfe des Programms FluorChemFC2 wurden Bilder im Abstand von 1, 3 und 7 Minuten aufgenommen.

### 3 Ergebnisse

Wir stellten die Hypothese auf, dass das Wildtyp (WT)-Protein Uromodulin (Umod) korrekt im endoplasmatischen Retikulum (ER) prozessiert und gefaltet und daraufhin zum Golgi-Apparat transportiert wird. Dort wird es in Transportvesikel verpackt und zur Plasmamembran überführt, von der aus es in das Tubuluslumen sezerniert wird. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das WT-Protein ubiquitär in der Zelle vorhanden ist.

Im Gegenzug dazu gingen wir davon aus, dass mutiertes Umod P236L im ER fehlgefaltet wird und dort akkumuliert, sodass es nur zu geringen Anteilen an die Plasmamembran gelangt. Diese Fehlfaltung könnte zur der in der Einleitung beschriebenen *Unfolded Protein Response* mit konsekutiver Ausprägung des Krankheitsbildes der Autosomal Dominanten Tubulointerstitiellen Nierenerkrankung (ADTKD) führen.

Darüber hinaus vermuteten wir, dass der Harnsäuretransporter Glucosetransporter 9 (GLUT9) in Anwesenheit des Umod WT ebenfalls korrekt prozessiert wird und zur Plasmamembran gelangt, in welche er dann eingebaut werden kann. Im Gegensatz dazu gingen wir davon aus, dass GLUT9 in Anwesenheit des mutierten Proteins Umod P236L ebenso im ER retiniert wird und dort akkumuliert. Ein Einbau des Transporters in die Plasmamembran wäre vermindert und könnte die herabgesetzte Harnsäureexkretion von Patienten mit Umod P236L Mutation und daraus resultierender Hyperurikämie erklären.

Um eine Kolokalisation von Umod mit den einzelnen Organellen auf dem Weg zur Plasmamembran zu überprüfen und unsere Hypothese der Akkumulation des mutierten Proteins im ER zu untersuchen, wurden MDCK II-Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, zuerst gegen das Protein und gegen die jeweilige Organelle immunzytochemisch gefärbt. Die Versuche wurden jeweils drei Mal wiederholt. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie. Bei jedem Versuch wurden 100 Zellen mikroskopiert und pro Versuch 15-20 Zellen fotografiert. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ImageJ wurden die Bilder nachbearbeitet. Bei einer Kolokalisation erwarteten wir eine Gelbfärbung durch die Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz.

In Versuchen dieser Zelllinie sieht man keine Unterschiede zwischen Umod WT und Umod P236L bezüglich der Lokalisation in den verschiedenen Organellen und der Farbintensität. Sowohl Umod WT als auch Umod P236L finden sich homogen ubiquitär in der Zelle verteilt mit einer leicht vermehrten Anreicherung im ER. Eine Lokalisation

an der Plasmamembran ist hingegen in beiden Modellen kaum nachweisbar. Aus diesem Grund führten wir entsprechende Immunfluoreszenzversuche erneut mit cos7-Zellen durch und nutzten die Methode der Lipofektion, um eine Proteinüberexpression zu generieren. In dieser Versuchsreihe zeigen sich Unterschiede zwischen dem Wildtyp und dem mutierten P236L in Bezug auf Kolokalisation und Farbintensität in den einzelnen Organellen.

Um das unterschiedliche Verteilungsmuster des Harnsäuretransporters GLUT9 in Anwesenheit des jeweiligen Proteins genauer zu untersuchen, führten wir Dreifach-Färbungen des Proteins, der entsprechenden Organelle sowie zusätzlich des Transporters GLUT9 durch. In diesen Versuchen bestätigt sich die Vermutung, dass der Transporter in Anwesenheit des mutierten Proteins im ER zurückgehalten wird, während er in Anwesenheit des WT-Proteins an die Plasmamembran gelangt und dort eingebaut wird.

## **3.1 MDCK II-Zellen - Duale Färbungen**

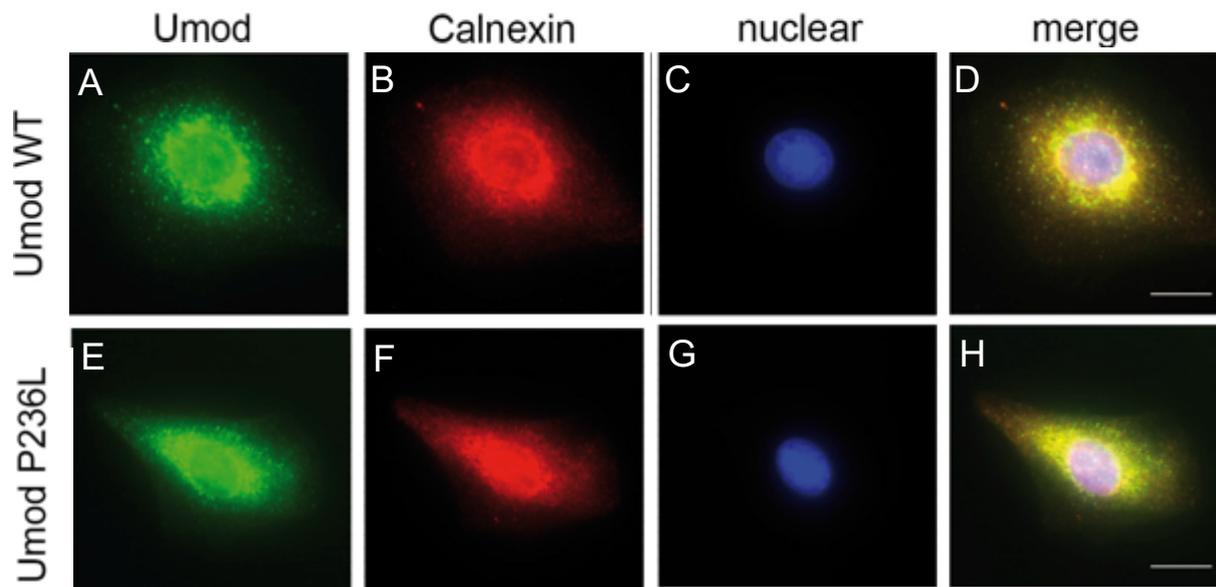
### **3.1.1 Endoplasmatisches Retikulum**

Es bestand die Vermutung, dass Umod P236L nach Translation im Endoplasmatischen Retikulum fehlgefaltet, dadurch nicht weiter zur Plasmamembran transportiert wird, und daher im ER verbleibt und dort akkumuliert.

Aufgrund dieser Vermutung erwarteten wir eine im Vergleich zum Umod-WT vermehrte Anreicherung von Umod P236L im ER.

In den nachfolgenden Bildern ist Umod in Grün (FITC) dargestellt, während das ER in Rot (anti-Calnexin, Texas Red) gefärbt ist. In Abbildung 6 imponiert sowohl im Fall von Umod WT als auch der Mutante Umod P236L ein homogenes und ubiquitäres Verteilungsmuster des Proteins. Im zusammengefügte Bild stellt sich eine Gelbfärbung der Zelle, vor allem perinukleär im Bereich des ER, dar. Diese Gelbfärbung, hervorgerufen durch die Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz, lässt eine Kolokalisation des Proteins mit dem ER vermuten.

Ein Unterschied zwischen Umod WT und Umod P236L bezüglich des Verteilungsmusters und der Farbintensität lässt sich jedoch nicht feststellen.

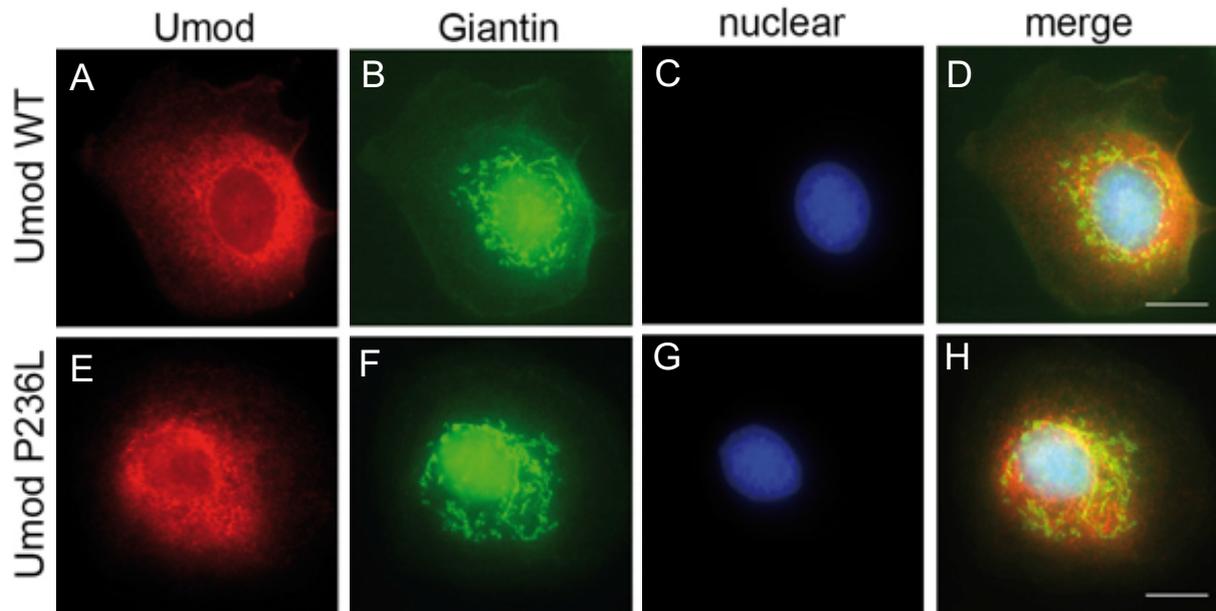


**Abb. 6: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung des ER**

100fache Vergrößerung. A-D: Umod-WT, E-H: Umod P236L. A, E: Umod ist mit dem Primärantikörper anti-THP und dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC in grün angefärbt. B, F: Das ER ist mit dem Primärantikörper anti-Calnexin und dem Sekundärantikörper Texas-Red Esel anti-Kaninchen rot gefärbt. C, G: Der Zellkern leuchtet durch DAPI blau. D, H: Zusammengefügtes Bild. Sowohl Umod WT als auch Umod P236L weisen ein homogenes Verteilungsmuster auf. Durch Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz entsteht eine Gelbfärbung sowohl in der Versuchsreihe des WT- als auch des mutierten Proteins Umod P236L. Dadurch lässt sich eine Kolokalisation des Proteins mit dem ER vermuten. Ein Unterschied in der Farbintensität lässt sich nicht erkennen. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

### 3.1.2 Golgi-Apparat

Um zu überprüfen, ob mutiertes Umod P236L auf dem Weg zur Plasmamembran im Golgi-Apparat akkumuliert, untersuchten wir eine mögliche Kolokalisation immunzytochemisch. Zur Anfärbung des Golgi-Apparates wurde ein bereits mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelter Antikörper (anti-Giantin, Alexa Fluor® 488) verwendet. Umod ist in diesem Fall mit einem rot fluoreszierenden Antikörper (Alexa Fluor® 555) gefärbt. In der anschließenden Bildbearbeitung ist Umod in dieser Versuchsreihe ebenfalls rot gefärbt. Erneut scheint sowohl Umod WT als auch Umod P236L homogen und ubiquitär in der Zelle verteilt zu sein. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, lässt sich teilweise eine Gelbfärbung im Bereich des Golgi-Apparates erkennen; eine Kolokalisation des Proteins mit dem Golgi-Apparat ist zu vermuten. Ebenfalls lässt sich bezüglich der Farbintensitäten kein Unterschied zwischen dem Umod Wildtyp und der Mutante Umod P236L erkennen.



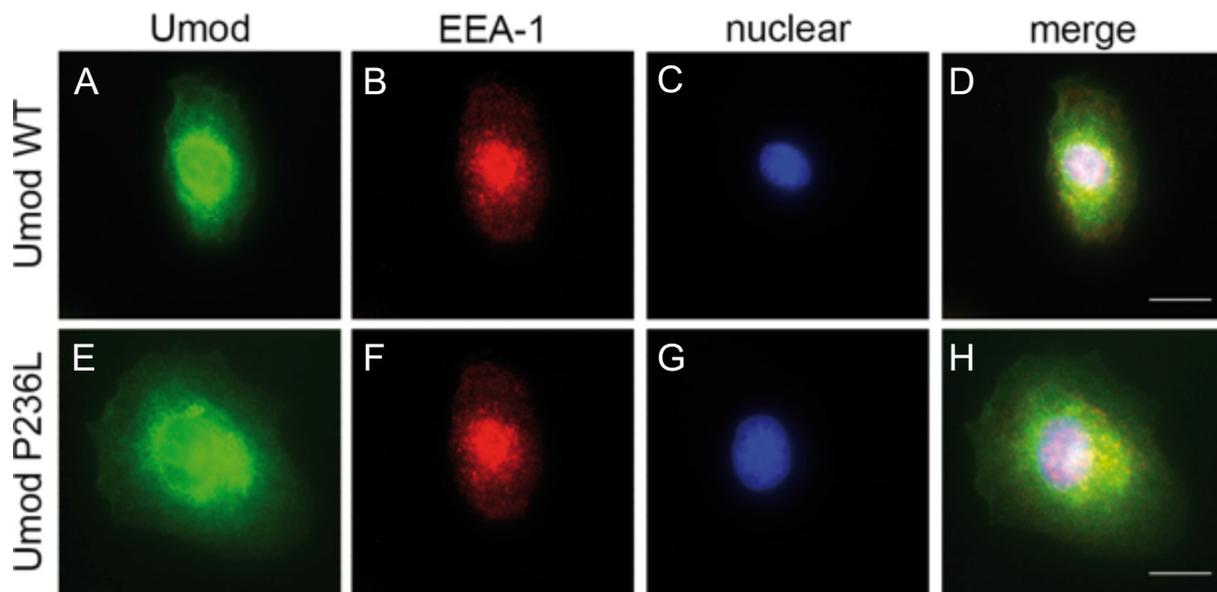
**Abb. 7: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung des Golgi-Apparates**

100fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Umod ist mit dem Primärantikörper anti-THP und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Maus angefärbt. B, F: Der Golgi-Apparat wurde mit dem schon an einen grünen Farbstoff gekoppelten Antikörper Alexa Fluor® 488 a-Giantin eingefärbt. C, G: Der Zellkern leuchtet mit DAPI blau. D, H: Zusammengefügtes Bild. Umod WT und Umod P236L zeigen beide ein homogenes Verteilungsmuster. In den zusammengefügt Bildern zeigt sich aufgrund der Gelbfärbung in beiden Fällen eine Kolokalisation des Proteins mit dem Golgi-Apparat. Ein Unterschied der Farbintensitäten lässt sich nicht erkennen. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

### 3.1.3 Endosomen

Um eine Kolokalisation Umods mit Endosomen zu untersuchen und um zu überprüfen, ob das mutierte Protein auf dem Weg zur Plasmamembran in den Endosomen akkumuliert, wurde Umod grün (FITC) und die Endosomen (anti-EEA1, Alexa Fluor® 647) rot gefärbt.

Ein homogenes subzelluläres Verteilungsmuster sowohl des Umod WT-Proteins als auch der Mutante Umod P236L ist in Abbildung 8 erkennbar. In diesen Versuchen lässt sich in den zusammengefügt Bildern eine Gelbfärbung im Bereich des ER sowie in einzelnen Vesikeln erkennen. Ein Unterschied zwischen Umod WT und Umod P236L lässt sich jedoch nicht feststellen. Eine Kolokalisation des Umod mit Endosomen ist in beiden Fällen angedeutet vorhanden.



**Abb. 8: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Endosomen**

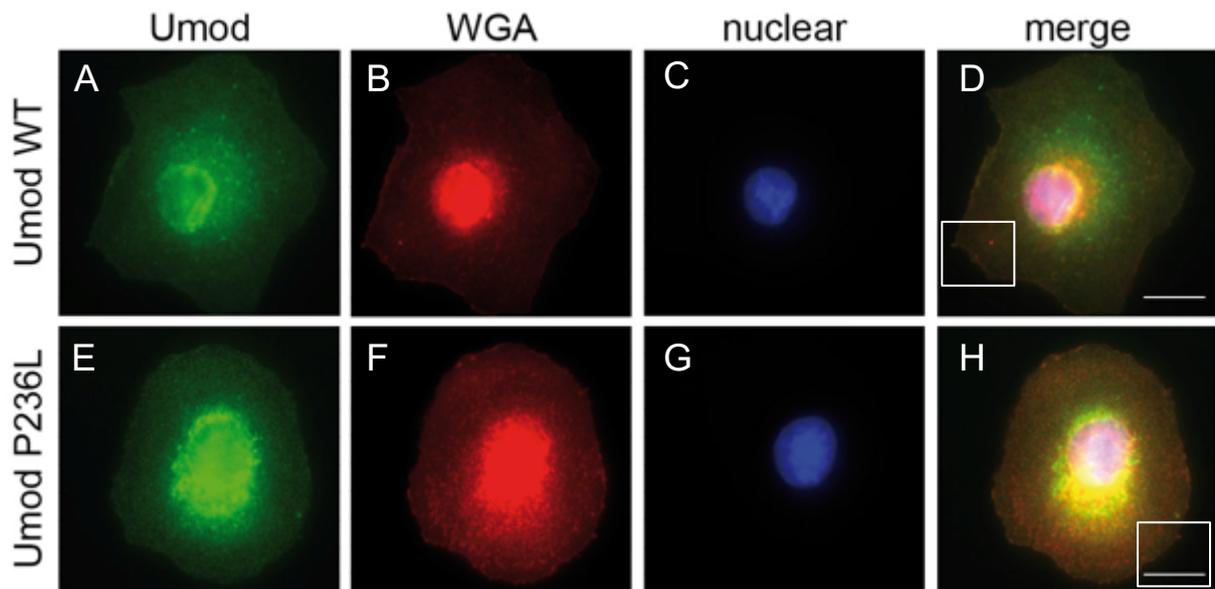
100fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Umod ist mit dem Primärantikörper anti-THP und dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC in grün angefärbt. B, F: Die Endosomen sind mit dem Primärantikörper anti-EEA1 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Kaninchen rot angefärbt. C, G: Der Zellkern leuchtet mit DAPI blau. D, H: Zusammengefügtes Bild. Sowohl Umod WT als auch Umod P236L sind homogen ubiquitär in der Zelle verteilt. In den überlagerten Bildern lässt sich im Bereich des ER und in einzelnen Vesikeln eine Gelbfärbung erkennen. Eine Kolo-kalisation von Umod mit Endosomen ist angedeutet vorhanden. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

### 3.1.4 Plasmamembran

Umod wird nach Reifung im ER und dem Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert und von dort aus in das Tubuluslumen sezerniert. Aufgrund dessen vermuteten wir eine vermehrte Lokalisation von Umod WT an der Plasmamembran und eine im Vergleich dazu verminderte Lokalisation von Umod P236L.

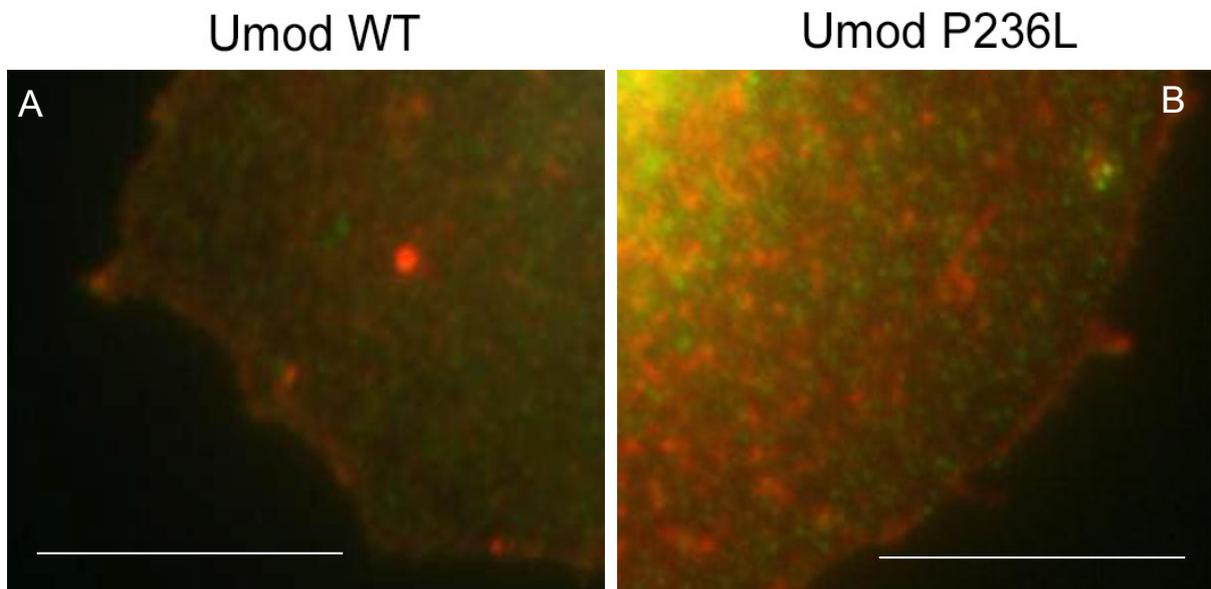
In diesen Versuchen wurde zuerst die Plasmamembran mit *Wheat Germ Agglutinin* (Alexa Fluor® 555) rot angefärbt. Nach Permeabilisation der Membran wurde Umod grün (FITC) gefärbt.

Wie auch in den Versuchen zuvor, zeigt sich auch hier sowohl im Fall von Umod WT als auch Umod P236L ein homogenes ubiquitäres Verteilungsmuster. In dem zusammengefügtten Bild in Abbildung 9 erkennt man weder bei WT-Umod noch bei der Mutante Umod P236L eine Gelbfärbung an der Plasmamembran. Auch in dem vergrößerten Zellausschnitt der Plasmamembran in Abbildung 10 lässt sich in beiden Fällen keine Gelbfärbung erkennen und somit keine Kolo-kalisation mit der Plasmamembran darstellen.



**Abb. 9: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Plasmamembran**

100fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Umod ist mit dem Primärantikörper anti-THP und dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC in grün angefärbt. B, F: Die Plasmamembran ist mit *Wheat Germ Agglutinin* Alexa Fluor® 555 rot gefärbt. C, G: Der Zellkern leuchtet mit DAPI blau. D, H: Zusammengefügtes Bild. Sowohl in den Versuchen mit Umod WT als auch der Mutante Umod P236L ist das Protein ubiquitär homogen in der Zelle verteilt. In der Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz erkennt man weder in den Versuchen mit Umod WT noch mit Umod P236L eine Gelbfärbung an der Plasmamembran. Somit ist eine Kolokalisation des Proteins mit der Membran nicht zu erkennen. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.



**Abb. 10: Immunfluoreszenz von MDCK II-Zellen mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt**

A. Umod WT, B. Umod P236L, zusammengefügtes Bild. Umod ist mit dem Primärantikörper anti-THP und dem Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC in grün angefärbt. Die Plasmamembran ist mit *Wheat Germ Agglutinin* Alexa Fluor® 555 rot gefärbt. Weder im Versuch mit dem WT-Protein noch mit dem mutierten Protein lässt sich eine Gelbfärbung und somit eine Kolokalisation an der Plasmamembran erkennen. Maßstab: 10 µm. µm = Mikrometer.

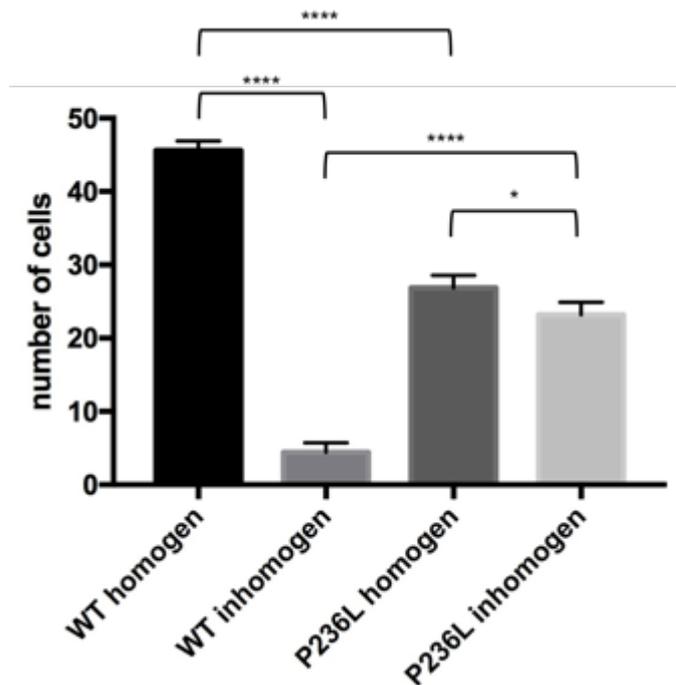
## 3.2 Cos7-Zellen

Nachdem in der Versuchsreihe mit stabil exprimierenden MDCK II-Zellen kein Unterschied bezüglich der Farbintensitäten und der Lokalisation zwischen Umod WT und Umod P236L zu erkennen war, wurden die Versuche mit cos7-Zellen durchgeführt. In diesem Fall wurde die Methode der Lipofektion genutzt. Wir vermuteten, dass durch die daraus resultierende Proteinüberexpression das WT-Protein und die Mutante Umod P236L besser gefärbt werden konnten.

Auch in dieser Versuchsreihe erfolgte die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie und die Bildbearbeitung mit Hilfe des Programms ImageJ. Die Versuche wurden wieder jeweils drei Mal wiederholt. Bei jedem Versuch wurden 100 Zellen mikroskopiert und pro Versuch 15-20 Zellen fotografiert. Da sich beim Mikroskopieren ein verschiedenes Verteilungsmuster des Umod sowohl beim WT- als auch beim mutierten Protein zeigte, wurden sowohl für Umod WT als auch Umod P236L pro Versuch jeweils 50 Umod-WT und 50 Umod P236L-Zellen verblindet ausgezählt und das entsprechende homogene oder inhomogene Verteilungsmuster notiert und statistisch ausgewertet. Es zeigte sich, dass Umod WT fast ausschließlich ein homogenes und kaum ein inhomogenes Verteilungsmuster in der Zelle aufwies ( $n=1200$ ,  $p<0,0001$ ). Darüber hinaus zeigte sich dieses homogene Verteilungsmuster im Fall von Umod WT signifikant häufiger als im Fall der Mutante Umod P236L ( $n=1200$   $p<0,0001$ ). Mutiertes Umod P236L zeigte sich häufiger, jedoch mit einer geringeren Signifikanz, homogen ( $26,8\pm 1,3$ ) statt inhomogen ( $23,2\pm 1,8$ ) verteilt ( $n=1200$   $p<0,05$ ).

Besonders auffällig war jedoch das deutlich signifikant häufiger auftretende inhomogene Verteilungsmuster der Mutante Umod P236L, welches im Gegensatz im Fall von Umod WT kaum nachzuweisen war ( $n=1200$ ,  $p<0,0001$ ). Dies ist in Abbildung 11 dargestellt.

Diese heterogene, perinukleäre Lokalisation stellte einen neuen, andersartigen Befund dar; daher werden im Folgenden entsprechende Bilder für Umod P236L exemplarisch gezeigt.



**Abb. 11: Quantitative Auswertung Umod WT oder Umod P236L exprimierender cos7-Zellen**

Es wurden insgesamt 12 Versuche durchgeführt. Pro Versuch wurden jeweils 50 WT-exprimierende Zellen und 50 Umod P236L-exprimierende Zellen ausgezählt und nach dem subzellulären Verteilungsmuster von Umod in homogen oder inhomogen eingeteilt. Es zeigt sich, dass das Umod WT signifikant häufiger homogen als inhomogen in der Zelle verteilt ist. Ebenso ist es signifikant häufiger homogen verteilt als die Mutante Umod P236L. Hingegen ist das mutierte Protein Umod P236L signifikant häufiger inhomogen verteilt als Umod WT, jedoch ebenso weniger häufig inhomogen verteilt als homogen. (n=1200, \*\*\*\*p<0,0001, \*p<0,05).

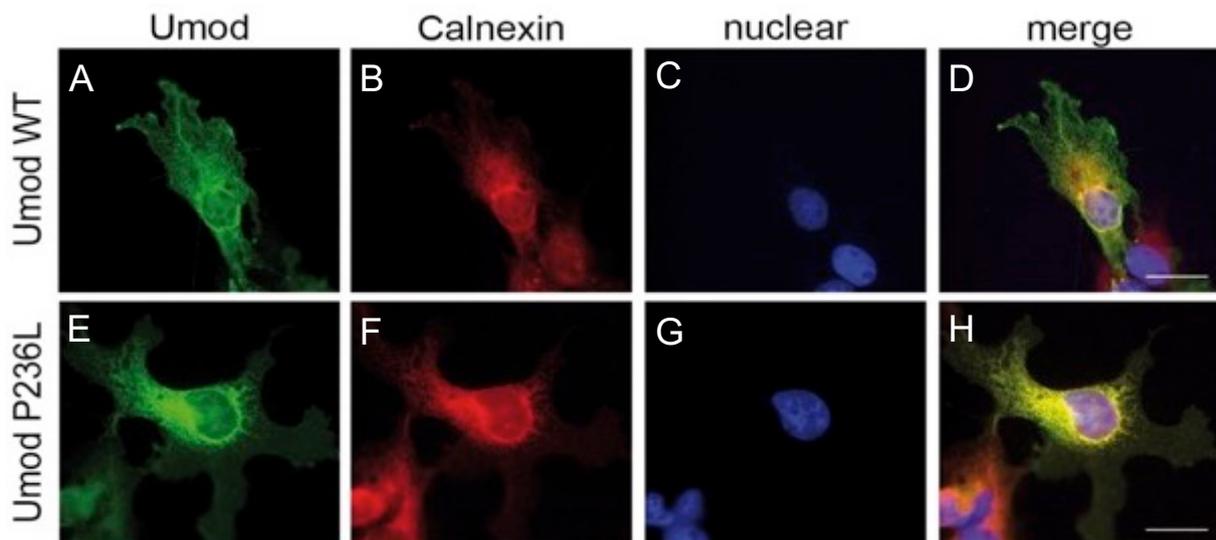
## 3.2.1 Duale Färbungen

### 3.2.1.1 Endoplasmatisches Retikulum

Umod wurde in dieser Versuchsreihe erneut grün (FITC) gefärbt. Die Färbung des ER erfolgte in Rot (anti-Calnexin, Texas Red).

In der Umod-Färbung zeigt sich bereits ein unterschiedliches Verteilungsmuster von Umod WT und Umod P236L. Umod WT ist homogen und ubiquitär in der Zelle verteilt und zeigt eine leichte Gelbfärbung perinukleär. Währenddessen scheint Umod P236L vermehrt ebenfalls um den Nukleus im Bereich des ER verteilt zu sein und dort eine deutlich stärkere Farbintensität als Umod WT aufzuweisen. Diese Farbintensität nimmt in Richtung Plasmamembran hin ab.

Zudem zeigt sich im zusammengeführten Bild der Abbildung 12 eine deutliche Gelbfärbung im Sinne einer Kolo-kalisation in dem Bereich des ER.



**Abb. 12: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung des ER**

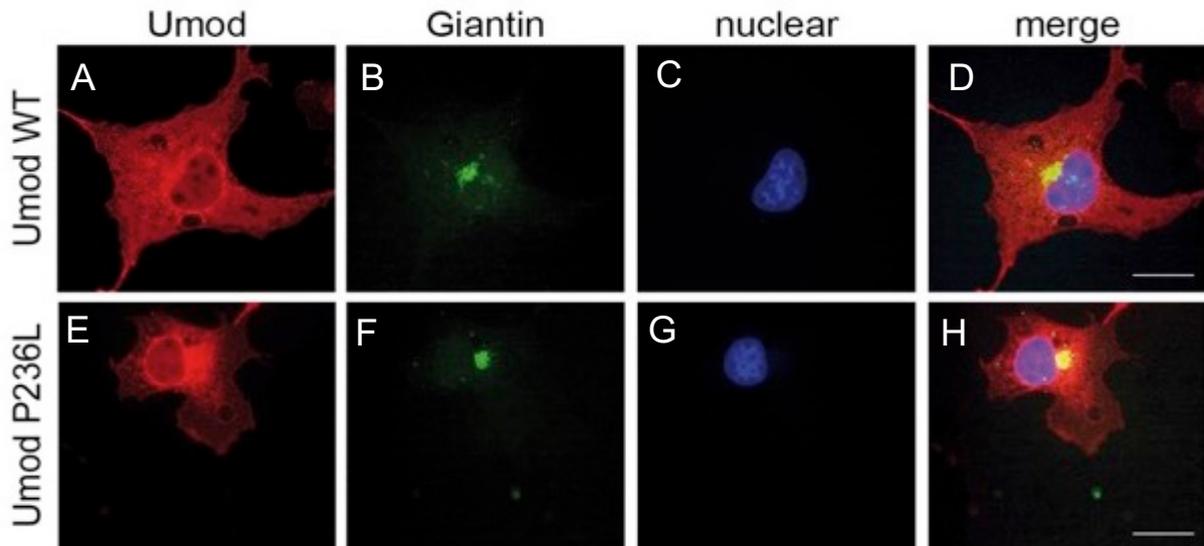
63fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC. B, F: Färbung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit dem Primärantikörper anti-Calnexin und dem Sekundärantikörper TexasRed Esel anti-Kaninchen. C, G: Färbung des Zellkerns mit DAPI. D, H: Zusammengefügtes Bild. Umod WT scheint ubiquitär und homogen in der Zelle verteilt zu sein, während Umod P236L eine deutliche Farbanreicherung um den Nukleus im Bereich des ER zeigt. In Richtung Plasmamembran nimmt die Farbintensität hingegen ab. Im Fall des Wildtyps lässt sich eine geringe Gelbfärbung und Kolokalisation im Bereich des ER erkennen. Im Fall der Mutante kommt es bei Überlagerung der Bilder zu einer deutlichen Gelbfärbung. Somit lässt sich in diesem Fall eine Kolokalisation von Umod P236L mit dem ER bestätigen. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

### 3.2.1.2 Golgi-Apparat

Um zu überprüfen, ob es zu einer Kolokalisation Umods mit dem Golgi-Apparat kommt, wurde Umod rot (Alexa Fluor® 555) gefärbt. Zur Anfärbung des Golgi-Apparates wurde ein bereits mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Antikörper (anti-Giantin, Alexa Fluor® 488) verwendet.

Auch in diesen Versuchen scheint Umod WT homogen und ubiquitär in der Zelle verteilt zu sein, während Umod P236L vor allem perinukleär und weniger an der Plasmamembran eine verstärkte Farbintensität zeigt.

In diesen Versuchen zeigt sich in Abbildung 13 sowohl in den Färbungen mit Umod-WT als auch mit der Umod-Mutante P236L eine partielle Gelbfärbung und Kolokalisation. Im Fall des WT-Proteins lässt sich dies dadurch erklären, dass korrekt prozessiertes Umod vom ER zum Golgi-Apparat transportiert wird, um von dort aus in Transportvesikel verpackt und zur Plasmamembran transportiert zu werden. Eine Kolokalisation des mutierten Proteins Umod P236L mit dem Golgi-Apparat könnte durch die räumliche Nähe der Organelle zum ER zustande kommen.



**Abb. 13: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung des Golgi-Apparates**

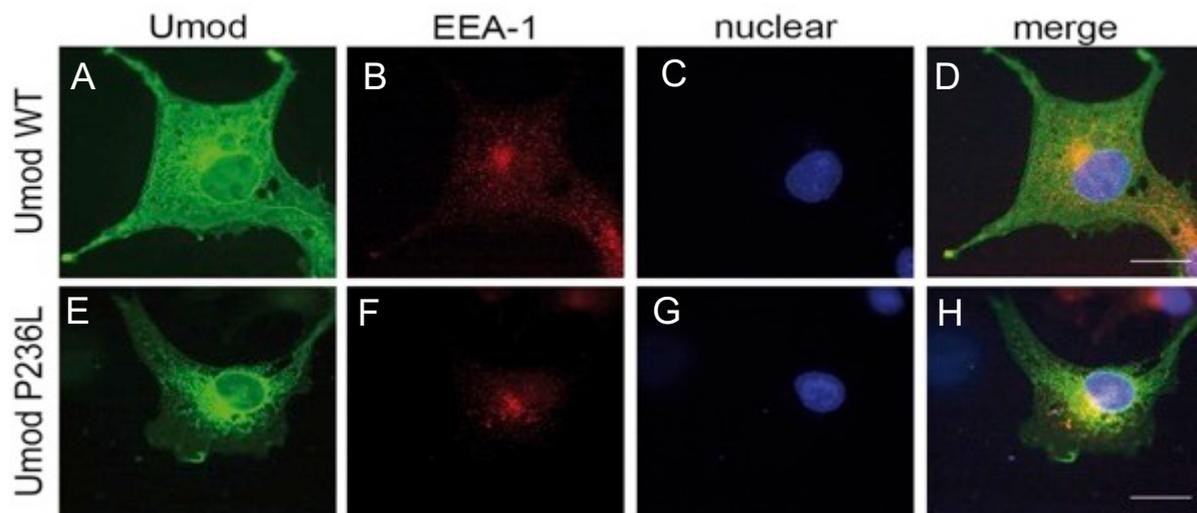
63fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 anti-Maus. B, F: Färbung des Golgi-Apparates mit Alexa Fluor® 488 anti-Giantin C, G: Färbung des Zellkerns mit DAPI. D, H: Zusammengesetztes Bild. Umod WT ist homogen in der Zelle verteilt, während Umod P236L auch in diesem Fall um den Zellkern herum verteilt zu sein scheint. Sowohl in der Färbung mit dem Wildtyp-Protein als auch mit der Mutante Umod P236L zeigt sich eine Gelbfärbung des Golgi-Apparates. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das WT-Protein im regulären Transportweg im Golgi-Apparat weiterverarbeitet und in Transportvesikel verpackt wird. Vermutlich kommt es im Fall der Mutante Umod P236L durch die räumliche Nähe von ER und Golgi-Apparat ebenfalls zur partiellen Anfärbung. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

### 3.2.1.3 Endosomen

Um auch in den cos7-Zellen eine Kolo-kalisation Umods mit den Endosomen zu untersuchen und zu überprüfen, ob das Protein auf dem Weg zur Plasmamembran in den Transportvesikeln akkumuliert, wurde Umod in Grün eingefärbt (FITC). Die Endosomen wurden rot gefärbt (anti-EEA1, Alexa Fluor® 647).

Wie Abbildung 14 darstellt, zeigt sich Umod WT wieder homogen in der Zelle verteilt, während Umod P236L perinukleär verteilt zu sein scheint.

Im Fall des WT-Umod lässt sich in einigen Vesikeln eine Gelbfärbung und somit eine Kolo-kalisation erkennen. Korrekt prozessiertes WT-Umod wird in Transportvesikel verpackt und an die Plasmamembran transportiert. Im Fall des mutierten Proteins Umod P236L lassen sich ebenfalls einige, wenn auch deutlich weniger gelb gefärbte Vesikel erkennen. Vermutlich wird auch ein gewisser Teil des fehlprozessierten mutierten Umod P236L in Vesikel verpackt und gelangt dadurch an die Plasmamembran.



**Abb. 14: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Endosomen**

63fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC. B, F: Färbung der Endosomen mit dem Primärantikörper anti-EEA1 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Kaninchen. C, G: Färbung des Zellkerns mit DAPI. D, H: Zusammengefügtes Bild. Umod WT scheint ubiquitär in der Zelle verteilt zu sein, Umod P236L hingegen verstärkt um den Zellkern herum. In der Färbung mit dem WT-Umod lässt sich eine Gelbfärbung und somit eine Kolokalisation in einigen Vesikeln erkennen. Auch in der Färbung mit der Mutante Umod P236L sieht man einige wenige gelb gefärbte Vesikel. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

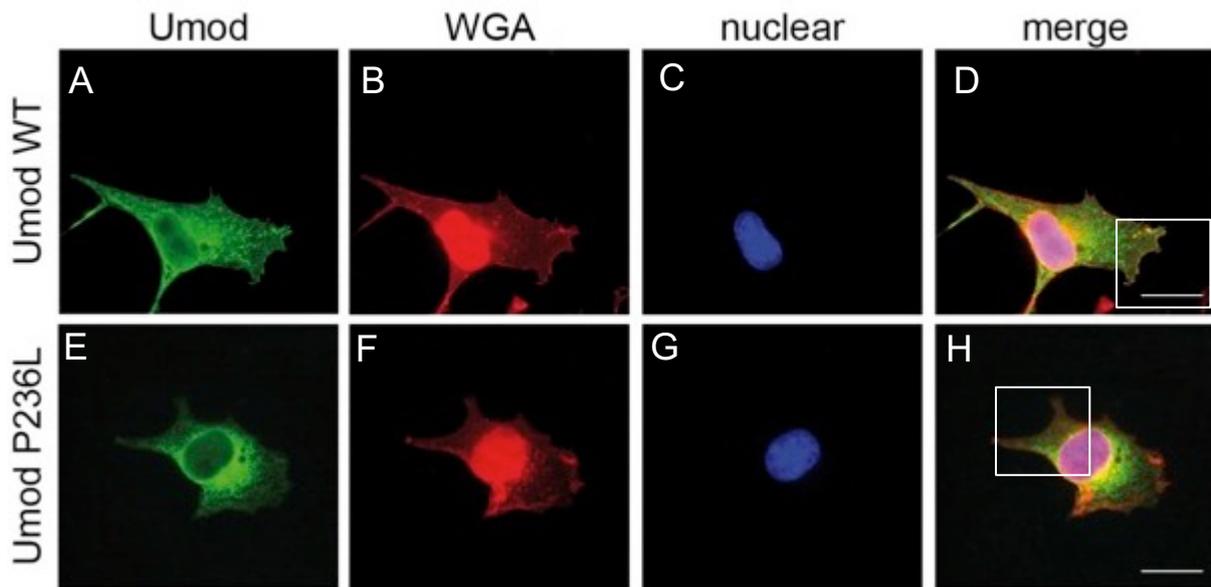
**3.2.1.4 Plasmamembran**

Zur Überprüfung, ob eine Kolokalisation von Umod mit der Plasmamembran vorliegt, wurde in diesen Versuchen zuerst die Plasmamembran rot (*Wheat Germ Agglutinin*, Alexa Fluor® 555) angefärbt. Nach Permeabilisation der Membran wurde Umod grün (FITC) gefärbt.

Im zusammengefügtten Bild scheint Umod WT wieder homogen in der Zelle verteilt zu sein, Umod P236L hingegen erneut eher perinukleär.

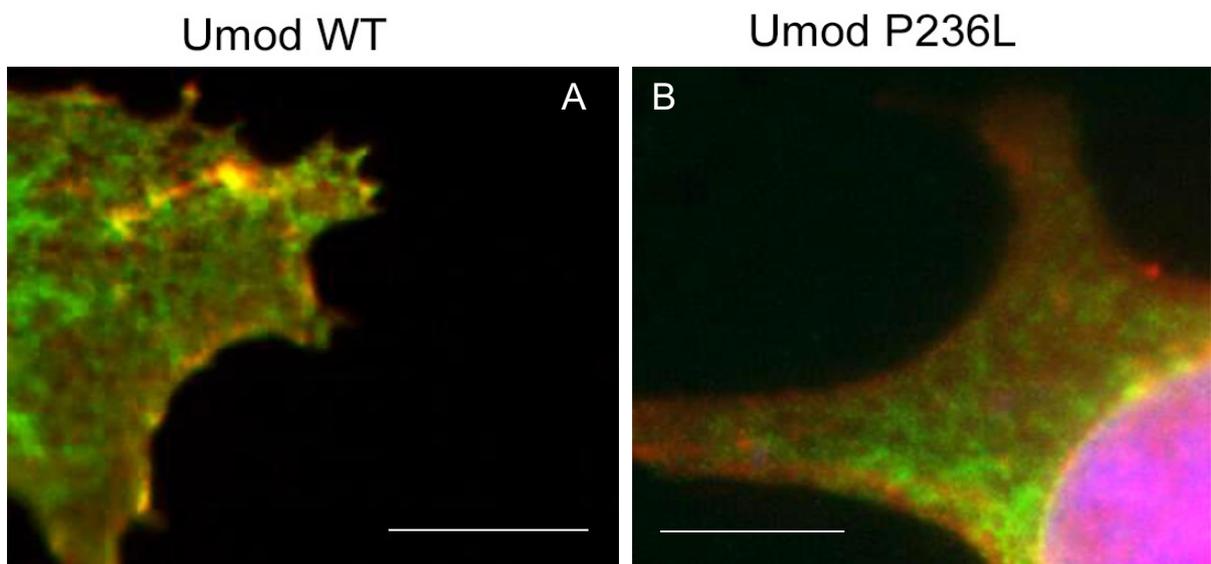
Im Fall von Umod WT kommt es an der Plasmamembran zu einer Gelbfärbung im zusammengefügtten Bild der Abbildung 15. Daher lässt sich dort eine Kolokalisation erkennen. In der Versuchsreihe von Umod P236L lässt sich an der Plasmamembran keine Gelbfärbung erkennen, wodurch sich keine Kolokalisation vermuten lässt. Dies bekräftigt die Hypothese, dass mutiertes Umod P236L durch Fehlfaltung in subzellulären Strukturen akkumuliert und nicht an die Plasmamembran transportiert werden kann.

In dem vergrößerten Zellausschnitt der Plasmamembran in Abbildung 16 bestätigt sich das Ergebnis des Versuches. Eine Gelbfärbung und somit eine Kolokalisation mit dem WT-Protein sind zu erkennen, während es im Fall des mutierten Proteins Umod P236L zu keiner Gelbfärbung an der Plasmamembran bzw. Kolokalisation kommt.



**Abb. 15: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Plasmamembran**

63fache Vergrößerung. A-D: Umod WT, E-H: Umod P236L. A, E: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper anti-Maus-IgG-FITC. B, F: Färbung der Plasmamembran mit *Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor® 555* C, G: Färbung des Zellkerns mit DAPI. D, H: Zusammengefügtes Bild. Umod WT ist homogen in der gesamten Zelle verteilt, während Umod P236L um den Zellkern herum eine verstärkte Farbintensität aufweist. Im Fall von Umod WT lässt sich eine Gelbfärbung und somit Kolokalisation des WT-Proteins mit der Plasmamembran erkennen. Im Fall der Mutante Umod P236L kommt es bei Überlagerung der Bilder zu keiner Gelbfärbung. Somit lässt sich in diesem Fall keine Kolokalisation des mutierten Proteins Umod P236L mit der Plasmamembran zeigen. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.



**Abb. 16: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt.**

63fache Vergrößerung. A. Umod WT, B. Umod P236L, zusammengefügtes Bild. Umod ist mit dem Primär-Antikörper *UMOD purified MaxPab* und dem Sekundär-Antikörper anti-Maus-IgG-FITC in grün angefärbt. Die Plasmamembran ist mit *Wheat Germ Agglutinin Alexa Fluor® 555* in rot gefärbt. Im Versuch mit dem WT-Protein lässt sich eine Gelbfärbung an der Plasmamembran erkennen und zeigt eine Kolokalisation. Im Fall des mutierten Proteins Umod P236L lässt sich keine Gelbfärbung erkennen, Hinweise für eine Kolokalisation ergeben sich somit nicht. Maßstab: 10 µm. µm = Mikrometer.

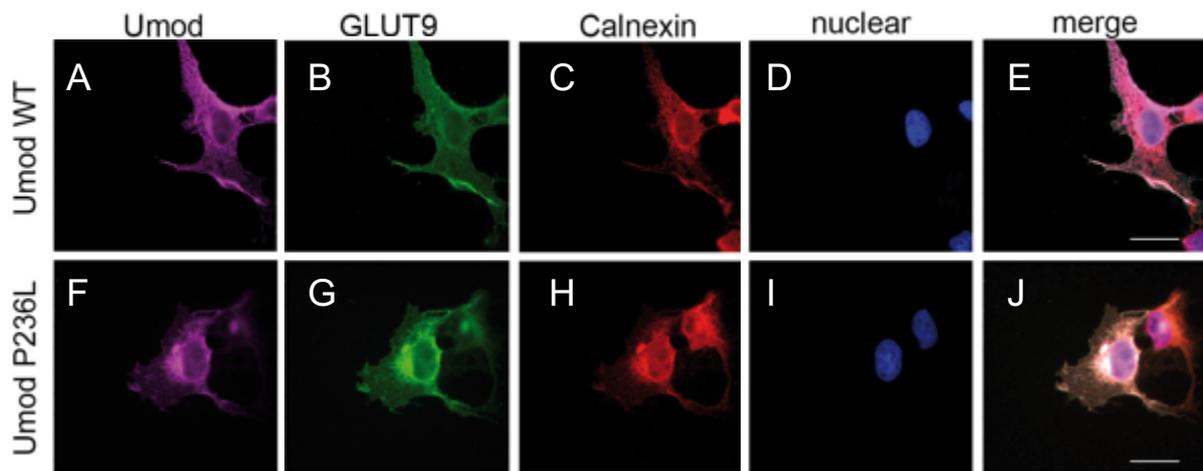
### **3.2.2 Triple-Färbung**

Wir vermuteten, dass GLUT9 in Anwesenheit des WT-Proteins ubiquitär in der Zelle verteilt zu finden ist, während der Transporter in Anwesenheit der Mutante Umod P236L im ER zurückbleibt. Dazu wurden die Zellen bereits bei der Transfektion mit GLUT9 sowie entweder Umod-WT oder der Mutante Umod P236L cotransfiziert. Im nächsten Schritt führten wir Dreifach-Färbungen von Umod, der jeweiligen Organelle sowie dem Harnsäuretransporter GLUT9 durch. Jeder Versuch wurde drei Mal wiederholt. Die Bilder wurden anschließend ebenfalls mit ImageJ bearbeitet.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden für die Dreifachfärbungen die Farbspektren bewusst so gewählt, um eine Überlappung dieser zu vermeiden und somit eine eindeutige Zuordnung der Farbemission von Umod und GLUT9 zu gewährleisten.

#### **3.2.2.1 Endoplasmatisches Retikulum**

Zur besseren Übersicht ist Umod magenta (Alexa Fluor® 647), GLUT9 grün (anti-GLUT9, Alexa Fluor® 488) und das ER rot (anti-Calnexin, Alexa Fluor® 555) eingefärbt. Man erkennt in der Versuchsreihe des WT-Proteins eine Rosafärbung durch Überlagerung von magenta und grün, jedoch keine Weißfärbung durch Kolo-kalisation aller drei Komponenten. Dies lässt vermuten, dass der Transporter in Anwesenheit des WT-Proteins ebenfalls ubiquitär in der Zelle verteilt ist. In Anwesenheit der Mutante Umod P236L jedoch kommt es zu einer Weißfärbung perinukleär, was für eine Kolo-kalisation mutierten Proteins Umod P236L mit dem Transporter im ER spricht. Dies deutet darauf hin, dass GLUT9 in Anwesenheit von Umod P236L ebenfalls im ER gefangen bleibt und nicht zur Plasmamembran transportiert werden kann. Diese Ergebnisse zeigt folgende Abbildung 17.

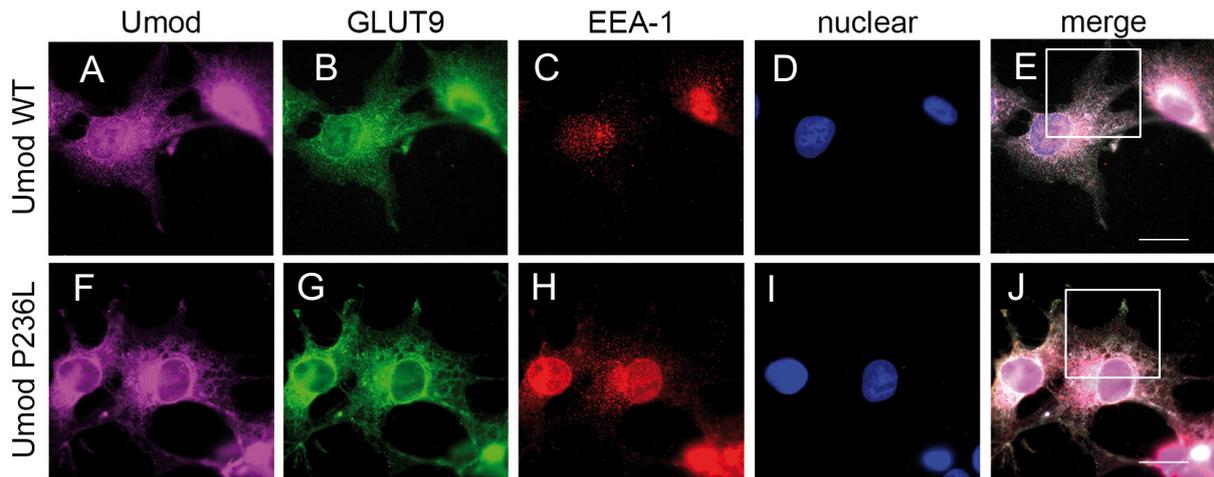


**Abb. 17: Immunfluoreszenz von *cos7*-Zellen, *Triple-Färbung* mit Färbung des ER**

63fache Vergrößerung. A-E: Umod-WT, F-J: Umod P236L. A, F: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus, eingefärbt in Magenta. B, G: Färbung des Harnsäuretransporters GLUT9 mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege. C, H: Färbung des ER mit dem Primärantikörper anti-Calnexin und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen. D, I: Färbung des Zellkerns mit DAPI. E, J: Zusammengefügte Bilder. Im Fall des WT-Proteins lässt sich eine Rosafärbung durch Kolokalisation des Transporters mit Umod erkennen, eine Kolokalisation mit dem ER lässt sich durch fehlende Weißfärbung nicht vermuten. Im Fall des Proteins P236L kommt es zu einer deutlichen Weißfärbung im Bereich des ER. Eine Kolokalisation des mutierten Proteins Umod P236L und GLUT9 mit dem ER ist in diesem Fall wahrscheinlich. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.

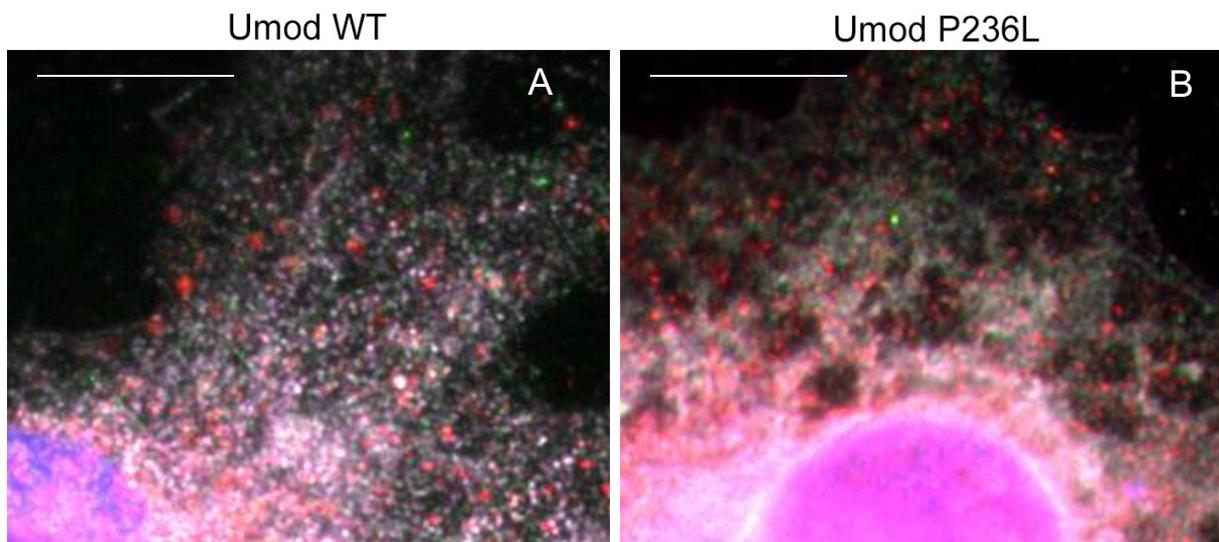
### 3.2.2.2 Endosomen

Wie auch in den Vorversuchen untersuchten wir ebenfalls die Kolokalisation von Umod und GLUT9 mit Endosomen, um eine mögliche Akkumulation des Proteins mit dem Transporter in den Transportvesikeln auf dem Weg zur Plasmamembran zu untersuchen. Umod ist magenta (Alexa Fluor® 647), GLUT9 grün (anti-GLUT9, Alexa Fluor® 488) und die Endosomen rot (anti-EEA1, Alexa Fluor® 555) gefärbt. Sowohl in der Versuchsreihe mit dem WT-Protein als auch der Mutante Umod P236L zeigt sich im zusammengefügten Bild eine Rosafärbung, also eine Kolokalisation des Umod mit GLUT9. Ebenso sind im Fall des Umod-WT einige weiß gefärbte Vesikel zu erkennen, was für eine Kolokalisation von Umod und GLUT9 in den Vesikeln spricht. Auch im Fall des mutierten Umod P236L lassen sich einige, jedoch deutlich weniger, weiß gefärbte Transportvesikel erkennen. Eine geringe Kolokalisation findet auch in diesem Fall statt. Dies wird durch die Abbildungen 18 und 19 verdeutlicht.



**Abb. 18: Immunfluoreszenz von *cos7*-Zellen, Triple-Färbung mit Färbung der Endosomen**

63fache Vergrößerung. A-E: Umod-WT, F-J: Umod P236L. A, F: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus, eingefärbt in Magenta. B, G: Färbung des Harnsäuretransporters GLUT9 mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege. C, H: Färbung der Endosomen mit dem Primärantikörper anti-EEA1 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen. D, I: Färbung des Zellkerns mit DAPI in blau. E, J: Zusammengefügte Bilder. Man erkennt sowohl im Fall des WT-Proteins als auch des mutierten Proteins Umod P236L eine Rosafärbung; eine Kolokalisation von Umod und GLUT9 ist anzunehmen. Eine Weißfärbung und somit eine Kolokalisation mit den Transportvesikeln ist sowohl im Fall von Umod-WT und in wenigen Vesikeln auch im Fall von Umod P236L zu erkennen. Maßstab: 20  $\mu\text{m}$ .  $\mu\text{m}$  = Mikrometer.



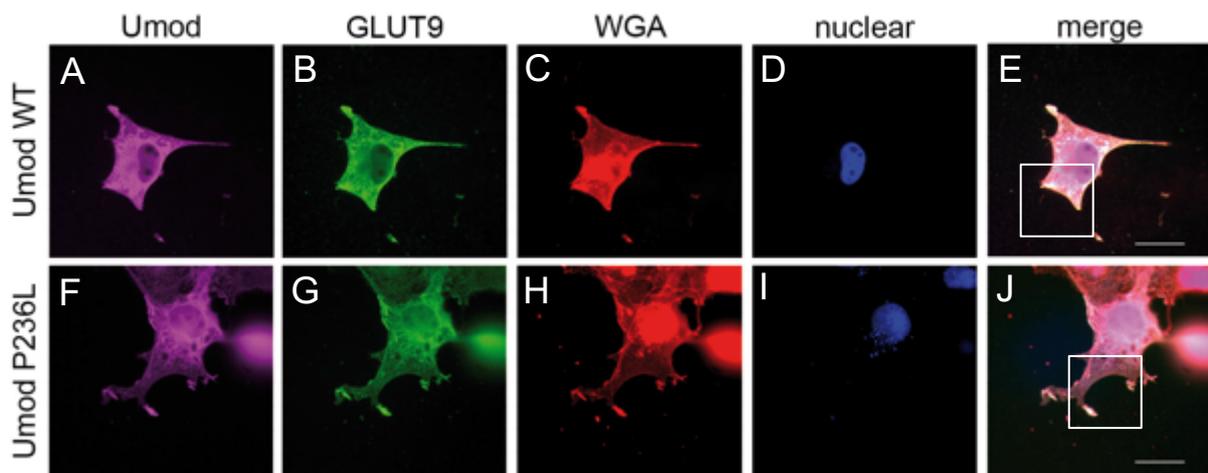
**Abb. 19: Immunfluoreszenz von *cos7*-Zellen, Triple-Färbung mit Färbung der Endosomen, vergrößerter Zellausschnitt**

A: Umod-WT, B: Umod P236L. Umod-Färbung mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus, eingefärbt in Magenta. Färbung des Harnsäuretransporters GLUT9 mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege. Färbung der Endosomen mit dem Primärantikörper anti-EEA1 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 555 Ziege anti-Kaninchen. Sowohl in der Färbung des WT-Proteins als auch des mutierten Proteins Umod P236L lässt sich eine Rosafärbung im Sinne einer Kolokalisation von Umod mit GLUT9 erkennen. Eine Kolokalisation mit den Transportvesikeln durch eine Weißfärbung ist sowohl im Fall von Umod-WT und in wenigen Vesikeln auch im Fall von Umod P236L zu erkennen. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ .  $\mu\text{m}$  = Mikrometer.

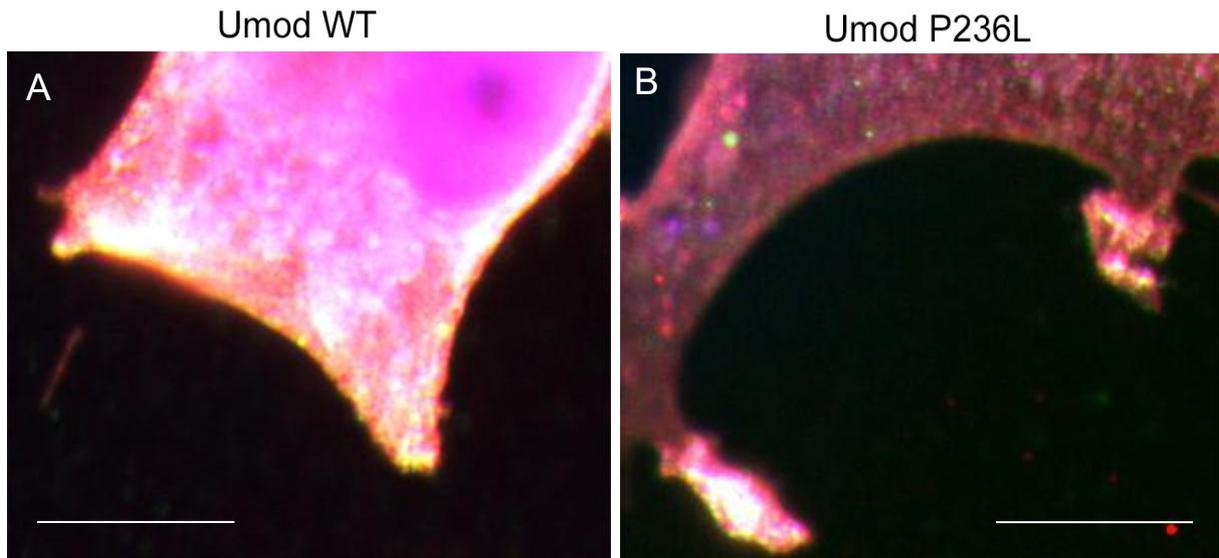
### 3.2.2.3 Plasmamembran

Laut unserer Hypothese würde man in Anwesenheit von Umod WT eine Verteilung von GLUT9 an der Plasmamembran erwarten. In Anwesenheit von Umod P236L wäre ebenfalls eine ER-Retention und -Akkumulation zu vermuten.

Zunächst wurde die Plasmamembran rot (*Wheat Germ Agglutinin*, Alexa Fluor® 555) gefärbt. Nach Permeabilisation der Membran wurde Umod (Alexa Fluor® 647) und anschließend der Transporters GLUT9 grün (anti-GLUT9, Alexa Fluor® 488) gefärbt. In Anwesenheit des WT-Umod lässt sich in dem zusammengefügte Bild in Abbildung 20 eine Weißfärbung an der Plasmamembran erkennen. Eine Kolokalisation des Proteins mit dem Transporter an der Membran ist zu vermuten. In Anwesenheit des mutierten Umod P236L lässt sich an der Plasmamembran eine geringe Weißfärbung erkennen. Es ergeben sich somit kaum Hinweise für eine Kolokalisation. Dies bekräftigt unsere Hypothese, dass der Transporter in Anwesenheit des mutierten Proteins Umod P236L ebenfalls im ER zurückgehalten wird. In den vergrößerten Zellausschnitten der Membran in Abbildung 21 lässt sich dieses Resultat genauer nachvollziehen.



**Abb. 20: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, Triple-Färbung mit Färbung der Plasmamembran** 63fache Vergrößerung. A-E: Umod-WT, F-J: Umod P236L. A, F: Färbung von Umod mit dem Primärantikörper *UMOD purified MaxPab*, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus, eingefärbt in Magenta. B, G: Färbung des Harnsäuretransporters GLUT9 mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege. C, H: Färbung der Plasmamembran mit WGA Alexa Fluor® 555. D, I: Färbung des Zellkerns mit DAPI. E, J: Zusammengefügte Bilder. Man erkennt im Fall des WT-Proteins eine Weißfärbung an der Plasmamembran mit dem Hinweis auf eine dortige Kolokalisation von Umod mit GLUT9. Im Fall des mutierten Proteins Umod P236L lässt sich nur eine geringe Weißfärbung erkennen, somit ergeben sich in diesem Fall kaum Hinweise für eine Kolokalisation an der Plasmamembran. Maßstab: 20 µm. µm = Mikrometer.



**Abb. 21: Immunfluoreszenz von cos7-Zellen, Triple-Färbung mit Färbung der Plasmamembran, vergrößerter Zellausschnitt**

A: Umod-WT, B: Umod P236L. Umod-Färbung mit dem Primärantikörper UMOD purified MaxPab, Sekundärantikörper Alexa Fluor® 647 Ziege anti-Maus, gefärbt in magenta. Färbung des Harnsäuretransporters GLUT9 mit dem Primärantikörper anti-GLUT9 und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 Esel anti-Ziege. Man erkennt im Fall des WT-Proteins eine Weißfärbung an der Plasmamembran mit dem Hinweis auf eine dortige Kolokalisation des Proteins mit GLUT9. Im Fall des mutierten Proteins Umod P236L lässt sich in geringem Maße eine Weißfärbung erkennen, somit ergeben sich kaum Hinweise für eine Kolokalisation von Umod P236L mit GLUT9 an der Plasmamembran. Maßstab: 10 µm. µm = Mikrometer.

Es lässt sich zusammenfassen, dass in den Experimenten mit der Zelllinie MDCK II, die für diese Versuche retroviral transduziert wurden, sowohl Umod WT als auch Umod P236L ein homogenes Verteilungsmuster in der Zelle zeigen. Es ist weder im Bereich des ER noch des Golgi-Apparates oder der Endosomen eine verstärkte Anfärbung von Umod nachweisbar. Eine Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran kann in beiden Fällen nicht gezeigt werden.

In den immunzytochemischen Experimenten, in der die Zelllinie cos7 verwendet wurde und die mit Hilfe der Methode der Transfektion durchgeführt worden sind, zeigt sich im Fall von Umod WT ein überwiegend homogenes subzelluläres Verteilungsmuster. Umod P236L hingegen verteilt sich sowohl homogen als auch inhomogen in der Zelle. Wir konnten durch Zusammenfügen der Bilder feststellen, dass es im Fall von Umod P236L zu einer perinukleären Gelbfärbung im Bereich des ER kommt, die auf eine Kolokalisation des mutierten Umod P236L mit der Organelle hinweist. Diese Gelbfärbung ist im Fall von WT-Umod ebenfalls, jedoch in geringerem Maße, vorhanden. Eine leichte Kolokalisation mit dem Golgi-Apparat ist in beiden Fällen nachvollziehbar. Ebenso zeigt sich in der Färbung mit Endosomen in einigen Vesikeln eine Kolokalisation mit Umod WT und in geringem Maße auch eine Kolokalisation mit

Umod P236L. Im Gegensatz dazu kommt es im Fall von Umod WT zu einer deutlichen Gelbfärbung und somit zu einer Kolo­kalisierung an der Plasmamembran. Dies kann für Umod P236L nur in geringem Maße gezeigt werden, eine Gelbfärbung ist kaum sichtbar.

In den durchgeführten *Triple*-Färbungen mit dem Harnsäuretransporter GLUT9 bestätigen sich diese Ergebnisse. Zudem zeigt sich, dass GLUT9 in Anwesenheit von Umod WT ebenfalls an der Plasmamembran exprimiert wird und dort gemeinsam mit Umod zu einer Weißfärbung führt, während der Transporter in Anwesenheit von Umod P236L mit dem ER kolo­kalisiert und dort eine Weißfärbung erzeugt.

## 4 Diskussion

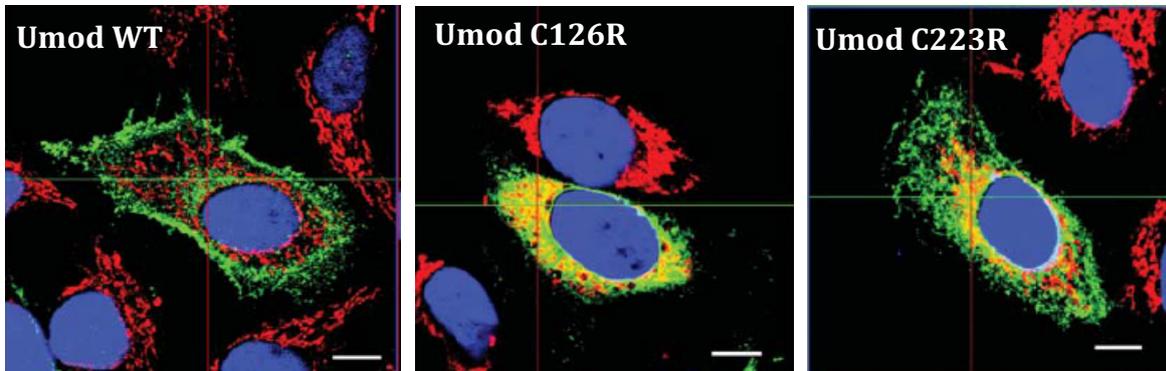
### 4.1 Umod WT lokalisiert an der Plasmamembran während Umod P236L im ER akkumuliert

Die mit cos7-Zellen durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen der vorgelegten Arbeit zeigen, dass Uromodulin (Umod) als Wildtyp (WT) vor allem homogen ubiquitär in der Zelle verteilt ist. Das mutierte Protein Umod P236L hingegen zeigt sich sowohl homogen als auch inhomogen verteilt. Im Fall des inhomogenen Verteilungsmusters lokalisiert Umod P236L perinukleär im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

Umod WT kolokalisiert überwiegend an der Plasmamembran, wohingegen die Mutante Umod P236L mit dem ER kolokalisiert. Eine partielle Kolokalisation lässt sich außerdem im Bereich des Golgi-Apparates und der Endosomen sowohl für Umod WT als auch Umod P236L vermuten. Dies könnte sich sowohl im Rahmen des Modifikations- und Transportprozesses von Umod als auch durch die Proteinüberexpression sowie die Nähe der Organellen zueinander erklären lassen. Diese Resultate bekräftigen die Vermutung, dass Umod WT im ER korrekt prozessiert, im Golgi-Apparat modifiziert und daraufhin mit Hilfe von Vesikeln an die Plasmamembran transportiert wird. Von dort aus kann Umod in das Tubuluslumen sezerniert werden und polymerisieren (Rampoldi et al., 2011). Die Mutante Umod P236L hingegen wird, möglicherweise durch Fehlfaltungsprozesse bedingt, zu einem erheblichen Teil im ER zurückgehalten, akkumuliert dort und kann nicht beziehungsweise nur zu einem geringen Anteil an die Plasmamembran und daraufhin ins Tubuluslumen gelangen. Bereits publizierte Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen, die verschiedene andere Umodmutationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht haben, zeigen ähnliche Resultate. Sie geben ebenfalls Hinweise darauf, dass mutiertes Umod fehlgefaltet und im ER zurückgehalten wird, sodass es dort akkumuliert (Rampoldi et al., 2003, Bernascone et al., 2006, Jennings et al., 2007, Vylet'al et al., 2006, Choi et al., 2005b, Johnson et al., 2017). Umod WT hingegen scheint über den regulären Transport- und Sekretionsweg an die Plasmamembran zu gelangen und mit dieser zu kolokalisieren.

Auch die Arbeitsgruppe um Vylet'al untersuchte verschiedene Umod Mutationen in Zellkulturversuchen, unter anderem die Mutation Umod P236L (Vylet'al et al., 2006). Auch sie zeigte in ihren Untersuchungen eine perinukleäre Verteilung der Mutante

Umod P236L und eine Kolokalisation mit dem ER. Die Ergebnisse wiesen eine sehr geringe Kolokalisation mit der Plasmamembran und eine ausgeprägte Retention im ER nach. Interessanterweise zeigte sich in den von Vylet' al durchgeführten Versuchen in Abhängigkeit der Mutation ein unterschiedliches subzelluläres Verteilungsmuster, in welchem einige Mutanten stärker als andere mit dem ER kolokalisierten (Vylet' al et al., 2006). Im Gegensatz zur vorgelegten Arbeit wurden in diesen Experimenten AtT20-Zellen, die Zellen eines Tumors der Glandula pituitaria, verwendet. Um die Resultate in einem den Nierentubuluszellen ähnlicherem Modell zu untersuchen, verwendeten wir Nierenepithelzellen (MDCK II-Zellen) und Nierenfibroblasten (cos7-Zellen). Bestätigt wurden die hier vorgelegten Ergebnisse auch durch die Arbeitsgruppe um Williams et al., welche Immunfluoreszenzexperimente mit transfizierten Henrietta Lacks (HeLa)-Zellen durchführte. In Abbildung 22 wird nicht nur gezeigt, dass Umod WT hauptsächlich an der Plasmamembran und zu einem geringen Teil subzellulär lokalisierte, sondern wies ebenfalls Unterschiede im subzellulären Verteilungsmuster in Abhängigkeit des mutierten Proteins nach (Williams et al., 2009). Es ergibt sich somit der Verdacht, dass das subzelluläre Verteilungsmuster von mutiertem Umod in Abhängigkeit der Mutation variiert.



**Abb. 22: Konfokale Mikroskopie von WT-, C126R-, und C223R-Umod-exprimierenden HeLa-Zellen**

Umod ist grün, das ER ist rot gefärbt. Der Zellkern leuchtet durch Diamedin-2-phenylindol (DAPI) blau. Im Fall von Umod WT kommt es zur Lokalisation des Proteins an der Plasmamembran und in geringem Maße auch subzellulär. Die Mutante Umod C126R hingegen kolokalisiert fast ausschließlich mit dem ER, es kommt zu einer Gelbfärbung. Die Mutante Umod C223R kolokalisiert sowohl mit der Plasmamembran als auch zu einem Teil mit dem ER. Es ist eine partielle Gelbfärbung perinukleär im Bereich des ER erkennbar (Williams et al., 2009). Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .  $\mu\text{m}$  = Mikrometer.

#### 4.1.1 Kolokalisation im Tiermodell

Wie Patienten mit Autosomal Dominanter Tubulointerstitieller Nierenerkrankung (ADTKD), zeigten auch Mäuse mit Umodmutationen ähnliche klinische Aspekte der Erkrankung, unter anderem Harnkonzentrationsdefekte, tubulointerstitielle Fibrose und Niereninsuffizienz (Bernascone et al., 2010, Kemter et al., 2009, Kemter et al.,

2013, Ma et al., 2017). Entsprechende histologische Veränderungen ließen sich nachweisen. In Immunfluoreszenzuntersuchungen muriner Nierenbiopsien zeigte sich eine Kolo-kalisation von mutiertem Umod mit dem ER (Bernascone et al., 2010). Darüber hinaus fanden sich, ähnlich wie in humanen Biopsien, entsprechende histopathologische Veränderungen, darunter eine tubuläre Atrophie sowie eine interstitielle Inflammation und Zeichen der Fibrosierung (Scolari et al., 2004, Rampoldi et al., 2003, Ma et al., 2017, Nasr et al., 2008).

#### **4.1.2 Mutiertes Umod gelangt teilweise an die Plasmamembran**

Auffällig in den vorgelegten Ergebnissen ist, dass mutiertes Umod P236L sowohl ein homogenes, ähnlich Umod WT, als auch ein heterogenes Verteilungsmuster aufweist. Es scheint sowohl perinukleär mit dem ER zu kolo-kalisieren, in gewissem Maße jedoch auch an der Plasmamembran zu lokalisieren. Mehrere Ursachen sollten dahingehend in Betracht gezogen werden. Einerseits könnte es in einer unterschiedlich ausgeprägten Proteinexpression der einzelnen Zellen begründet sein. Andererseits ist es möglich, dass keine klare Genotyp-Phänotyp-Assoziation besteht und die Zellen somit ein unterschiedliches Ausprägungsmuster aufweisen. Dieser Umstand könnte erklären, weshalb Familienmitglieder, die dieselbe Mutation tragen, eine unterschiedliche Schwere der Erkrankung und klinische Charakteristika aufweisen (Bollee et al., 2011).

Dieses Phänomen deutet möglicherweise darauf hin, dass fehlgefaltetes Umod der ER-Kontrolle teilweise entkommt, um an die Plasmamembran zu gelangen (Vylet'al et al., 2006, Williams et al., 2009, Ma et al., 2012).

Ein solcher Pathomechanismus, ausgelöst durch mutiertes Protein, wurde bereits am Beispiel der Zystischen Fibrose gezeigt (Hegedús et al., 2006). Ähnliche Resultate konnten Schaeffer et al. *in vitro* mit den Umod-Mutationen R212C, C256Y und C317Y beobachten. Alle genannten Mutationen gelangten in unterschiedlichem Ausmaß an die Plasmamembran, kolo-kalisierten in Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Umod WT und ließen sich im Zellkulturmedium nachweisen (Schaeffer et al., 2012). Auch in Urinproben von Patienten mit ADTKD-*UMOD* ließ sich mutiertes Umod nachweisen (Schaeffer et al., 2012).

Somit ergibt sich der Verdacht, dass das subzelluläre Verteilungsmuster von mutiertem Umod nicht nur in Abhängigkeit der einzelnen Mutation variiert, sondern sich auch innerhalb einer (Zell-)Population mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen präsentiert.

## 4.2 Akkumulation von mutiertem Umod löst ER-Stress aus

Die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit zeigen eine Akkumulation von Umod P236L im ER. Ein vermehrter Anfall fehlgefalteter oder inkompletter Proteine setzt einen zellulären Mechanismus in Gang, welcher als *Unfolded Protein Response* (UPR) bezeichnet wird. Ziel dieses Mechanismus ist die Reparatur oder Elimination der anfallenden Proteine. Gelingt es nicht, die Zellhomöostase wiederherzustellen, wird die Apoptose eingeleitet (Löffler/Petrides, 2014, Tsang et al., 2010). Dazu wird die Synthese von Faltungshelferproteinen, sogenannten Chaperonen, und Bestandteilen der Proteolyse gesteigert. Inkorrekt prozessierte Proteine werden eliminiert und durch Proteasomen degradiert. Gleichzeitig wird die ER-Faltungskapazität erhöht und die Proteinbiosynthese gehemmt, um die Proteinüberladung im ER zu mindern. Es existieren verschiedene transmembranäre Proteine, über die eine UPR stimuliert werden kann. Dazu gehören *inositol requiring enzyme 1* (IRE1), *double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase* (PERK) und *activating transcription factor 6* (ATF6). Einen weiteren wichtigen Bestandteil dieser Kaskade bildet das *binding protein* (BiP), auch als *78 kDa glucose-regulated protein* (GRP 78) bezeichnet. Dieses spielt als Chaperon der Hitzeschockprotein 70 (Hsp70)-Familie ebenfalls eine Rolle im Proteinfaltungsprozess. Normalerweise ist es an die genannten Membranproteine gebunden und führt zu deren Inaktivierung. Entstehen fehlgefaltete Proteine, so löst und bindet sich BiP an diese Proteine. Dieser Mechanismus sorgt dafür, dass IRE1, ATF6 oder PERK in aktivierter Form vorliegen und entsprechende Signalkaskaden auslösen können (Löffler/Petrides, 2014, Walter and Ron, 2011, Berg et al., 2013a). Unter anderem führt dies zur Entstehung des *nuclear factor „kappa light-chain-enhancer“ of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), welcher als Transkriptionsfaktor eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Entzündungsprozessen spielt und eine daraus resultierende Inflammation erklären könnte (Zhang and Kaufman, 2008). In der Pathogenese der ADTKD-*UMOD* konnten die Mechanismen der UPR nachgewiesen werden. Schaeffer et al. zeigten, dass Zellen, welche Umod-Mutationen exprimierten, eine erhöhte Expression von BiP aufwiesen. Dies konnte sowohl in murinen als auch in humanen Nierenbiopsien von Patienten mit ADTKD-*UMOD* nachgewiesen werden (Schaeffer et al., 2017, Johnson et al., 2017, Kemter et al., 2017, Piret et al., 2017, Adam et al., 2012). Somit könnte die progrediente Niereninsuffizienz als Resultat einer persistierenden Inflammation ausgelöst durch Akkumulation des mutierten Proteins im ER erklärt werden.

### 4.3 Umod ist für die Positionierung von GLUT9 in der Plasmamembran verantwortlich

In den hier vorgelegten Ergebnissen der Dreifach-Färbungen von Umod, des Harnsäuretransporters Glucosetransporter 9 (GLUT9) und der entsprechenden Organelle bestätigt sich das subzelluläre Verteilungsmuster von Umod WT und der Mutante Umod P236L. Auch zeigt sich, dass GLUT9 in Anwesenheit von Umod WT auch an der Plasmamembran lokalisiert. In Anwesenheit der Mutante Umod P236L verbleibt GLUT9 überwiegend subzellulär und lokalisiert perinukleär im Bereich des ER. Die resultierende Weißfärbung in der Dreifach-Färbung deutet auf eine Kolokalisation von mutiertem Umod und GLUT9 mit dem ER hin. Dies gibt Hinweise darauf, dass der Transporter GLUT9 durch das mutierte Protein Umod P236L im ER akkumuliert und nicht weiter zu Plasmamembran gelangen kann, um dort positioniert zu werden. Im Gegensatz dazu gelangt der Transporter in Anwesenheit des WT-Proteins regulär an die Membran und kann dort eingebaut werden.

Harnsäuretransporter sind essentiell für die Exkretion von Urat. Sie sind sowohl an der apikalen als auch basolateralen Plasmamembran epithelialer Tubuluszellen lokalisiert und vermitteln die Sekretion und Reabsorption von Harnsäure (Wright et al., 2010, Wang et al., 2019, Maiuolo et al., 2016). In Nagetieren sind diese Urattransporter sowohl im proximalen als auch distalen Tubulussystem lokalisiert (Bibert et al., 2009), während sie im Menschen bisher im proximalen Tubulus nachgewiesen werden konnten (Augustin et al., 2004). Im Rahmen von *Deep Sequencing*-Untersuchungen konnten auch Genkopien von *UMOD* im proximalen Tubulus und Kopien von Harnsäuretransportergenen im distalen Tubulus nachgewiesen werden (Lee et al., 2015). Diese Untersuchungen geben Hinweise darauf, dass Umod und Harnsäuretransporter in den gleichen Nierenepithelzellen exprimiert werden und gemeinsame Transportwege nutzen.

Somit besteht die Vermutung, dass eine durch mutiertes Umod hervorgerufene Akkumulation fehlgefalteten Proteins im ER eine Störung der Proteinbiosynthese auslöst und weitere zelluläre Mechanismen beeinträchtigt.

Auch Kemter et al. konnten in murinen Tubulusepithelzellen nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor *Nuclear respiratory factor 1* (NRF1) mit mutiertem Umod kolokalisierte und ebenfalls im ER akkumulierte, woraus eine verminderte Anzahl an Mitochondrien und Proteinen der mitochondrialen Biogenese resultierte (Kemter et al., 2017).

### **4.3.1 Abwesenheit von GLUT9 führt zu verminderter Harnsäureexkretion**

Durch die vorgelegten Ergebnisse bestätigt sich die Vermutung, dass der Harnsäuretransporter GLUT9 in Anwesenheit der Mutante Umod P236L nicht an die Plasmamembran transportiert wird, sondern subzellulär verbleibt und im ER akkumuliert. Da GLUT9 essentiell für den Harnsäurehaushalt ist, könnte ein dysregulierter Sekretionsweg zu Störungen in der Harnsäureexkretion führen. Preitner et al. wiesen nach, dass GLUT9-Knock-out Mäuse neben einer Hyperurikämie und Urikosurie ebenso eine Niereninsuffizienz und eine Uratnephropathie entwickelten (Preitner et al., 2009). Auch scheint GLUT9 in der intestinalen Harnsäureexkretion eine wichtige Rolle zu spielen. Mäuse, die eine Defizienz des intestinalen GLUT9-Transporters aufwiesen, entwickelten früh Zeichen eines metabolischen Syndroms, einschließlich Zeichen der Hyperurikämie, Hypertonie und Dyslipidämie (DeBosch et al., 2014). In Patienten, die an ADTKD-UMOD leiden, weisen nicht nur einen vermehrten Harnsäurespiegel im Blut, sondern auch eine verminderte Harnsäureexkretion in den Urin auf (Bleyer et al., 2003). Im Falle einer Expression von Umod P236L in Nierentubuluszellen sollte daher im Verlauf mit Hilfe eines Harnsäureexkretionsassays geklärt werden, ob es auch *in vitro* zu einer verminderten Harnsäuresekretion in den Überstand kommt.

### **4.3.2 Hyperurikämie als Risikofaktor für Niereninsuffizienz**

Eine unbehandelte Hyperurikämie kann zu verschiedenen Folgekomplikationen führen. Weitere Studien geben Hinweise darauf, dass ein chronisch erhöhter Serumharnsäurespiegel einen eigenständigen Risikofaktor in der Entwicklung und Progression einer Niereninsuffizienz darstellt (Johnson et al., 2013, Srivastava et al., 2018, Chang et al., 2010). *In vivo* wurden die Auswirkungen einer Hyperurikämie an einem Modell der chronischen Nierenschädigung untersucht (Kang et al., 2002). Eine in Ratten durch Injektion eines Uratoxidase-Inhibitors induzierte Hyperurikämie resultierte in einem im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhten Serumkreatininwert und verstärkten Hypertonus. Histopathologisch ließen sich in den Versuchstieren Zeichen der interstitiellen Fibrose nachweisen (Kang et al., 2002).

Inflammatorische Prozesse können Folge eines erhöhten Serumharnsäurespiegels sein. Zhou et al. beobachteten, dass intraperitoneal injizierte Harnsäure eine tubulointerstitielle Infiltration von T-Zellen und Makrophagen *in vivo* induzierte. In

Tubulusepithelzellen konnte eine vermehrte Expression von TNF- $\alpha$  und die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges nachgewiesen werden (Zhou et al., 2012). Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass erhöhte Harnsäurespiegel Ursache renaler Schädigung sein können. Somit ist eine daraus resultierende Uratnephropathie als Ursache der progredienten Nierenfibrose und -insuffizienz ebenfalls denkbar.

Als Therapeutika der Hyperurikämie stehen bisher neben konservativen Maßnahmen einige medikamentöse Ansätze zur Verfügung. Als Dauermedikation wird bevorzugt Allopurinol eingesetzt (Bollee et al., 2011). Aktuell stellt Allopurinol die Therapie der Wahl der Hyperurikämie in ADTKD-*UMOD* dar (Eckardt et al., 2015). Ob es die Krankheitsprogression mindern kann und somit die Hypothese der Uratnephropathie als Ursache der Krankheitsprogression unterstützt wird, ist jedoch nicht vollständig geklärt (Bleyer et al., 2017). Fairbanks et. al zeigten, dass sich die Nierenfunktion von Patienten unter Allopurinol-Therapie verbesserte (Fairbanks et al., 2002). Andere Studien hingegen konnten nachweisen, dass Patienten mit ADTKD, welche regelmäßig Allopurinol einnahmen sowie normwertige Harnsäurespiegel aufwiesen, trotzdem eine progrediente Niereninsuffizienz entwickelten (Bleyer et al., 2003, Schäffer et al., 2010).

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnissen zur Pathogenese der Hyperurikämie, stellten andere Arbeitsgruppen im Rahmen ihrer Publikationen andere Hypothesen auf. Es ist bekannt, dass Umod mit Elektrolyttransportern und -kanälen im Tubulussystem interagiert und für eine vermehrte Expression dieser Kanäle in der Plasmamembran sorgt (Mutig et al., 2011, Renigunta et al., 2011). In Abwesenheit von Umod verbleiben sie in vesikulären Strukturen, was zu einer geringeren renalen Konzentrationsfähigkeit führt (Bachmann et al., 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch diesen Pathomechanismus möglicherweise die Elektrolytresorption verändert wird, und es durch die kompensatorische Reabsorption von Natrium im proximalen Tubulus ebenfalls zu einer verstärkten Reabsorption von Harnsäure kommt (Scolari et al., 2004, Bleyer and Knoch, 2016). Eine solche Reabsorption von Harnsäure als Folge einer gestörten Wasserbarriere durch die Aggregation mutierten Umods an der Plasmamembran wurde ebenfalls diskutiert (Schaeffer et al., 2012). Da weder *in vitro* noch *in vivo* Experimente zu diesen Überlegungen durchgeführt worden sind, existieren keine belegten Daten, und eine Überprüfung dieser Hypothesen steht aus.

## 4.4 Limitationen der Arbeit

### 4.4.1 Lokalisation von Umod in MDCK II-Zellen

In der vorgelegten Arbeit sind die Auswirkungen von Umod WT und Umod P236L auf die Proteinbiosynthese und Stoffwechselprozesse ausschließlich *in vitro* untersucht. In retroviral transduzierten MDCK II-Zellen gibt es bereits Hinweise auf eine Kolokalisation mit dem ER. Eine Lokalisation an der Plasmamembran ist jedoch weder im Fall von Umod WT noch von Umod P236L nachweisbar. Ebenso kann kein Unterschied im Verteilungsmuster von Umod WT und Umod P236L festgestellt werden. Im Vergleich dazu lassen sich bei transfizierten cos7-Zellen deutliche Unterschiede im subzellulären Verteilungsmuster nachweisen. Die Ursache dieser unterschiedlichen Resultate könnte in der Untersuchungsmethode begründet sein. Die bei den cos7-Zellen durchgeführte Lipofektion kreiert eine Proteinüberexpression, die im Rahmen der Transduktion in diesem Ausmaß nicht gegeben ist. Durch die größere Menge vorhandenen Umods kommt das unterschiedliche Verteilungsmuster deutlicher und ausgeprägter zum Vorschein.

Abhängig von der Lokalisation im Genom unterliegt die Genexpression der transduzierten Gene *UMOD WT* und *UMOD P236L* verschiedenen Modifikationen. Unter anderem kann die Transkriptionsaktivität durch Promotormethylierung sowie *enhancer*- und *silencer*-Sequenzen variieren. Auch postranskriptionelle und – translationelle Modifikationen wie mRNA-*Splicing* und epigenetische Faktoren können ein unterschiedliches Genexpressionsmuster bedingen, sodass auch hierdurch ein Bias entstehen kann (Löffler/Petrides, 2014).

### 4.4.2 Harnsäureexkretion *in vitro* und im Tiermodell

Da Untersuchungen bisher nur *in vitro* erfolgten, ist eine Übertragung in ein Tiermodell zur Überprüfung der Hypothese sicherlich erstrebenswert. Es existieren bereits einige etablierte murine Tiermodelle, die einen Umod *Knock-out* oder Umod-Mutationen tragen (Johnson et al., 2017, Bernascone et al., 2010, Bachmann et al., 2005, Mutig et al., 2011, Bates et al., 2004, Kemter et al., 2013, Ma et al., 2017). Untersuchungen bezüglich der Entstehung der Hyperurikämie sind bisher noch nicht durchgeführt worden. Da die meisten Säugetiere das Enzym Urikase bilden, welches Harnsäure in Allantoin umwandelt, war ein geeignetes Tiermodell bisher nicht verfügbar. Lu et al. stellten ein Mausmodell mit einem *Knockout* des Uratoxidase (*Uox*)-Gens, welches für Urikase kodiert, vor (Lu et al., 2018). Dies könnte die Erforschung der

Harnsäureexkretion *in vivo* erleichtern. Eine Untersuchung an humanen Nierenbiopsien mittels immunhistochemischer Färbungen, wie sie bereits von mehreren Arbeitsgruppen zum Nachweis von im ER retiniertem mutiertem Umod durchgeführt wurde, ist ebenfalls vorstellbar (Prejbisz et al., 2015, Scolari et al., 2004, Rampoldi et al., 2003, Dahan et al., 2001, Zaucke et al., 2010). Eine Untersuchung des Zellüberstands mittels Harnsäureexkretionsassays zur Überprüfung einer verminderten Harnsäuresekretion steht aus.

## 4.5 Ausblick

Die Hyperurikämie im Rahmen von ADTKD-*UMOD* kann bisher nur symptomatisch mit Urikosurika oder Urikostatika behandelt werden. Der Krankheitsverlauf wird dadurch vermutlich nicht aufgehalten (Bleyer et al., 2017). Ist das Stadium des terminalen Nierenversagens erreicht, so stehen Nierenersatzverfahren oder eine Nierentransplantation zur Verfügung (Bleyer et al., 2017).

Im ersten Schritt sollten zunächst Patienten mit ADTKD-*UMOD* als solche identifiziert werden. Wegweisend sind hierbei Anamnese, insbesondere die Familienanamnese mit autosomal dominantem Vererbungsmuster, erhöhte Serumharnsäurespiegel, eine zunehmende Abnahme der Nierenfunktion sowie genanalytische Untersuchungen.

Als Pathomechanismus, der zur Krankheitsprogression führt, wird die Akkumulation von mutiertem Umod im ER und die daraus resultierende Aktivierung der UPR verantwortlich gemacht. In Studien konnte gezeigt werden, dass unter Applikation des Urikosurikums Probenecid und Natriumphenylbutyrat, welches als Chaperon in den ER-Fehlfaltungsprozess eingreift, eine verstärkte Expression von mutiertem Umod an der Plasmamembran zu finden ist (Choi et al., 2005b, Ma et al., 2012). Zudem war ein erhöhter Spiegel an mutiertem Umod im Zellkulturmedium nachzuweisen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Chaperon Hsp70 in Anwesenheit mutierten Umods vermindert ist. Unter der Gabe von Probenecid normalisierte sich der Spiegel wieder (Ma et al., 2012). Diese Ergebnisse konnten jedoch *in vivo* nicht bestätigt werden (Kemter et al., 2014). Als mögliche Ursache hierfür wurde das geringe Vorkommen von Hsp70 im Mausmodell genannt, sodass dieses Therapeutikum keine Auswirkungen zu haben und somit eine untergeordnete Rolle zu spielen schien. In durchgeführten *in vitro* Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnte jedoch eine vermehrte Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges nachgewiesen werden. Möglicherweise stellt dies einen therapeutischer Ansatzpunkt dar (Kemter et al., 2014).

Gelangt mutiertes Umod an die Plasmamembran, so aggregiert es dort (Schaeffer et al., 2012). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass mutiertes Umod anders als Umod WT extrazellulär im Tubuluslumen zu finden war und dort Aggregate bildete (Schaeffer et al., 2012). Da es bislang unklar ist, ob diese Aggregate möglicherweise einen schädigenden Einfluss auf das Tubulussystem haben, sollte die Vorgehensweise, mutiertes Umod an die Plasmamembran zu transportieren, vorsichtig betrachtet werden (Schaeffer et al., 2017).

## 4.6 Schlussfolgerung

Die Untersuchungen der vorgelegten Arbeit zeigen, dass Umod P236L im Unterschied zu Umod WT mit dem ER kolokalisiert. Es gelangt in geringerer Menge zur Plasmamembran als Umod WT. Letzteres hingegen scheint ubiquitär in der Zelle verteilt zu sein und regelrecht an die Plasmamembran transportiert zu werden. Dieses Resultat spricht dafür, dass Umod P236L fehlgefaltet wird und im ER akkumuliert. Diese Ergebnisse werden auch durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigt (Rampoldi et al., 2003, Bernascone et al., 2006, Jennings et al., 2007, Vylet'al et al., 2006, Choi et al., 2005b, Johnson et al., 2017). Im ER akkumuliertes Protein löst vermutlich eine UPR aus, die über verschiedene Mechanismen und Signalwege zu einem dysregulierten Zellhaushalt, inflammatorischen Prozessen, Fibrose und Apoptose der Zelle führt. Dadurch kommt es zu einem Fortschreiten der Erkrankung mit zunehmender Nierenfunktionseinschränkung, welche letztendlich zum terminalen Nierenversagen (*End Stage Renal Disease* = ESRD) führt.

Die Akkumulation von Umod P236L im ER verursacht ebenfalls eine Retention des Harnsäuretransporters GLUT9 und hindert diesen an der korrekten Positionierung in der Plasmamembran. Dieser Pathomechanismus ist eine mögliche Erklärung für eine verminderte Harnsäureexkretion ins Tubuluslumen mit einem Anstieg des Serumharnsäurespiegels und dem daraus resultierenden Auftreten von Gichtattacken erklären.

Die vorgelegten Ergebnisse konnten bisher nur *in vitro* beobachtet werden. Weitere *in vivo* Untersuchungen sind nötig, um die Resultate zu verifizieren. Bisher waren Untersuchungen im Tiermodell zur Harnsäureexkretion aufgrund des Auftretens von Urikase in Nagetieren limitiert. Ein neu eingeführtes Tiermodell mit Urikase-*Knock out* (Lu et al., 2018) könnte diese Untersuchungen ermöglichen.

Insgesamt vermittelt die vorgelegte Arbeit einen Einblick in den Pathomechanismus, der zur Entstehung von ADTKD-*UMOD*, insbesondere der Hyperurikämie, und deren

Krankheitsprogression beiträgt. Ob es neben den Medikamenten Probenecid und Phenylbutyrat andere therapeutisch wirkungsvollere Ansätze gibt, den akkumulierten Transporter freizusetzen, um so eine vermehrte Harnsäureexkretion zu bewirken, gilt es noch zu erforschen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- ADAM, J., BOLLEE, G., FOUGERAY, S., NOEL, L. H., ANTIGNAC, C., KNEBELMAN, B. & PALLET, N. 2012. Endoplasmic reticulum stress in UMOD-related kidney disease: a human pathologic study. *Am J Kidney Dis*, 59, 117-21.
- ANZAI, N., ICHIDA, K., JUTABHA, P., KIMURA, T., BABU, E., JIN, C. J., SRIVASTAVA, S., KITAMURA, K., HISATOME, I., ENDOU, H. & SAKURAI, H. 2008. Plasma urate level is directly regulated by a voltage-driven urate efflux transporter URATv1 (SLC2A9) in humans. *J Biol Chem*, 283, 26834-8.
- AUGUSTIN, R., CARAYANNOPOULOS, M. O., DOWD, L. O., PHAY, J. E., MOLEY, J. F. & MOLEY, K. H. 2004. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem*, 279, 16229-36.
- BACHMANN, S., KOEPPEN-HAGEMANN, I. & KRIZ, W. 1985. Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry. *Histochemistry*, 83, 531-8.
- BACHMANN, S., MUTIG, K., BATES, J., WELKER, P., GEIST, B., GROSS, V., LUFT, F. C., ALENINA, N., BADER, M., THIELE, B. J., PRASADAN, K., RAFFI, H. S. & KUMAR, S. 2005. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F559-67.
- BATES, J. M., RAFFI, H. M., PRASADAN, K., MASCARENHAS, R., LASZIK, Z., MAEDA, N., HULTGREN, S. J. & KUMAR, S. 2004. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int*, 65, 791-7.
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. 2013a. *Biochemie*, Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag
- BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L. & STRYER, L. 2013b. *Biochemie*. Springer, 7, 27-42.
- BERNASCONE, I., JANAS, S., IKEHATA, M., TRUDU, M., CORBELLI, A., SCHAEFFER, C., RASTALDI, M. P., DEVUYST, O. & RAMPOLDI, L. 2010. A transgenic mouse model for uromodulin-associated kidney diseases shows specific tubulo-interstitial damage, urinary concentrating defect and renal failure. *Hum Mol Genet*, 19, 2998-3010.
- BERNASCONE, I., VAVASSORI, S., DI PENTIMA, A., SANTAMBROGIO, S., LAMORTE, G., AMOROSO, A., SCOLARI, F., GHIGGERI, G. M., CASARI, G., POLISHCHUK, R. & RAMPOLDI, L. 2006. Defective intracellular trafficking of uromodulin mutant isoforms. *Traffic*, 7, 1567-79.
- BIBERT, S., HESS, S. K., FIRSOV, D., THORENS, B., GEERING, K., HORISBERGER, J. D. & BONNY, O. 2009. Mouse GLUT9: evidences for a urate uniporter. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297, F612-9.
- BLEYER, A. J., KIDD, K., ZIVNA, M. & KMOCH, S. 2017. Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease. *Adv Chronic Kidney Dis*, 24, 86-93.
- BLEYER, A. J. & KMOCH, S. 2016. Tamm Horsfall Glycoprotein and Uromodulin: It Is All about the Tubules! *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 6-8.
- BLEYER, A. J., WOODARD, A. S., SHIHABI, Z., SANDHU, J., ZHU, H., SATKO, S. G., WELLER, N., DETERDING, E., MCBRIDE, D., GORRY, M. C., XU, L., GANIER, D. & HART, T. C. 2003. Clinical characterization of a family with a mutation in the uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein) gene. *Kidney Int*, 64, 36-42.

- BOKHOVE, M., NISHIMURA, K., BRUNATI, M., HAN, L., DE SANCTIS, D., RAMPOLDI, L. & JOVINE, L. 2016. A structured interdomain linker directs self-polymerization of human uromodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 1552-7.
- BOLLEE, G., DAHAN, K., FLAMANT, M., MORINIERE, V., PAWTOWSKI, A., HEIDET, L., LACOMBE, D., DEVUYST, O., PIRSON, Y., ANTIGNAC, C. & KNEBELMANN, B. 2011. Phenotype and outcome in hereditary tubulointerstitial nephritis secondary to UMOD mutations. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6, 2429-38.
- BRUNATI, M., PERUCCA, S., HAN, L., CATTANEO, A., CONSOLATO, F., ANDOLFO, A., SCHAEFFER, C., OLINGER, E., PENG, J., SANTAMBROGIO, S., PERRIER, R., LI, S., BOKHOVE, M., BACHI, A., HUMMLER, E., DEVUYST, O., WU, Q., JOVINE, L. & RAMPOLDI, L. 2015. The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *Elife*, 4, e08887.
- CAULFIELD, M. J., MUNROE, P. B., O'NEILL, D., WITKOWSKA, K., CHARCHAR, F. J., DOBLADO, M., EVANS, S., EYHERAMENDY, S., ONIPINLA, A., HOWARD, P., SHAW-HAWKINS, S., DOBSON, R. J., WALLACE, C., NEWHOUSE, S. J., BROWN, M., CONNELL, J. M., DOMINICZAK, A., FARRALL, M., LATHROP, G. M., SAMANI, N. J., KUMARI, M., MARMOT, M., BRUNNER, E., CHAMBERS, J., ELLIOTT, P., KOONER, J., LAAN, M., ORG, E., VELDRE, G., VIIGIMAA, M., CAPPUCCIO, F. P., JI, C., IACONE, R., STRAZZULLO, P., MOLEY, K. H. & CHEESEMAN, C. 2008. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Med*, 5, e197.
- CAVALLONE, D., MALAGOLINI, N. & SERAFINI-CESSI, F. 2001. Mechanism of release of urinary Tamm-Horsfall glycoprotein from the kidney GPI-anchored counterpart. *Biochem Biophys Res Commun*, 280, 110-4.
- CHANG, H.-Y., LEE, P.-H., LEI, C.-C., HSU, Y.-C., CHANG, H.-H., TUNG, C.-W., LIN, C.-L., YANG, H.-F., LU, L.-C., JONG, M.-C., CHEN, C.-Y., FANG, K.-Y., CHAO, Y.-S. & SHIH, Y.-H. 2010. Hyperuricemia as an Independent Risk Factor of Chronic Kidney Disease in Middle-Aged and Elderly Population. *The American Journal of the Medical Sciences*, 339, 509-515.
- CHOI, H. K., MOUNT, D. B., REGINATO, A. M., AMERICAN COLLEGE OF, P. & AMERICAN PHYSIOLOGICAL, S. 2005a. Pathogenesis of gout. *Ann Intern Med*, 143, 499-516.
- CHOI, S. W., RYU, O. H., CHOI, S. J., SONG, I. S., BLEYER, A. J. & HART, T. C. 2005b. Mutant tamm-horsfall glycoprotein accumulation in endoplasmic reticulum induces apoptosis reversed by colchicine and sodium 4-phenylbutyrate. *J Am Soc Nephrol*, 16, 3006-14.
- CLASSEN/DIEHL/KOCHSIEK 2009. *Innere Medizin*, München, Elsevier GmbH.
- CORRY, D. B., ESLAMI, P., YAMAMOTO, K., NYBY, M. D., MAKINO, H. & TUCK, M. L. 2008. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *J Hypertens*, 26, 269-75.
- DAHAN, K., DEVUYST, O., SMAERS, M., VERTOMMEN, D., LOUTE, G., POUX, J. M., VIRON, B., JACQUOT, C., GAGNADOUX, M. F., CHAUVEAU, D., BUCHLER, M., COCHAT, P., COSYNS, J. P., MOUGENOT, B., RIDER, M. H., ANTIGNAC, C., VERELLEN-DUMOULIN, C. & PIRSON, Y. 2003. A cluster of mutations in the UMOD gene causes familial juvenile hyperuricemic nephropathy with abnormal expression of uromodulin. *J Am Soc Nephrol*, 14, 2883-93.

- DAHAN, K., FUCHSHUBER, A., ADAMIS, S., SMAERS, M., KROISS, S., LOUTE, G., COSYNS, J. P., HILDEBRANDT, F., VERELLEN-DUMOULIN, C. & PIRSON, Y. 2001. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy and autosomal dominant medullary cystic kidney disease type 2: two facets of the same disease? *J Am Soc Nephrol*, 12, 2348-57.
- DARISIPUDI, M. N., THOMASOVA, D., MULAY, S. R., BRECH, D., NOESSNER, E., LIAPIS, H. & ANDERS, H. J. 2012. Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Am Soc Nephrol*, 23, 1783-9.
- DEBOSCH, B. J., KLUTH, O., FUJIWARA, H., SCHURMANN, A. & MOLEY, K. 2014. Early-onset metabolic syndrome in mice lacking the intestinal uric acid transporter SLC2A9. *Nat Commun*, 5, 4642.
- DEUTSCHE STIFTUNG FÜR ORGANSPENDE. 2018. *Organspende und Transplantation in Deutschland Jahresbericht 2018* [Online]. Available: [https://www.dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO\\_Jahresbericht\\_2018.pdf](https://www.dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO_Jahresbericht_2018.pdf) [Accessed 23.07.2019].
- ECKARDT, K.-U., CORESH, J., DEVUYST, O., JOHNSON, R. J., KÖTTGEN, A., LEVEY, A. S. & LEVIN, A. 2013. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 382, 158-169.
- ECKARDT, K. U., ALPER, S. L., ANTIGNAC, C., BLEYER, A. J., CHAUVEAU, D., DAHAN, K., DELTAS, C., HOSKING, A., KMOCH, S., RAMPOLDI, L., WIESENER, M., WOLF, M. T., DEVUYST, O. & KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL, O. 2015. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management--A KDIGO consensus report. *Kidney Int*, 88, 676-83.
- EKNOYAN, G., LAMEIRE, N., BARSOUM, R., ECKARDT, K. U., LEVIN, A., LEVIN, N., LOCATELLI, F., MACLEOD, A., VANHOLDER, R., WALKER, R. & WANG, H. 2004. The burden of kidney disease: improving global outcomes. *Kidney Int*, 66, 1310-4.
- ENOMOTO, A., KIMURA, H., CHAIROUNGDU, A., SHIGETA, Y., JUTABHA, P., CHA, S. H., HOSOYAMADA, M., TAKEDA, M., SEKINE, T., IGARASHI, T., MATSUO, H., KIKUCHI, Y., ODA, T., ICHIDA, K., HOSOYA, T., SHIMOKATA, K., NIWA, T., KANAI, Y. & ENDOU, H. 2002. Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature*, 417, 447-452.
- EUSER, S. M., HOFMAN, A., WESTENDORP, R. G. & BRETELER, M. M. 2009. Serum uric acid and cognitive function and dementia. *Brain*, 132, 377-82.
- FAIRBANKS, L. D., CAMERON, J. S., VENKAT-RAMAN, G., RIGDEN, S. P., REES, L., VAN, T. H. W., MANSELL, M., PATTISON, J., GOLDSMITH, D. J. & SIMMONDS, H. A. 2002. Early treatment with allopurinol in familial juvenile hyperuricaemic nephropathy (FJHN) ameliorates the long-term progression of renal disease. *QJM*, 95, 597-607.
- FATHALLAH-SHAYKH, S. A. & CRAMER, M. T. 2014. Uric acid and the kidney. *Pediatr Nephrol*, 29, 999-1008.
- GANSEVOORT, R. T., CORREA-ROTTER, R., HEMMELGARN, B. R., JAFAR, T. H., HEERSPINK, H. J. L., MANN, J. F., MATSUSHITA, K. & WEN, C. P. 2013. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *The Lancet*, 382, 339-352.
- GAST, C., MARINAKI, A., ARENAS-HERNANDEZ, M., CAMPBELL, S., SEABY, E. G., PENGELLY, R. J., GALE, D. P., CONNOR, T. M., BUNYAN, D. J., HODANOVA, K., ZIVNA, M., KMOCH, S., ENNIS, S. & VENKAT-RAMAN, G. 2018. Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease-UMOD is the most frequent non polycystic genetic kidney disease. *BMC Nephrol*, 19, 301.

- GEMEINSAMER BUNDESAUSSCHUSS 2019. Jahresbericht 2018 zur Qualität in der Dialyse.
- GIRNDT, M., TROCCHI, P., SCHEIDT-NAVE, C., MARKAU, S. & STANG, A. 2016. The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int*, 113, 85-91.
- HAGOS, Y., STEIN, D., UGELE, B., BURCKHARDT, G. & BAHN, A. 2007. Human renal organic anion transporter 4 operates as an asymmetric urate transporter. *J Am Soc Nephrol*, 18, 430-9.
- HART, T. C. 2002. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *Journal of Medical Genetics*, 39, 882-892.
- HEGEDŰS, T., ALEKSANDROV, A., CUI, L., GENTZSCH, M., CHANG, X.-B. & RIORDAN, J. R. 2006. F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758, 565-572.
- HEROLD, G. 2019. *Innere Medizin*, Köln, Herold, G.
- JENNINGS, P., AYDIN, S., KOTANKO, P., LECHNER, J., LHOTTA, K., WILLIAMS, S., THAKKER, R. V. & PFALLER, W. 2007. Membrane targeting and secretion of mutant uromodulin in familial juvenile hyperuricemic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 18, 264-73.
- JHA, V., GARCIA-GARCIA, G., ISEKI, K., LI, Z., NAICKER, S., PLATTNER, B., SARAN, R., WANG, A. Y.-M. & YANG, C.-W. 2013. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet*, 382, 260-272.
- JOHNSON, B. G., DANG, L. T., MARSH, G., ROACH, A. M., LEVINE, Z. G., MONTI, A., REYON, D., FEIGENBAUM, L. & DUFFIELD, J. S. 2017. Uromodulin p.Cys147Trp mutation drives kidney disease by activating ER stress and apoptosis. *J Clin Invest*, 127, 3954-3969.
- JOHNSON, R. J., KANG, D. H., FEIG, D., KIVLIGHN, S., KANELLIS, J., WATANABE, S., TUTTLE, K. R., RODRIGUEZ-ITURBE, B., HERRERA-ACOSTA, J. & MAZZALI, M. 2003. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *Hypertension*, 41, 1183-90.
- JOHNSON, R. J., NAKAGAWA, T., JALAL, D., SANCHEZ-LOZADA, L. G., KANG, D. H. & RITZ, E. 2013. Uric acid and chronic kidney disease: which is chasing which? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28, 2221-2228.
- JOHNSON, R. J. & RIDEOUT, B. A. 2004. Uric acid and diet--insights into the epidemic of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 350, 1071-3.
- JOVINE, L., QI, H. Y., WILLIAMS, Z., LITSCHER, E. & WASSARMAN, P. M. 2002. The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nature Cell Biology*, 4, 457-461.
- KANG, D. H., NAKAGAWA, T., FENG, L., WATANABE, S., HAN, L., MAZZALI, M., TRUONG, L., HARRIS, R. & JOHNSON, R. J. 2002. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 13, 2888-97.
- KEMTER, E., FROHLICH, T., ARNOLD, G. J., WOLF, E. & WANKE, R. 2017. Mitochondrial Dysregulation Secondary to Endoplasmic Reticulum Stress in Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease - UMOD (ADTKD-UMOD). *Sci Rep*, 7, 42970.
- KEMTER, E., PRUECKL, P., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HABERMANN, F. A., HANS, W., GAILUS-DURNER, V., FUCHS, H., HRABE DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B. & WANKE, R. 2013. Type of uromodulin mutation and

- allelic status influence onset and severity of uromodulin-associated kidney disease in mice. *Hum Mol Genet*, 22, 4148-63.
- KEMTER, E., RATHKOLB, B., ROZMAN, J., HANS, W., SCHREWE, A., LANDBRECHT, C., KLAFTEN, M., IVANDIC, B., FUCHS, H., GAILUSDURNER, V., KLINGENSPOR, M., DE ANGELIS, M. H., WOLF, E., WANKE, R. & AIGNER, B. 2009. Novel missense mutation of uromodulin in mice causes renal dysfunction with alterations in urea handling, energy, and bone metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 297, F1391-8.
- KEMTER, E., SKLENAK, S., RATHKOLB, B., HRABE DE ANGELIS, M., WOLF, E., AIGNER, B. & WANKE, R. 2014. No amelioration of uromodulin maturation and trafficking defect by sodium 4-phenylbutyrate in vivo: studies in mouse models of uromodulin-associated kidney disease. *J Biol Chem*, 289, 10715-26.
- KIDNEY DISEASE: IMPROVING GLOBAL OUTCOMES (KDIGO) CKD WORK GROUP. 2013. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int, Suppl 2013* [Online]. Available: <https://kdigo.org/guidelines/ckd-evaluation-and-management/> [Accessed 19.07.2019].
- KILTZ, U., ALTEN, R., FLECK, M., KRÜGER, K., MANGER, B., MÜLLER-LADNER, U., NÜSSLEI, H., REUSS-BORST, M., SCHWARTING, A., SCHULZE-KOOPS, H., TAUSCHE, A. & BRAUN, J. 2016. Langfassung zur S2e-Leitlinie Gichtarthritis (fachärztlich). *Zeitschrift für Rheumatologie*, 75, 11-60.
- KIRBY, A., GNIRKE, A., JAFFE, D. B., BAREŠOVÁ, V., POCHE, N., BLUMENSTIEL, B., YE, C., AIRD, D., STEVENS, C., ROBINSON, J. T., CABILI, M. N., GATVIKS, I., KELLIHER, E., DAZA, R., DEFELICE, M., HŮLKOVÁ, H., SOVOVÁ, J., VYLET'AL, P., ANTIGNAC, C., GUTTMAN, M., HANDSAKER, R. E., PERRIN, D., STEELMAN, S., SIGURDSSON, S., SCHEINMAN, S. J., SOUGNEZ, C., CIBULSKIS, K., PARKIN, M., GREEN, T., ROSSIN, E., ZODY, M. C., XAVIER, R. J., POLLAK, M. R., ALPER, S. L., LINDBLAD-TOH, K., GABRIEL, S., HART, P. S., REGEV, A., NUSBAUM, C., KMOCH, S., BLEYER, A. J., LANDER, E. S. & DALY, M. J. 2013. Mutations causing medullary cystic kidney disease type 1 lie in a large VNTR in MUC1 missed by massively parallel sequencing. *Nature Genetics*, 45, 299-303.
- KUDO, E., KAMATANI, N., TEZUKA, O., TANIGUCHI, A., YAMANAKA, H., YABE, S., OSABE, D., SHINOHARA, S., NOMURA, K., SEGAWA, M., MIYAMOTO, T., MORITANI, M., KUNIKA, K. & ITAKURA, M. 2004. Familial juvenile hyperuricemic nephropathy: detection of mutations in the uromodulin gene in five Japanese families. *Kidney Int*, 65, 1589-97.
- KUHLMANN, U., BÖHLER, J., LUFT, F. C., ALSCHER, M. D. & KUNZENDORF, U. 2015. *Nephrologie Stuttgart*, Georg Thieme Verlag.
- LEE, J. W., CHOU, C. L. & KNEPPER, M. A. 2015. Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol*, 26, 2669-77.
- LINDNER, T. H., NJOLSTAD, P. R., HORIKAWA, Y., BOSTAD, L., BELL, G. I. & SOVIK, O. 1999. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1beta. *Hum Mol Genet*, 8, 2001-8.
- LÖFFLER/PETRIDES 2014. *Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin, Springer Medizin.
- LU, J., HOU, X., YUAN, X., CUI, L., LIU, Z., LI, X., MA, L., CHENG, X., XIN, Y., WANG, C., ZHANG, K., WANG, X., REN, W., SUN, R., JIA, Z., TIAN, Z., MI, Q. S. & LI,

- C. 2018. Knockout of the urate oxidase gene provides a stable mouse model of hyperuricemia associated with metabolic disorders. *Kidney Int*, 93, 69-80.
- LU, N., DUBREUIL, M., ZHANG, Y., NEOGI, T., RAI, S. K., ASCHERIO, A., HERNAN, M. A. & CHOI, H. K. 2016. Gout and the risk of Alzheimer's disease: a population-based, BMI-matched cohort study. *Ann Rheum Dis*, 75, 547-51.
- MA, L., LIU, Y., EL-ACHKAR, T. M. & WU, X. R. 2012. Molecular and cellular effects of Tamm-Horsfall protein mutations and their rescue by chemical chaperones. *J Biol Chem*, 287, 1290-305.
- MA, L., LIU, Y., LANDRY, N. K., EL-ACHKAR, T. M., LIESKE, J. C. & WU, X. R. 2017. Point mutation in D8C domain of Tamm-Horsfall protein/uromodulin in transgenic mice causes progressive renal damage and hyperuricemia. *PLoS One*, 12, e0186769.
- MAIUOLO, J., OPPEDISANO, F., GRATTERI, S., MUSCOLI, C. & MOLLACE, V. 2016. Regulation of uric acid metabolism and excretion. *International Journal of Cardiology*, 213, 8-14.
- MAZZALI, M., KANELIS, J., HAN, L., FENG, L., XIA, Y. Y., CHEN, Q., KANG, D. H., GORDON, K. L., WATANABE, S., NAKAGAWA, T., LAN, H. Y. & JOHNSON, R. J. 2002. Hyperuricemia induces a primary renal arteriopathy in rats by a blood pressure-independent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F991-7.
- MO, L., HUANG, H. Y., ZHU, X. H., SHAPIRO, E., HASTY, D. L. & WU, X. R. 2004a. Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int*, 66, 1159-66.
- MO, L., ZHU, X. H., HUANG, H. Y., SHAPIRO, E., HASTY, D. L. & WU, X. R. 2004b. Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated *Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286, F795-802.
- MUTIG, K., KAHL, T., SARITAS, T., GODES, M., PERSSON, P., BATES, J., RAFFI, H., RAMPOLDI, L., UCHIDA, S., HILLE, C., DOSCHE, C., KUMAR, S., CASTANEDA-BUENO, M., GAMBA, G. & BACHMANN, S. 2011. Activation of the bumetanide-sensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner. *J Biol Chem*, 286, 30200-10.
- NASR, S. H., LUCIA, J. P., GALGANO, S. J., MARKOWITZ, G. S. & D'AGATI, V. D. 2008. Uromodulin storage disease. *Kidney Int*, 73, 971-6.
- NAULI, S. M., ALENGHAT, F. J., LUO, Y., WILLIAMS, E., VASSILEV, P., LI, X., ELIA, A. E., LU, W., BROWN, E. M., QUINN, S. J., INGBER, D. E. & ZHOU, J. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet*, 33, 129-37.
- ORSKOV, I., FERENCZ, A. & ORSKOV, F. 1980. Tamm-Horsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type 1 fimbriated *Escherichia coli*. *Lancet*, 1, 887.
- PAK, J., PU, Y., ZHANG, Z. T., HASTY, D. L. & WU, X. R. 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J Biol Chem*, 276, 9924-30.
- PENNICA, D., KOHR, W. J., KUANG, W. J., GLAISTER, D., AGGARWAL, B. B., CHEN, E. Y. & GOEDDEL, D. V. 1987. Identification of human uromodulin as the Tamm-Horsfall urinary glycoprotein. *Science*, 236, 83-8.
- PHAY, J. E., HUSSAIN, H. B. & MOLEY, J. F. 2000. Cloning and Expression Analysis of a Novel Member of the Facilitative Glucose Transporter Family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics*, 66, 217-220.

- PIRET, S. E., OLINGER, E., REED, A. A. C., NESBIT, M. A., HOUGH, T. A., BENTLEY, L., DEVUYST, O., COX, R. D. & THAKKER, R. V. 2017. A mouse model for inherited renal fibrosis associated with endoplasmic reticulum stress. *Dis Model Mech*, 10, 773-786.
- PREITNER, F., BONNY, O., LAVERRIERE, A., ROTMAN, S., FIRSOV, D., DA COSTA, A., METREF, S. & THORENS, B. 2009. Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15501-6.
- PREJBISZ, A., SELLIN, L., SZWENCH-PIETRASZ, E., WOZNOWSKI, M., MICHALOWSKA, I., BLONDIN, D., SAJNAGA, D., EPPLEN, J. T., LITWIN, M., DEKOMIEN, G., JANUSZEWICZ, M., HELMCHEN, U., MATUSZKIEWICZ-ROWINSKA, J., ADAMCZAK, M., WIECEK, A., JANUSZEWICZ, A. & RUMP, L. C. 2015. Smaller caliber renal arteries are a novel feature of uromodulin-associated kidney disease. *Kidney Int*, 88, 160-6.
- RAMPOLDI, L., CARIDI, G., SANTON, D., BOARETTO, F., BERNASCONI, I., LAMORTE, G., TARDANICO, R., DAGNINO, M., COLUSSI, G., SCOLARI, F., GHIGGERI, G. M., AMOROSO, A. & CASARI, G. 2003. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet*, 12, 3369-84.
- RAMPOLDI, L., SCOLARI, F., AMOROSO, A., GHIGGERI, G. & DEVUYST, O. 2011. The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney Int*, 80, 338-47.
- RAO, G. N., CORSON, M. A. & BERK, B. C. 1991. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet-derived growth factor A-chain expression. *J Biol Chem*, 266, 8604-8.
- RENIGUNTA, A., RENIGUNTA, V., SARITAS, T., DECHER, N., MUTIG, K. & WALDEGGER, S. 2011. Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function. *J Biol Chem*, 286, 2224-35.
- SAEMANN, M. D., WEICHART, T., ZEYDA, M., STAFFLER, G., SCHUNN, M., STUHLMEIER, K. M., SOBANOV, Y., STULNIG, T. M., AKIRA, S., VON GABAIN, A., VON AHSEN, U., HORL, W. H. & ZLABINGER, G. J. 2005. Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 115, 468-75.
- SCHAEFFER, C., CATTANEO, A., TRUDU, M., SANTAMBROGIO, S., BERNASCONI, I., GIACHINO, D., CARIDI, G., CAMPO, A., MURTAS, C., BENONI, S., IZZI, C., DE MARCHI, M., AMOROSO, A., GHIGGERI, G. M., SCOLARI, F., BACHI, A. & RAMPOLDI, L. 2012. Urinary secretion and extracellular aggregation of mutant uromodulin isoforms. *Kidney Int*, 81, 769-78.
- SCHAEFFER, C., MERELLA, S., PASQUALETTO, E., LAZAREVIC, D. & RAMPOLDI, L. 2017. Mutant uromodulin expression leads to altered homeostasis of the endoplasmic reticulum and activates the unfolded protein response. *PLoS One*, 12, e0175970.
- SCHÄFFER, P., GOMBOS, É., MEICHELBECK, K., KISS, A., HART, P. S. & BLEYER, A. J. 2010. Childhood course of renal insufficiency in a family with a uromodulin gene mutation. *Pediatric Nephrology*, 25, 1355-1360.
- SCOLARI, F., CARIDI, G., RAMPOLDI, L., TARDANICO, R., IZZI, C., PIRULLI, D., AMOROSO, A., CASARI, G. & GHIGGERI, G. M. 2004. Uromodulin storage

- diseases: Clinical aspects and mechanisms. *American Journal of Kidney Diseases*, 44, 987-999.
- SRIVASTAVA, A., KAZE, A. D., MCMULLAN, C. J., ISAKOVA, T. & WAIKAR, S. S. 2018. Uric Acid and the Risks of Kidney Failure and Death in Individuals With CKD. *Am J Kidney Dis*, 71, 362-370.
- STAMP, L. K., CHAPMAN, P. T. & PALMER, S. C. 2016. Allopurinol and kidney function: An update. *Joint Bone Spine*, 83, 19-24.
- TSANG, K. Y., CHAN, D., BATEMAN, J. F. & CHEAH, K. S. 2010. In vivo cellular adaptation to ER stress: survival strategies with double-edged consequences. *J Cell Sci*, 123, 2145-54.
- VYLET'AL, P., KUBLOVA, M., KALBACOVA, M., HODANOVA, K., BARESOVA, V., STIBURKOVA, B., SIKORA, J., HULKOVA, H., ZIVNY, J., MAJEWSKI, J., SIMMONDS, A., FRYNS, J. P., VENKAT-RAMAN, G., ELLEDER, M. & KMOCH, S. 2006. Alterations of uromodulin biology: a common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney Int*, 70, 1155-69.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WANG, Z., CUI, T., CI, X., ZHAO, F., SUN, Y., LI, Y., LIU, R., WU, W., YI, X. & LIU, C. 2019. The effect of polymorphism of uric acid transporters on uric acid transport. *J Nephrol*, 32, 177-187.
- WANGSIRIPAISAN, A., GENGARO, P. E., EDELSTEIN, C. L. & SCHRIER, R. W. 2001. Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int*, 59, 932-40.
- WEISSKOPF, M. G., O'REILLY, E., CHEN, H., SCHWARZSCHILD, M. A. & ASCHERIO, A. 2007. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*, 166, 561-7.
- WIGGINS, R. C. 1987. Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions. *Clinica Chimica Acta*, 162, 329-340.
- WILLIAMS, S. E., REED, A. A., GALVANOVSKIS, J., ANTIGNAC, C., GOODSHIP, T., KARET, F. E., KOTANKO, P., LHOTTA, K., MORINIERE, V., WILLIAMS, P., WONG, W., RORSMAN, P. & THAKKER, R. V. 2009. Uromodulin mutations causing familial juvenile hyperuricaemic nephropathy lead to protein maturation defects and retention in the endoplasmic reticulum. *Hum Mol Genet*, 18, 2963-74.
- WOLF, M. T., MUCHA, B. E., ATTANASIO, M., ZALEWSKI, I., KARLE, S. M., NEUMANN, H. P., RAHMAN, N., BADER, B., BALDAMUS, C. A., OTTO, E., WITZGALL, R., FUCHSHUBER, A. & HILDEBRANDT, F. 2003. Mutations of the Uromodulin gene in MCKD type 2 patients cluster in exon 4, which encodes three EGF-like domains. *Kidney Int*, 64, 1580-7.
- WOODWARD, O. M., KOTTGEN, A., CORESH, J., BOERWINKLE, E., GUGGINO, W. B. & KOTTGEN, M. 2009. Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 10338-42.
- WRIGHT, A. F., RUDAN, I., HASTIE, N. D. & CAMPBELL, H. 2010. A 'complexity' of urate transporters. *Kidney Int*, 78, 446-52.
- WU, X. W., MUZNY, D. M., LEE, C. C. & CASKEY, C. T. 1992. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution. *J Mol Evol*, 34, 78-84.

- YOKOTA, N., YAMANAKA, H., YAMAMOTO, Y., FUJIMOTO, S., ETO, T. & TANAKA, K. 1991. Autosomal dominant transmission of gouty arthritis with renal disease in a large Japanese family. *Ann Rheum Dis*, 50, 108-11.
- ZAUCKE, F., BOEHNLEIN, J. M., STEFFENS, S., POLISHCHUK, R. S., RAMPOLDI, L., FISCHER, A., PASCH, A., BOEHM, C. W., BAASNER, A., ATTANASIO, M., HOPPE, B., HOPFER, H., BECK, B. B., SAYER, J. A., HILDEBRANDT, F. & WOLF, M. T. 2010. Uromodulin is expressed in renal primary cilia and UMOD mutations result in decreased ciliary uromodulin expression. *Hum Mol Genet*, 19, 1985-97.
- ZHANG, K. Z. & KAUFMAN, R. J. 2008. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, 454, 455-462.
- ZHOU, Y., FANG, L., JIANG, L., WEN, P., CAO, H., HE, W., DAI, C. & YANG, J. 2012. Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF-kappaB signaling pathway. *PLoS One*, 7, e39738.
- ZIVNA, M., HULKOVA, H., MATIGNON, M., HODANOVA, K., VYLET'AL, P., KALBACOVA, M., BARESOVA, V., SIKORA, J., BLAZKOVA, H., ZIVNY, J., IVANEK, R., STRANECKY, V., SOVOVA, J., CLAES, K., LERUT, E., FRYNS, J. P., HART, P. S., HART, T. C., ADAMS, J. N., PAWTOWSKI, A., CLEMESY, M., GASC, J. M., GUBLER, M. C., ANTIGNAC, C., ELLEDER, M., KAPP, K., GRIMBERT, P., BLEYER, A. J. & KMOCH, S. 2009. Dominant renin gene mutations associated with early-onset hyperuricemia, anemia, and chronic kidney failure. *Am J Hum Genet*, 85, 204-13.

## 6 Anhang

## 7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Lars-Christian Rump für die Möglichkeit, sowohl meine Dissertation als auch meine Facharztausbildung in der Klinik für Nephrologie absolvieren zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Lorenz Sellin danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seine konstruktiven Rückmeldungen und seine fortwährend wohlwollende und wertvolle Förderung und Unterstützung, auch während meiner klinischen Ausbildung.

Frau Dr. med. Eva Königshausen danke ich für ihre sehr fundierte und hilfreiche Unterstützung bei allen Fragen, ihr offenes Ohr und ihren stetigen Optimismus. Ich kann mir keine bessere Betreuung vorstellen!

Herrn Dr. med. Paul Probst danke ich für die Vorarbeiten zu diesem Thema.

Ich bedanke mich bei Frau Blanka Duvnjak, Frau Nicola Kuhr und Frau Christina Schwandt für ihre Hilfsbereitschaft während meiner experimentellen Tätigkeit und die angenehme Zusammenarbeit im Labor.

Sophia, Saskia, Leonie und Nora danke ich für die Korrektur und die Anmerkungen zu meiner Doktorarbeit.

Vor allem danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Reinhard und Margarete, für ihre bedingungslose und zweifellose Liebe, ihre Unterstützung und ihre Ermutigung auf allen meinen Wegen.