

## 1 Einleitung

### 1.1 Organisation des Nephrons

Die funktionelle Einheit der Niere, das Nephron, besteht aus Glomerulus, proximalem Tubulus, intermediärem Tubulus und distalem Tubulus. Im proximalen Tubulus (PT) werden histologisch zwei Anteile unterschieden: die Pars convoluta sowie die Pars recta. Zytologisch unterteilt sich der PT in drei Segmente, die als S1, S2 und S3 bezeichnet werden. Der intermediäre Tubulus umfasst die dünnen Teile der ab- bzw. aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (DTL/ATL). Der distale Tubulus, dessen Funktion Schwerpunkt dieser Arbeit ist, setzt sich aus Pars recta (dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife; TAL) und Pars convoluta (DCT) zusammen. Der anschließende Verbindungstubulus (CNT) liegt zwischen DCT und dem Sammelrohr (CD). Im letzteren werden das kortikale (CCD) und das medulläre Sammelrohr (MCD) unterschieden (Überblick in Kriz W et al, 1988). Abbildung 1 zeigt schematisch die Eingliederung der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (Syntheseort von Tamm-Horsfall Protein, THP) in das Nephron- und Sammelrohrsystem.

### 1.2 Ionen- und Wassertransport in Segmenten des Nephrons - Übersicht

Die Niere ist zentrales Regulationsorgan des Wasser- und Elektrolythaushalts und trägt so wesentlich zur Konstanzhaltung des inneren Milieus bei. Die transzelluläre Rückresorption von Wasser wird durch Aquaporine (AQP) gewährleistet. Nach den einzelnen Nephronsegmenten geordnet werden hierbei verschiedene Formen der AQP exprimiert, deren Aktivität zum Teil durch das antidiuretische Hormon (ADH) gesteuert ist (King LS et al, 2004). Die Regulation der Elektrolytbilanz erfolgt u.a. durch Koordination der segmental gegliederten Leistungen der Nierenepithelien. Jedes der tubulären Segmente weist ein spezifisches Expressionsmuster an luminalen und basolateralen Ionentransportern und Kanälen auf, die an der Passage von Natrium und weiteren Elektrolyten beteiligt sind (Überblick in Bachmann S et al, 1999; Loffing J et al, 2003). Die Natrium-„Pumpe“ des P-Typs ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase) sorgt

prinzipiell auf der basolateralen Seite als treibende Kraft für den transepithelialen Elektrolytstrom (Pedersen P et al, 1987) und ermöglicht somit die Arbeit der sekundär-aktiven luminalen Ionentransportproteine.

Natrium ist das anteilmäßig am reichlichsten im Organismus vorhandene Elektrolyt. Das Extrazellulärvolumen wird entscheidend durch den Gesamtgehalt von Natriumchlorid bestimmt und über die renale Ausscheidung von Natrium reguliert. Natrium wird im Glomerulus frei filtriert und im Tubulussystem unter Normalbedingungen fast vollständig rückresorbiert (Überblick in Greger R, 2000). Der Hauptteil der  $\text{Na}^+$ -Resorption findet im PT, vorwiegend durch die Leistung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers Typ 3 (NHE3), statt. Dabei wird die Resorptionsleistung im PT Änderungen der glomerulär filtrierten  $\text{Na}^+$ -Menge so angepasst, dass der prozentuale Anteil der proximal tubulären  $\text{Na}^+$  Resorption weitgehend konstant bleibt (ca. 60-70%). Diese Anpassung wird im Rahmen des "glomerulo-tubulären Gleichgewichts" vollzogen (Überblick in Brunner FP et al, 1966). In der DTL wird Wasser, aber kein  $\text{Na}^+$  rückresorbiert. Der ATL ist dagegen für Wasser undurchlässig, jedoch hoch durchlässig für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$ , welche hier passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten in das Interstitium eintreten. Der daran anschließende TAL ist der Motor des Konzentrationsmechanismus. Hier werden 20 bis 30% des filtrierten  $\text{Na}^+$ , vermittelt durch den luminalen, Furosemid-hemmbareren  $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$  -Kotransporter Typ 2 (NKCC2), resorbiert. Da die AQP's im TAL fehlen, ist dieses Segment für Wasser weitgehend undurchlässig. Die aktive, ATP-abhängige Salzresorption im TAL wird als Einzeleffekt bezeichnet (Rocha AS et al, 1973). Im DCT, CNT und CD wird wesentliche Feineinstellungsarbeit geleistet. Mit Hilfe des Thiazid-hemmbareren  $\text{Na}^+, \text{Cl}^-$ -Kotransporters (NCC) werden im DCT weitere 5-10% des  $\text{Na}^+$  zurückgewonnen. Ferner werden im späten DCT, CNT und CD die  $\text{Na}^+$ -Resorption sowie die  $\text{K}^+$ -Ausscheidung durch die Zusammenarbeit des Amilorid-sensitiven epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals (ENaC) und des luminalen  $\text{K}^+$ -Kanals (ROMK) endgültig eingestellt. Die Regulation des Ionentransports in DCT und CNT erfolgt u.a. abhängig von Aldosteron (Meneton P et al, 2004). Der Ionentransport in CD hängt von der  $\text{Na}^+$ -Beladung dieses Segmentes, vom  $\text{K}^+$ -Status sowie von verschiedenen endo- und parakrinen Faktoren (u.a. Prostaglandin  $\text{E}_2$  und natriuretisches

Peptid) (Überblick in Greger R, 2000). Das Sammelrohr ist außerdem für die adaptive Einstellung der renalen Wasserausscheidung entscheidend. Hier werden unter ADH-Kontrolle 10 bis 15% Wasser, vermittelt durch das luminale AQP2 und das basolaterale AQP3 bzw. AQP4, rückresorbiert. Dieser Vorgang wird von dem im Rahmen des renalen Konzentrationsmechanismus geschaffenen osmotischen Gradienten angetrieben (Überblick in Sands JM et al, 1996). Der osmotische Gradient im äußeren Mark wird entscheidend durch die Leistung des TAL aufgebaut. Somit spielt der TAL auch eine Schlüsselrolle bei der Gegenstrommultiplikation im Rahmen der Harnkonzentrierung.

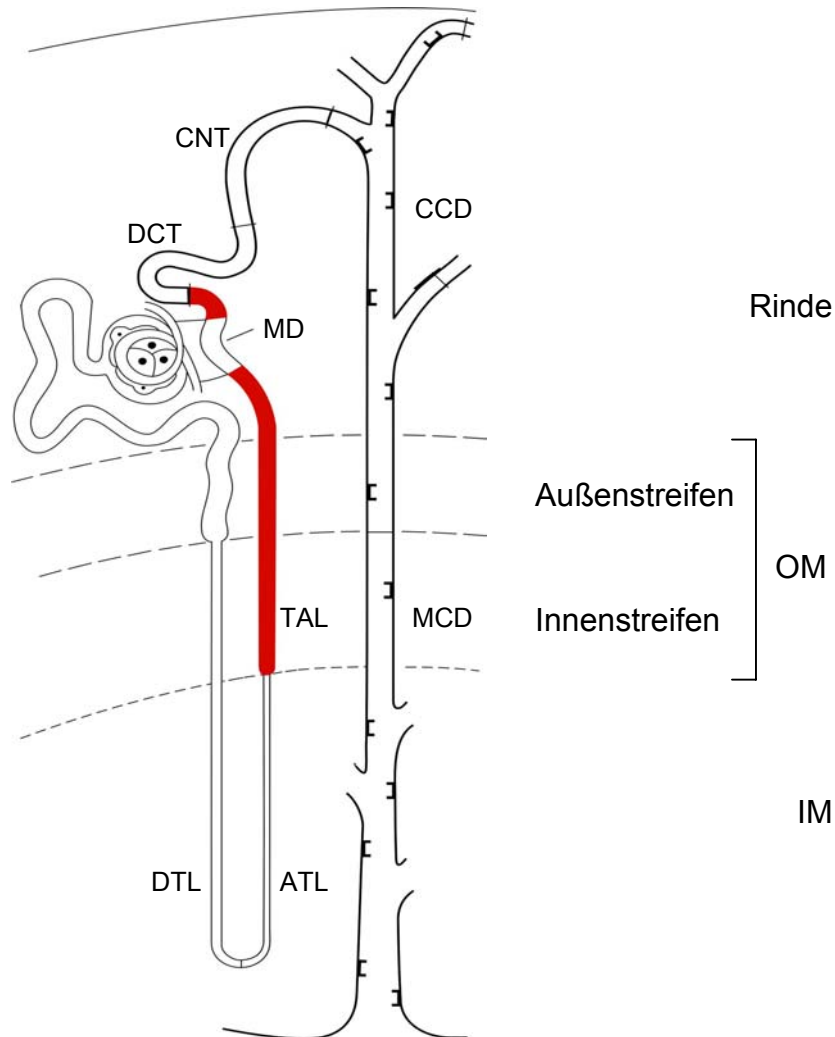
### **1.3 Struktur der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

Der TAL beginnt in der Außenzone des Nierenmarks am Übergang der Innenzone in den Innenstreifen, steigt weiter in den Außenstreifen und dann in die Rinde auf und bildet an der Kontaktstelle mit dem zugehörigen Nierenkörperchen die Macula densa (MD) aus. Kurz hinter der MD geht der TAL in den DCT über. Der TAL besteht aus interdigitierenden Epithelzellen, deren basolaterale Fortsätze reich an Mitochondrien zur Energiebereitstellung für die basolaterale  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  sind. Die dichte Verbindung der Zellen untereinander wird durch eine stark entwickelte Zonula occludens gewährleistet. Die luminale Oberfläche der TAL-Zellen ist spärlich mit kurzen Mikrovilli ausgestattet (Überblick in Madsen KM et al, 1986; Abb. 2). Die im TAL integrierte MD ist ein Plateau aus ca. 20-30 Zellen, die dem extraglomerulären Mesangium angelagert sind und einen Teil des juxtaglomerulären Apparates stellen. Die MD-Zellen besitzen große Zellkerne, die im lichtmikroskopischen Bild dicht nebeneinander erscheinen. Die Zellen sind nicht miteinander interdigitiert und besitzen deutliche Interzellularspalten (Kaissling B et al, 1982).

### **1.4 Funktion der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

Der TAL ist durch das Zusammenwirken mehrerer Ionentransporter, insbesondere des Furosemid-sensitiven NKCC2, ein Schlüsselement der Salz- und Wasserregulation der Niere. Funktionell steht der TAL im Dienst des renalen Konzentrationsmechanismus. Die MD dient als Sensor- und Regulationseinheit für die Einstellung des tubuloglomerulären Gleichgewichts.

Die intraluminale  $\text{Cl}^-$ -Konzentration an der MD spielt dabei eine entscheidende Rolle (Greger R, 1997). Zum einen wird die glomeruläre Filtrationsrate eines einzelnen Nephrons (SNGFR) über Änderungen der lokalen Adenosinkonzentration im Sinne einer kurzzeitigen Stabilisierung der distalen Ionenbeladung eingestellt. Zum anderen wird im Rahmen der Langzeiteffekte die Reninfreisetzung zur Anpassung der GFR moduliert (Schnermann J, 1998).



**Abbildung 1. Nephronaufbau** (modifiziert nach Kriz W).

Dargestellt ist ein Nephron mit langer Schleife. Der dünne absteigende Schenkel der Henle-Schleife (DTL) steigt bis in die Innenzone des Nierenmarkes (IM) ab. Der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife (TAL), als Ort der Synthese von THP, ist mit roter Farbe gekennzeichnet. Die Macula densa (MD) exprimiert kein THP und ist daher nicht rot markiert. OM – Außenzone des Nierenmarkes, PT – proximaler Tubulus, ATL – dünner aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife, DCT – distales Konvolut, CNT – Verbindungstubulus, CCD – kortikales Sammelrohr, MCD – medulläres Sammelrohr.

#### **1.4.1 Ionentransport in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

Die essentielle Leistung der TAL-Zelle ist der transzelluläre NaCl-Transport von luminal nach basal. Vermittelt wird dieser durch den luminalen NKCC2, auch als BSC1 bezeichnet. NKCC2 ist ein integrales Membranprotein aus einer Familie verwandter, Natrium-abhängiger Kationen-Chlorid (N[K]CC)-Transporter (Haas M et al, 1998). Im Säugerorganismus ist die Synthese von NKCC2 ausschließlich im TAL, inklusive der MD-Zellen, lokalisiert (Obermüller N et al, 1996). Das luminal aufgenommene  $\text{Na}^+$  wird basolateral mit Hilfe der  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase gegen  $\text{K}^+$  ausgetauscht. Zur Aufrechterhaltung des elektrochemischen Ionenäquilibrium der TAL-Zelle müssen die  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$ -Ionen die Zellen über geeignete Strukturen ebenfalls wieder verlassen (Abb. 3). Die entscheidenden Ionentransportproteine der TAL-Zelle sind somit neben dem NKCC2 ein luminaler  $\text{K}^+$ -Kanal (ROMK) und ein basolateraler  $\text{Cl}^-$ -Kanal (ClC-K2). Hinzu kommen Formen des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Tauschers (NHE), die als NHE1 und NHE4 basolateral, und als NHE2 und NHE3 luminal lokalisiert worden sind (Überblick in Bachmann S et al, 1999), ein basolateraler  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Tauscher (Vorum H, 2000), und weitere  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle. Der parazelluläre Transport wird offenbar wesentlich durch ein segmentspezifisches Protein des distalen Tubulus, Paracellin-1, hinsichtlich der Passage divalenter Kationen gesteuert (Simon DB et al, 1999). AQPs werden im TAL nicht exprimiert, wodurch dieses Nephronsegment für Wasser undurchlässig ist.

#### **1.4.2 Beteiligung der dicken aufsteigenden Henle-Schleife am Harnkonzentrationsmechanismus**

Die Harnkonzentrierung wird durch die Zusammenarbeit der distalen Nephronsegmente und der Vasa recta ermöglicht. Die selektive Durchlässigkeit einzelner Nephronsegmente für Wasser, Ionen und Harnstoff spielt dabei eine große Rolle. Kuhn W und Ryffel K (1942) postulierten erstmalig, dass die Harnkonzentrierung im Nierenmark durch einen Gegenstrommechanismus, welcher zum Aufbau eines longitudinalen osmotischen Gradienten führt, gewährleistet wird. Diese Hypothese wurde bei späteren Mikropunktionsstudien

bestätigt (Jamison RL et al, 1967; Marsch DJ et al, 1970). Dabei wurde der Einzeleffekt der Gegenstrommultiplikation (aktiver Prozess, der für den Aufbau des osmotischen Gradienten im Nierenmark verantwortlich ist) im TAL lokalisiert. Da der TAL für Wasser weitgehend undurchlässig ist, führt die aktive  $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ -Resorption in diesem Segment zur Verdünnung der intratubulären Flüssigkeit (daher die Bezeichnung „Verdünnungssegment“) bzw. zur primären Verschiebung des osmotischen Gleichgewichts zwischen intratubulärem Inhalt und Interstitium im äußeren Nierenmark. Die intratubuläre Osmolalität wird dabei vermindert, während die Osmolalität des Interstitiums steigt. Im inneren Nierenmark werden, laut dem Modell von Kokko JP, Rector FC und Stephenson JL (1972),  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  im ATL passiv entlang eines elektrochemischen Gradienten aufgenommen. Die hohe Osmolalität des Nierenmark-Interstitiums ist die entscheidende Treibkraft für die ADH-regulierbare Wasserresorption (AQP2) im CD (Überblick in Sands JM et al, 1996; Abb. 4).

#### **1.4.3 Regulation des Ionentransports in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

Die Salzresorption im TAL wird von mehreren Faktoren reguliert. Die wichtigsten hierbei sind ADH, Glukokortikoide, Glukagon, PTH, Angiotensin,  $\beta$ -adrenerge Agonisten sowie parakrine Systeme wie das L-Arginin-NO-System und das renale Prostaglandinsystem (Überblick in Bailly C, 1998). Die Wirkung von ADH ist für die renale Konzentrierungsfunktion von herausragender Bedeutung. Im Vordergrund steht hierbei der Effekt auf das Sammelrohr, in welchem Wasserkanäle (AQP2) und Harnstofftransporter gesteuert werden. Im TAL beeinflusst ADH die Schaffung eines hyperosmolaren Interstitiums über die Aktivierung bzw. gesteigerte Synthese von NKCC2 (Molony DA et al, 1987, Kim GH et al, 1999). Wie im Sammelrohr wird hier die ADH-Wirkung durch  $\text{V}_2$ -Rezeptoren ( $\text{V}_2\text{R}$ ) vermittelt. Die Bindung von ADH an  $\text{V}_2\text{R}$  führt zur G-Protein vermittelten Aktivierung von Adenylatzyklase VI, cAMP-Freisetzung und Proteinkinase A-Aktivierung. Hieraus resultieren die Phosphorylierung und zelluläre Umverteilung von NKCC2 von einem apikalen *Pool* zur luminalen Membran (Gimenez I et al, 2003) und dadurch ein erhöhter NaCl Transport. Zu den chronischen Effekten von ADH zählt u.a. die gesteigerte NKCC2-Synthese.

Die medullären Effekte sind dabei – parallel zur Mengenverteilung des V<sub>2</sub>R - ausgeprägter als die kortikalen; die erforderliche ADH-Konzentration für maximale Stimulation wiederum ist im TAL höher als die analoge V<sub>2</sub>R-abhängige Hochregulation von AQP2 im Sammelrohr (Klingler C et al, 1997). Unabhängig von ADH kann auch eine Dehydrierung die Hochregulation von NKCC2 bewirken. Dieser Mechanismus ist allerdings von einem geringeren Wirkungsgrad als die durch ADH vermittelten Effekte (Michimata M et al, 2003).

#### **1.4.4 Polarität und Proteinsortierung in Zellen der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

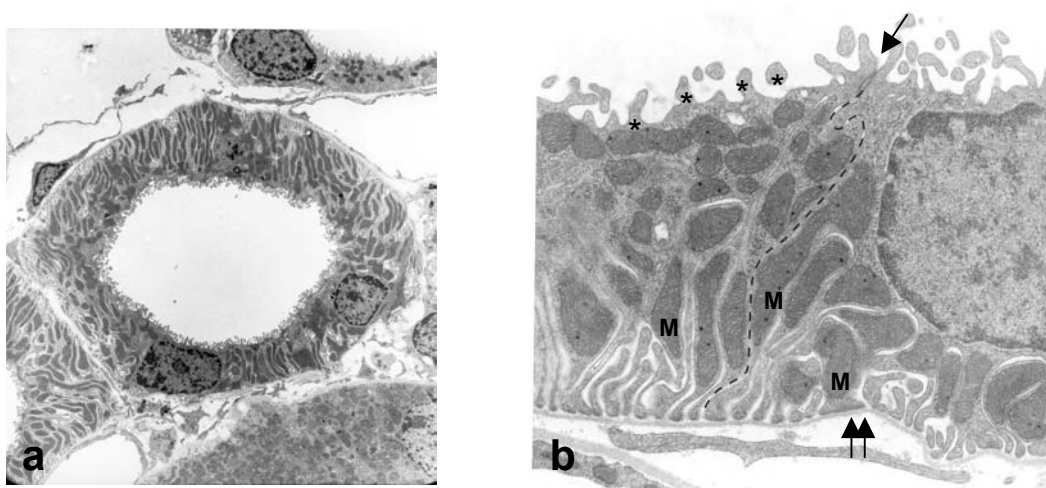
Das Epithel des TAL ist typisch für vektorielle Transportleistungen von Ionen und Soluten ausgebildet. Durch Tight junctions wird die TAL-Zelle in eine luminaire und eine basolaterale Domäne unterteilt. Der zelleigene Transportapparat ist für die polare Anordnung der Ionenporter verantwortlich. Die Ionenporter werden in Carriervesikeln transportiert, welche an entsprechenden Zieldomänen andocken. In den äußersten Cisternen des *Trans*-Golgi-Netzwerks werden apikale bzw. basolaterale Richtungen für Lipide und Proteine festgelegt. Ferner sind in neuerer Zeit die dynamischen Lipid-Mikrodomänen, die sogenannten „*Lipid rafts*“, hinsichtlich der polaren Anordnung von Membranproteinen als wichtige Stellgrößen bekannt geworden (Simons K et al, 2000; Simons M et al, 2001). Sie haben bei Proteintranslokation zwischen trans-Golgi-Kompartiment, exozytotischem Vesikelapparat und Recycling-Endosomen Bedeutung und beeinflussen die laterale Diffusion von Proteinen in der Zellmembran (Inoue H et al, 2002). In *Lipid rafts* können Proteine integriert werden, sofern sie über Transmembrandomänen oder spezielle Signalsequenzen, wie z.B. einen Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Membrananker, verfügen. Das orientierte *Sorting* der Proteine erfolgt dann entsprechend dieser Signalsequenzen. In dieser Hinsicht kann die Rolle von THP, welches einen GPI-Anker besitzt (Cavallone D, 2001), als Interaktionspartner bei der Sortierung und Translokation der TAL-Ionenporter diskutiert werden.

## 1.5 Biosynthese und Lokalisation des Tamm-Horsfall Proteins

THP wurde erstmalig von Igor Tamm und Frank Horsfall (1950) im Rahmen ihrer Suche nach potentiellen Inhibitoren der viralen Hämagoagglutination aus humanem Urin isoliert. Unabhängig von dieser Arbeitsgruppe wurde das Protein 1985 von Muchmore und Decker im Urin schwangerer Frauen erneut beschrieben und als „Uromodulin“ bezeichnet. Die Bezeichnung basierte dabei auf der *in vitro* nachgewiesenen immunosuppressiven Wirkung dieses Proteins (Muchmore AV et al, 1985; Muchmore AV et al, 1986; Hession C et al, 1987). Die Klonierung der Uromodulin-cDNS (1987) zeigte, dass die Uromodulin- und THP-cDNS komplett identisch sind und es sich somit um dasselbe Protein handelt (Pennica D et al, 1987; Hession C et al, 1987). Bei einer Tagesproduktion von ca. 50 mg ist THP das im humanen Urin am reichlichsten vorhandene Protein (Überblick in Serafini-Cessi et al, 2003).

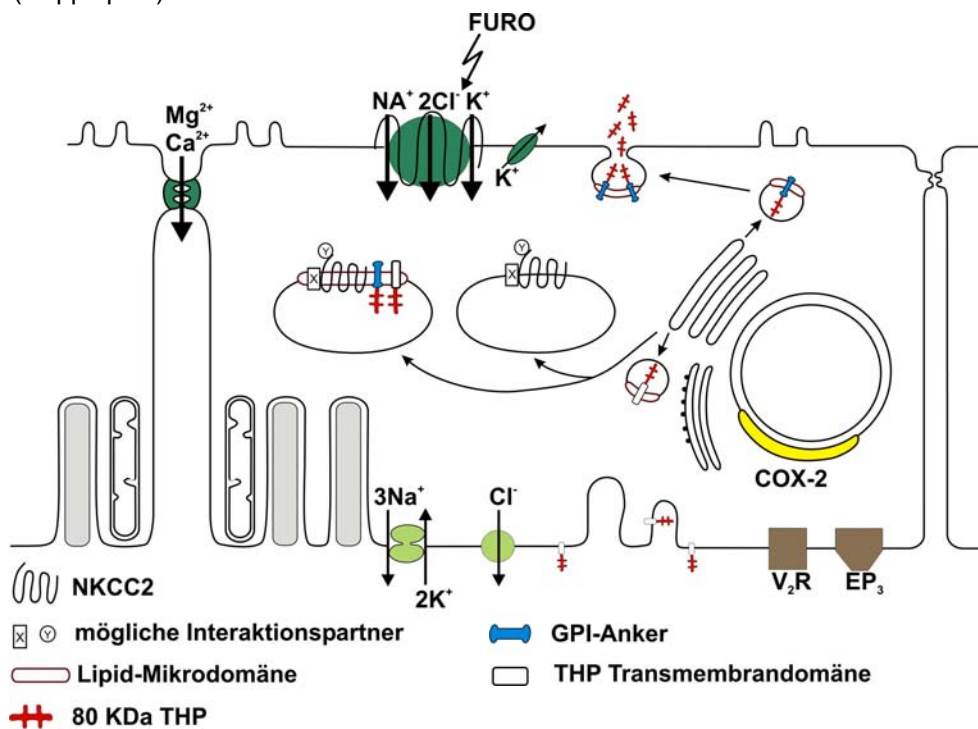
THP wird nur renal und nur im TAL exprimiert und wird als das typische Markerprotein der dicken aufsteigenden Henle-Schleife angesehen. Bachmann S et al (1985) zeigten in der Rattenniere mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung und Immunogoldtechnik, dass die THP-Synthese ausschließlich im TAL lokalisiert ist. Die MD-Zellen produzieren jedoch kein THP. Ein Teil des THP wurde basolateral detektiert, die Hauptmenge des intrazellulären THP befand sich jedoch in dem subapikalen Speicherkompartimenten sowie in der apikalen Membran der TAL Zelle (Bachmann S et al, 1985; Bachmann S et al, 1990). In Abbildung 5 wird das beschriebene THP-Expressionsmuster mittels Immunohistochemie, In-situ-Hybridisierung und Immunogold-Elektronenmikroskopie demonstriert.





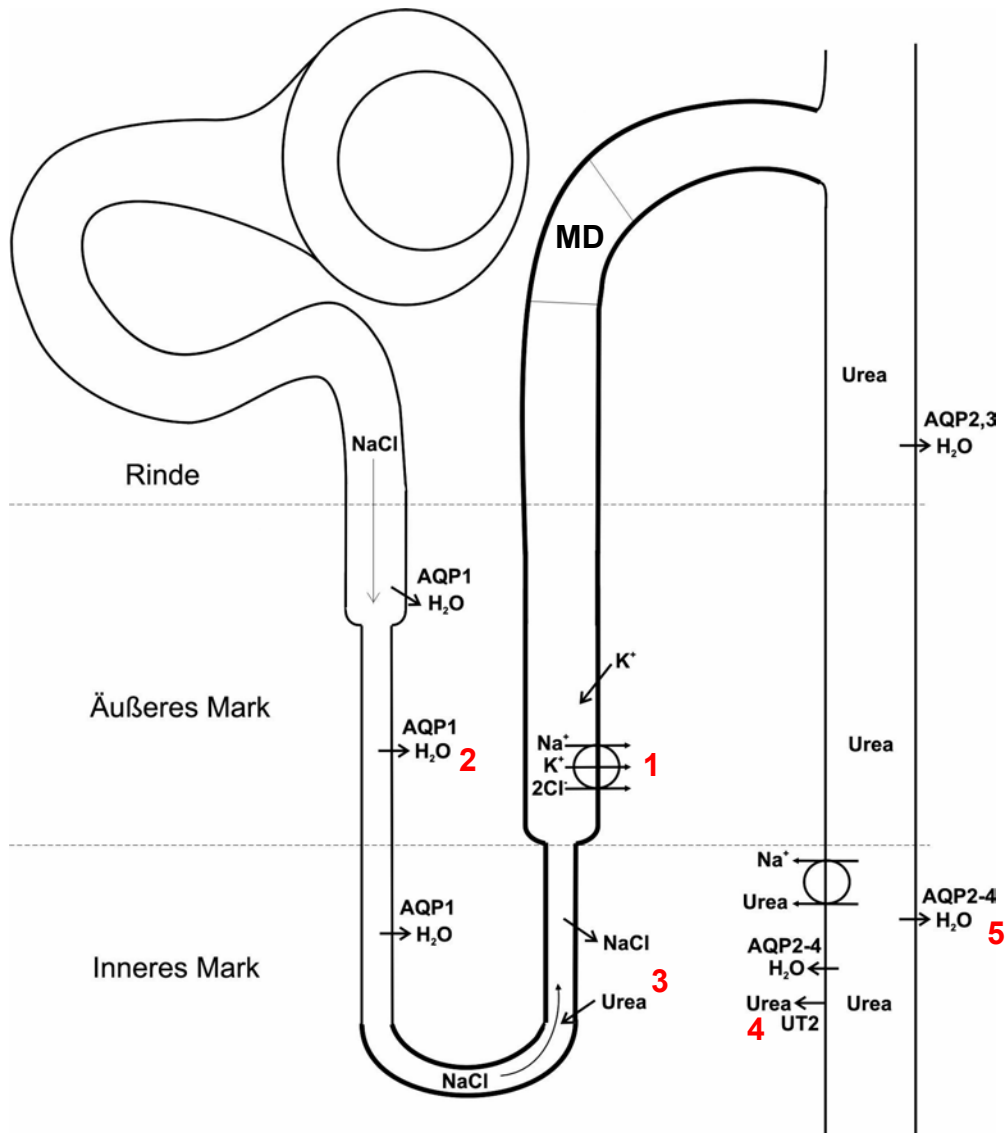
**Abbildung 2. TAL Ultrastruktur (Transmissionselektronenmikroskopie, TEM).**

**a** – Querschnitt medullärer TAL. **b** – TAL-Epithelzellen vergrößert. Basolaterale Fortsätze (punktierter Linie) zeichnen große Mitochondrien (M) auf. Zonula occludens (Einfachpfeil) ist stark entwickelt, luminalen Oberflächen sind mit Mikrovilli (\*) ausgestattet; Basalmembran (Doppelpfeil).



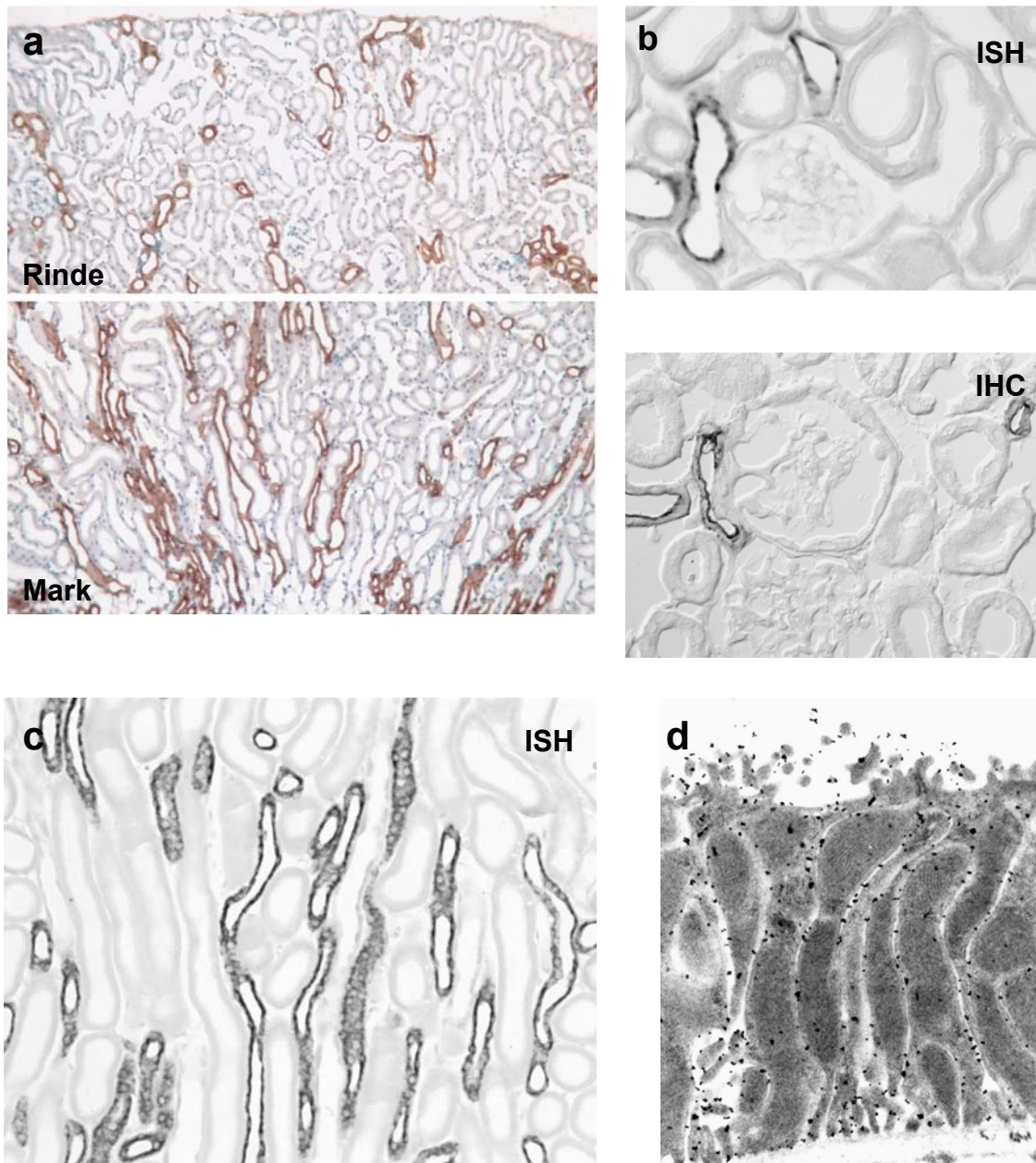
**Abbildung 3. Ionentransport in der TAL-Zelle.**

Im TAL werden  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  zusammen mit  $\text{K}^+$  durch den NKCC2 resorbiert. NKCC2 ist durch „Schleifen“-Diuretika wie Furosemid (FURO) hemmbar.  $\text{K}^+$  wird durch ROMK wieder nach luminal ausgeschieden.  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  gelangen über die NKA sowie den CLC-K2 ins Interstitium (Richtung der Ionenströme wird durch Pfeile dargestellt). Cyclooxygenase 2 (COX2) ist eine regulatorische Komponente im TAL, die Synthese erfolgt in der Macula densa und in den TAL-Zellen der juxtaglomerulären Region. Die ADH-Wirkung wird durch den Vasopressin-Rezeptor Typ 2 ( $\text{V}_2\text{R}$ ) vermittelt.



**Abbildung 4. Schematische Darstellung des segmental gegliederten Transports von NaCl, Harnstoff (Urea) und Wasser im Rahmen des renalen Konzentrationsmechanismus (Sands JM et al, 1996).**

Im TAL findet eine intensive Resorption von Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> durch NKCC2 aber keine Wasserresorption statt (1). Die intratubuläre Flüssigkeit wird verdünnt (hypoosmolar) und das Interstitium im äußeren Nierenmark mit Soluten angereichert (hyperosmolar). Eine intensive Wasserdiffusion durch AQP1 entlang dem osmotischen Gradienten aus dem Na<sup>+</sup>-impermeablen dünnen absteigenden Schenkel der Henle-Schleife (2) führt zum relativen Anstieg der Na<sup>+</sup>-Konzentration im IM-Abschnitt dieses Segmentes und ermöglicht den NaCl-Harnstoff-Austausch im wasserimpermeablen, aber für NaCl und Harnstoff durchlässigen, dünnen aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife (3). Die intensive Harnstoffresorption im IMCD (4) sorgt für die hohe Harnstoffkonzentration im IM-Interstitium. Die hohe osmotische Konzentration im Nierenmark-Interstitium treibt die durch ADH regulierbare Wasserresorption (AQP2) im Sammelrohr an (5). Transportrichtungen sind mit Pfeilen gezeigt. Wasserimpermeable Nephronsegmente sind durch die dicke schwarze Linie gekennzeichnet.

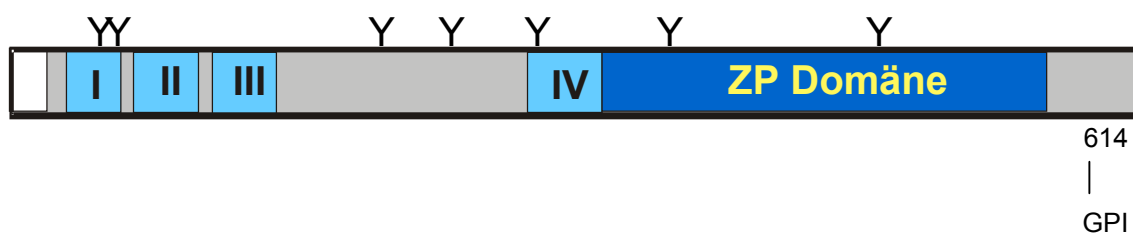


**Abbildung 5. THP-Lokalisation in der Mausniere.**

Die THP-Synthese wurde ausschließlich im TAL mittels Immunohistochemie (a) und In-situ-Hybridisierung mit einer spezifischen antisense RNS Probe (c) lokalisiert. MD-Zellen zeigen keine THP mRNA sowie THP Expression (b). Ultrastrukturelle Lokalisation von THP mittels Immunogoldtechnik zeigt das positive Signal in der apikalen Membran, in den exocytotischen Vesikeln sowie in der basolateralen Membran (d). IHC – Immunohistochemie, ISH – In-situ-Hybridisierung.

## 1.6 Proteinstruktur und Eigenschaften des Tamm-Horsfall Proteins

Zusammen mit dem homologen Glykoprotein-2 (GP2) der Pankreas-Zymogengranula bildet THP eine Proteinfamilie; GP-2 ist entscheidend am Ablauf der regulierten Exozytose der Zymogengranula beteiligt (Fukuoka S et al, 1992). Die beiden Proteine werden mit Hilfe eines Glycosyl Phosphatidylinositol (GPI) Ankers in die Membran integriert. Die Freisetzung von THP in den Urin erfolgt aber nicht durch die GPI-spezifische *Phosphatidylinositol phospholipase C cleavage*, sondern über Phenylalanin-spezifische Proteolyse (Fukuoka S et al, 2001). Die entsprechende Schnittstelle wird laut der THP-Sequenzdaten zwischen den Aminosäuren 23 und 24 postuliert (Rampoldi L et al, 2003). GP-2 wird ebenfalls über einen alternativen enzymatischen Mechanismus freigesetzt (Fukuoka S et al, 1992). Des Weiteren enthält die humanen THP-Sequenz insgesamt 48 Cysteinreste und vier dem Epidermal Growth Factor (EGF) ähnliche Domänen, welche teilweise bei GP-2 konserviert sind. Eine *Zona pellucida* (ZP) Domäne ermöglicht die Polymerisierung einzelner THP- bzw. GP-2-Moleküle zu größeren Konglomeraten (Jovine L et al, 2002; Rampoldi L et al, 2003). THP besitzt sieben N-Glykosilierungsstellen (Abb. 6).



**Abbildung 6. Proteinstruktur von humanem THP (modifiziert nach Rampoldi L et al).**

Die cbEGF-ähnlichen Domänen (I, II, III – Aminosäuren 31 bis 148, IV – 281-336) sind als hellblaue Kästen, die ZP-Domäne als dunkelblauer Kasten (Position 336-585) dargestellt. Die sieben Glykosilierungsstellen sind mit Y und der GPI-Anker mit GPI (Position 614) gekennzeichnet.

*EGF-ähnliche Domänen* sind häufig in die Struktur verschiedener sezernierter Proteine sowie in die extrazellulären Domänen von Membranproteinen eingebaut. Die funktionelle Bedeutung dieser Sequenz ist noch nicht endgültig geklärt. Eine EGF-ähnliche Domäne enthält sechs konservierte Cysteinreste (C1 bis C6), welche drei Disulfidbindungen bilden (C1-C2, C3-C4, C5-C6). Diese Bindungen sind für die Organisation der Tertiärstruktur der Domäne wichtig, welche letztendlich die Gesamtproteinfaltung beeinflusst.

THP bindet an die apikale Membran mit Hilfe des *GPI-Ankers* und wird durch eine proteolytische Spaltung, die zwischen Aminosäuren Phenylalanin (524) und Serin (525) stattfindet, in den Urin freigesetzt (Fukuoka S et al, 2001).

Im physiologisch zusammengesetzten Urin, d.h. Urin mit einer NaCl-Konzentration von ca. 100 mmol/l bzw. CaCl-Konzentration von ca. 1 mmol/l, tendiert THP zur Polymerisierung, welche durch die *ZP-Domäne* bedingt ist (Jovine L et al, 2002).

Der Kohlenhydratanteil beträgt etwa 30% des Human-THP-Gewichtes. Sieben von acht potenziellen Glykosilierungsstellen sind glykosiliert (Rampoldi L et al, 2003).

## **1.7 Funktion und klinische Relevanz des Tamm-Horsfall Proteins**

Seit 1950 wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um die biologische Relevanz dieses im Urin reichlich vorhandenen Proteins zu erläutern.

### **1.7.1 Tamm-Horsfall Protein im Zusammenhang mit der Funktion der dicken aufsteigenden Henle-Schleife**

THP wird seit langem in Verbindung mit der spezifischen Transportleistung des TAL diskutiert. Zunächst wurde die Hypothese erstellt, dass THP bei der Wasserimpermeabilität des TAL-Segmentes beiträgt. Dabei sollten die einzelnen THP-Moleküle zu einem gelartigen Film polymerisieren und die luminalen TAL-Oberfläche wasserdicht machen (Hoyer SR et al, 1979). Nach der Entdeckung der AQPs ist die Wasserdurchlässigkeit einzelner Nephronsegmente mit dem Expressionsmuster von AQP-Isoformen in der Niere zu erklären. Die Hauptaufgabe der TAL-Zelle ist eine intensive NaCl-Resorption, vermittelt durch den NKCC2. Mutationen des NKCC2 oder anderer

TAL-Ionen-transporter und assoziierter Proteine sind in neuerer Zeit als Formen des Bartter-Syndroms genetisch aufgeklärt und klassifiziert worden (Überblick in Hebert SC, 2003). Ein kritischer Salz- und Wasserverlust ist in diesem Krankheitsbild typisch (Shaer AJ et al, 2001). Insbesondere die antenatale (frühkindliche) Form (auch: Hyperprostaglandin-E Syndrom, „Furosemid-Syndrom“) zeigt neben einer Gedeihstörung, einer metabolischen Alkalose und einer normotensiven Hyperreninämie bei den betroffenen Kindern eine ausgeprägte Polyurie, Hypokaliämie, Hyperkalziurie und eine erhöhte Urin-Prostaglandinausscheidung (Kömhoff M et al, 2000; Hebert SC, 2003). Ebenso wie NKCC2 wird THP nur renal und hier nur im TAL exprimiert. Untersuchungen von Nierenbiopsien und Harnproben von Patienten mit kindlichem Bartter-Syndrom demonstrierten, dass die THP-Produktion bei der antenatalen Form dieses Syndroms drastisch unterdrückt war (Schröter J et al, 1993). Die funktionellen Zusammenhänge zwischen beiden Proteinen sind bislang nicht geklärt und werden in der vorliegenden Arbeit diskutiert. Als Protein mit einer Transmembrandomäne und alternativer Membranbindung durch den GPI-Anker wird THP – wie auch GP-2 - in Lipid-Mikrodomänen von Membranen seiner Ursprungszelle eingebaut (Cavallone D et al, 2001). Der GPI-Anker fungiert als Sortierungssignal für die apikale Membran. Hierbei könnte THP als ein Interaktionspartner für eine apikal-gerichtete Sortierung der TAL-Transporter bzw. deren Integration in die Zellmembran tätig sein. In dieser Hinsicht wurde eine verallgemeinerte Rolle der Mitglieder der GP2/THP-Proteinfamilie bei der regulierten vesikulären Vorgängen an der apikalen Membran postuliert (Fukuoka S et al, 1992).

### **1.7.2 Mutationen des THP (UMOD)-Gens: MCKD2 und FJHN**

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass Mutationen von THP bei Patienten mit Störungen des renalen Konzentrierungsmechanismus, mit strukturellen Veränderungen (interstitielle Fibrose, Markzystenbildung) und mit verändertem Harnsäuremetabolismus kausal in Verbindung stehen. Die autosomale dominante Form der Medullären Zystischen Nierenerkrankung Typ 2 (MCKD2) und die familiäre juvenile hyperurikämische Nephropathie (FJHN) sind zwei phänotypische Varianten der Mutationen im THP-Gen (Dahan K et al,



2001). Beide Krankheiten zeigen Hyperurikämie, medulläre Zysten, interstitielle Nephritis und progressive Niereninsuffizienz als Leitsymptome im klinischen Bild. Mit Hilfe des *Genom-wide linkage mapping* wurden in betroffenen italienischen, tschechischen und belgischen Familien die Loci für MCKD2 und FJHN in der Region des Chromosoms 16p11.2 sowie 16p12 lokalisiert (Dahan K et al, 2001; Hart TC et al, 2002). Da diese Region mit der Lokalisation des humanen THP-Gens überlappt (Pook MA et al, 1993), wurden in später folgenden Studien das THP-Gen sowie andere Genkandidaten bei Mitgliedern dieser Familien sequenziert. Dabei konnten bei klinisch betroffenen Personen einige Mutationen des THP-Gens, vorwiegend des Exons 4, identifiziert werden (Abb. 7). Die Ergebnisse dieser und anderer Studien bestätigen, dass beide Krankheiten, MCKD2 und FJHN, als phänotypische Erscheinungen der beschriebenen Mutationen des THP-Gens auftreten (Hart TC et al, 2002). Alle beschriebenen Mutationen beziehen mindestens eine Disulfidbindung mit ein (Rampoldi L et al, 2003). Dies könnte theoretisch zu einer Änderung der tertiären Struktur führen. Rampoldi L et al (2003) haben gezeigt, dass durch Mutation verändertes THP im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird, vermutlich aufgrund einer Änderung der Tertiärstruktur (Rampoldi L et al, 2003). Zellmetabolismusstörungen im TAL, die bei der intrazellulären Akkumulation von THP verursacht werden, könnten für einen Teil der klinischen Symptomatik beider Krankheiten verantwortlich sein.

THP soll auch in die Pathogenese verschiedener Krankheitszustände weiter distal liegender tubulärer Segmente (Myelomniere, Urolithiasis und tubulointerstitiale Nephritis) sowie der Harnwege (Harnwegsinfekte) miteinbezogen sein.

### **1.7.3 Beteiligung des Tamm-Horsfall Proteins an pathologischen Prozessen in der Niere**

#### ***Myelomniere (Cast-Nephropathie)***

Beim **multiplen Myelom** kommen monoklonale Immunglobuline in hoher Konzentration im Blut vor und werden schließlich auch glomerulär filtriert. Diese Leichtketten-Immunglobuline (vom Typ lambda oder kappa), auch Bence Jones Proteine genannt, haben eine tubulotoxische Wirkung und führen zu

einer Nierenschädigung, welche ein akutes Nierenversagen verursachen kann. Die entstehende Nierenschädigung wird als **Cast-Nephropathie** (**Cast**: englisch für **Zylinder**) bezeichnet, weil dabei unlösliche Eiweiss-Zylinder gebildet werden. Zylinder können morphologisch in granuläre, Hyalin-, Fett- und Leukozytenzylinder eingeteilt werden. THP ist eines der dominierenden Proteine in Hyalinzylindern, ist aber auch in anderen Zylindertypen zu finden. Der erste Nachweis von THP in Urinzylindern erfolgte durch McQueen EG mittels Immunofluoreszenz (McQueen EG, 1962). Gleichzeitig hat er die Präzipitation von THP beim Myelom-Protein nachgewiesen. Die Beteiligung von THP an der Zylinderbildung wird weiter durch seine Aggregationsfähigkeit bei isoosmotischen Salzkonzentrationen verstärkt. Unter physiologischen Bedingungen hat die intratubuläre Flüssigkeit im TAL eine hypoosmotische Salzkonzentration, welche die THP-Polymerisierung hemmt. In Experimenten an isolierten, perfundierten Schleifensegmenten wurde demonstriert, dass die charakteristischen „Myelom“ Proteine, wie Bence Jones Proteine, zur Verschlechterung der Chloridabsorption im TAL führen (Sanders PW et al, 1990; Sanders PW et al, 1992). Dies würde in einer erhöhten intratubulären NaCl resultieren und somit die THP-Aggregation stimulieren. Eine Aggregation von Zylinder-bildenden Proteinen (verschiedene „*Low molecular weight proteins*“, LMWPs) mit THP wurde auch in weiteren *in vitro* Experimenten nachgewiesen (Ying WZ et al, 2001). *In vivo* könnten sowohl eine erhöhte intratubuläre Osmolalität als auch die Neigung von bestimmten LMWPs zur Aggregation mit THP an der Zylinderbildung beteiligt sein. Dementsprechend konnten Huang ZQ et al (1997) die Leichtketten bindende THP-Aminosäuresequenz (Aminosäuren 225-233) identifizieren. Des Weiteren wurde mit Hilfe der Yeast two-hybrid Methode die für die Interaktion mit THP verantwortliche „*third complementarity-determining*“ Region bei den lambda- sowie kappa-Leichtketten identifiziert (Ying WZ et al, 2001).

### **Urolithiasis**

THP wurde beim Menschen als ein Bestandteil von Nierensteinen beschrieben (Keuthel HJ, 1965; Grant AM et al, 1973). Der THP-Gehalt der Nieren- und Harnblasensteine variierte dabei von 0,002 bis 5,07 mg/g. Korrelationen



zwischen dem THP-Gehalt und der qualitativen Zusammensetzung der anorganischen Komponenten bestehen nicht. Es wurde eine hemmende Wirkung von THP auf die Calcium-Oxalat- sowie die Hydroxiapatit-Kristallbildung postuliert (Hess B et al, 1989; Grover PK et al, 1998). Fellstrom B et al (1986) postulierten, dass die Hemmung der Kristallbildung im Urin gesunder Menschen in erster Linie durch die polyanionische Struktur der Makromolekülen gewährleistet wird. THP ist ein polyanionisches Makromolekül mit einem isoelektrischen Punkt von 3,5, welcher durch Glykosylierung und durch Sulfatgruppen zustande kommt. Es wurde gezeigt, dass THP die Kristallaggregation *in vitro* hemmt. Ein Entzug der Sialinsäure bei THP durch eine Neuroaminidase-Behandlung neutralisiert jedoch seine hemmende Wirkung auf die Kristallbildung (Hallson PC et al, 1997). Neuere Untersuchungen an einem THP defizienten Mausmodell stützen die Hypothese einer hemmenden Wirkung auf die Aggregation zu Kristallen durch THP weiter (Mo L et al, 2004).

### ***Ausscheidung des Tamm-Horsfall Proteins bei Nephropathien***

In einigen pathologischen Zuständen kann eine veränderte Ausscheidung von THP im Urin verzeichnet werden. Eine verminderte THP-Ausscheidung gilt allgemein als ein zuverlässiges Zeichen einer Schädigung der TAL-Epithelzellen. Beispielsweise wurde im Rahmen des antenatalen Hyperprostaglandin-E-Syndroms eine solche drastische Reduktion der THP Ausscheidung beschrieben (Schröter J et al, 1993). Beim Diabetes mellitus ist die THP-Ausscheidung in der Anfangsphase erhöht, nimmt aber mit der Progression der diabetischen Nephropathie deutlich ab (Bernard AM et al, 1987). Nach unilateraler Nephrektomie bei Ratten ist die THP-Ausscheidung der verbleibenden Niere auf ca. 40% erhöht (Torffvit O et al, 1997) und korreliert mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR).

#### **1.7.4 Tamm-Horsfall Protein als Schutzfaktor gegen Harnwegsinfektionen**

Der Schutz gegen Erreger von Harnwegsinfektionen wurde als eine mögliche Funktion von THP postuliert. Harnwegsinfektionen sind weit verbreitet, vor

allem Frauen und Kinder sind betroffen. *Escherichia coli* (*E coli*) sind die häufigsten Erreger dieser inflammatorischen Krankheitszustände. Durch Lectin-ähnliche Adhesine an der Fimbriae-Oberfläche sind diese Keime imstande, an die Kohlenhydrat-Strukturen verschiedener oberflächlicher Glykoproteine des Harnwegsepithels zu binden. *E coli*-Fimbrien werden nach ihren spezifischen Zuckerresten klassifiziert. THP besitzt sowohl Mannose-reiche als auch NeuAca2,3Gal-Sequenzen und kann somit als ein Ligand für beide, *E coli* Typ 1- und Typ S- Fimbrien dienen (Serafini-Cessi F et al, 2003). *E coli* Typ 1 ist die weit dominierende phänotypische Variante in Urinproben von Patienten mit Harnwegsinfektionen. Die Uroplakine Ia und Ib sind sehr reichlich in der Urothelmembran vorhandene Glykoproteine und stellen für *E coli* Typ 1 effiziente Zellrezeptoren dar. *In vitro* sowie in Zellkulturen konnte demonstriert werden, dass THP Typ 1 *E coli*-Fimbrien binden kann und mit den Uroplakinen um die Bindung an *E coli* effektiv konkurriert. Die Hypothese erhielt eine weitere *in vivo* Bestätigung durch Untersuchungen an THP-Knockout Mäusen (Bates JM et al, 2003; Mo L et al, 2003). Außerdem ist in neuesten Studien die Rolle des THP als eines der regulierenden Faktoren im Rahmen der angeborenen sowie der erworbenen Immunität betont worden (Saemann MD et al, 2005).