

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II

Direktorin: Frau Prof. Dr. S. Weber

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**„Der Einfluss von MAGED2 auf NHE3 in humanen  
embryonalen Nierenzellen (HEK293)“**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Lars Lennart Ruttkowski aus Soltau

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 08.06.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr Prof. Dr. M. Kömhoff

1. Korreferent: Herr PD Dr. C Haas

## Inhaltsverzeichnis

1.	Verzeichnisse .....	1
1.1.	Abkürzungsverzeichnis .....	1
1.2.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	3
1.	Einleitung .....	4
1.3.	Nierenphysiologische Grundlagen.....	4
1.3.1.	Entwicklung der Niere.....	5
1.3.2.	Renale Konzentrationsmechanismen .....	6
1.3.3.	Human embryonic kidney cells (HEK293).....	8
1.4.	Sodium-Hydrogen Antiproter 3 .....	9
1.4.1.	Geschichte und Entdeckung .....	9
1.4.2.	Aufbau, Funktion und Regulationsmechanismen .....	10
1.5.	Melanoma-associated antigen D2.....	11
1.5.1.	Geschichte und Entdeckung .....	11
1.5.2.	Aufbau, Funktion und Regulationsmechanismen .....	12
1.6.	Bartter-Syndrom.....	13
1.6.1.	Definition und Einteilung .....	13
1.6.2.	Pathophysiologie, Ätiologie und Symptomatik .....	13
1.6.3.	Therapie.....	15
1.6.4.	Das transiente antenatale Bartter-Syndrom und MAGED2 .....	16
1.7.	Wissenschaftliche Einordnung und Fragestellung .....	17
2.	Material und Methoden .....	19
2.1.	Chemikalien und Reaktionskits .....	19
2.2.	Lösungen und Antikörper .....	20
2.3.	Plasmide .....	21
2.4.	Geräte, Verbrauchsmaterial und Programme .....	23
2.5.	Zellkultur.....	24
2.5.1.	Zelllinien, Medien und Material .....	24
2.5.2.	Methoden der Kultivierung .....	24
2.6.	Zellbiologische Methoden .....	24
2.6.1.	Transfektionen.....	24
2.6.2.	Dose Response .....	25
2.6.3.	Cycloheximide Chase .....	25
2.6.4.	Cell Surface Biotinylation .....	26
2.6.5.	Proximity Ligation Assay .....	27
2.6.6.	Herstellung der Zelllysate.....	27
2.7.	Proteinbiochemie.....	28

2.7.1.	BCA-Proteinbestimmung .....	28
2.7.2.	Koimmunpräzipitation.....	28
2.7.3.	Western Blot.....	29
2.7.3.1.	SDS-Gele.....	29
2.7.3.2.	Laufprotokoll.....	29
2.7.3.3.	Blotten .....	30
2.7.3.4.	Immunfärbung und Immundetektion .....	30
2.7.3.5.	Stripping.....	30
3.	Ergebnisse .....	31
3.1.	Koimmunpräzipitation.....	31
3.2.	Proximity Ligation Assay .....	32
3.1.	Dose Response .....	33
3.2.	Cycloheximide Chase .....	34
3.3.	Cell Surface Biotinylation .....	35
3.4.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	36
4.	Methodenkritik.....	38
4.1.1.	Koimmunpräzipitation.....	38
4.1.2.	Proximity Ligation Assay .....	39
4.1.1.	Dose Response .....	39
4.1.2.	Cycloheximide Chase .....	40
4.1.3.	Cell Surface Biotinylation .....	40
5.	Diskussion .....	41
5.1.	Einordnung der Ergebnisse.....	41
5.1.1.	Zusammenfassende Interpretation .....	42
5.2.	Ausblick .....	43
6.	Zusammenfassung.....	44
7.	Summary .....	45
8.	Anhang.....	46
8.1.	Literaturverzeichnis.....	46
8.2.	Danksagung.....	52
8.3.	Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	53
8.4.	Tabellarischer Lebenslauf .....	53
8.5.	Ehrenwörtliche Erklärung .....	54

## 1. Verzeichnisse

### 1.1. Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
<b>AB</b>	Antibody
<b>ACE</b>	Angiotensin converting enzyme
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ATPase</b>	Adenosintriphosphatase
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid assay
<b>BS</b>	Bartter Syndrom
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calciumion
<b>cAMP</b>	Cyclisches Adenosinmonophosphat
<b>CaSR</b>	Calcium-sensing receptor
<b>CC</b>	Cycloheximide Chase
<b>CHP</b>	Calcineurin homologes Protein
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Chloridion
<b>ClC-Ka + b</b>	Chloride channel subunit Ka and b
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid
<b>Co-IP</b>	Koimmunpräzipitation
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>CSB</b>	Cell Surface Biotinylation
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DR</b>	Dose Response
<b>ECL</b>	Enhanced chemiluminescence
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>ENaC</b>	Epithelialer Natrium-Kanal
<b>FCS</b>	Fetal calf serum
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GFR</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>GS</b>	Gitelman Syndrom
<b>Gs-<math>\alpha</math></b>	Stimulating G-Protein subunit alpha

## Verzeichnisse

<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Bikarbonat
<b>HEK293</b>	Human embryonic kidney cells type 293
<b>HRP</b>	Horse-radish peroxidase
<b>Hsp40</b>	Heat shock protein 40
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G
<b>K<sup>+</sup></b>	Kaliumion
<b>Kir 4.1</b>	Inward rectifying potassium channel 4.1
<b>MAGED2</b>	Melanoma-associated antigen D2
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnesiumion
<b>MHD</b>	Mage homology domain
<b>MT</b>	Mutante
<b>Na<sup>+</sup></b>	Natriumion
<b>NaCl</b>	Kochsalz
<b>NHE3</b>	Sodium-Hydrogen Exchanger 3
<b>NHERF</b>	Sodium-Hydrogen Exchanger regulatory factor
<b>NKCC2</b>	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> Carrier
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PLA</b>	Proximity Ligation Assay
<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>ROMK</b>	Renal Outer Medullary Potassium Channel
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SGK</b>	Serum-Glukokortikoid-regulierte Kinase
<b>SLC9A3</b>	Solute Carrier Family 9 Member A3
<b>SSW</b>	Schwangerschaftswoche
<b>taBS</b>	Transientes antenatales Bartter Syndrom
<b>TBS</b>	Tris-buffered saline solution
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>TTBS</b>	Tris-buffered saline solution with Tween20
<b>WT</b>	Wildtyp

## 1.2. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der Nephrone und Glomeruli (aus Aumüller et al.) .....	4
Abbildung 2: Übersicht wichtiger Transportprozesse entlang des Nephrons (modifiziert nach Silbernagl et al. 2007) .....	6
Abbildung 3: Resorption und fraktionelle Ausscheidung (modifiziert nach Silbernagl et al. 2007) .....	7
Abbildung 4: Phylogenetik der Paralogie und Orthologie der Nhe-Genfamilie (nach Bobulescu und Moe 2006) .....	9
Abbildung 5: Struktur von NHE3 (nach Alexander und Grinstein 2009) .....	10
Abbildung 6: MAGED2 mit seinen möglichen Interaktionspartnern (modifiziert nach Kömhoff und Laghmani, 2018) .....	12
Abbildung 7: Darstellung der an Formen des Bartter-Syndroms beteiligten Kanäle (nach Seybert et al., 2017) .....	15
Abbildung 8: pCDNA3.1-Vektor mit Myc-getagtem MAGED2-WT bzw. -MT mit Mutation 1336 C>T ..	22
Abbildung 9: : PIRE5-Vektor mit EGFP und flag-getagtem NHE3-WT .....	22
Abbildung 10: Koimmunpräzipitation Ergebnisse. Input=natives Zelllysate; Co-IP= Zellproteinfraktion mit flag-Antikörpern herausgefiltert; Supernatant=Restliches Zelllysate, nach Inkubation mit flag-Beads. 1=NHE3-flag + MAGED2 WT-myc transfiziert; 2=NHE3-flag + MAGED2 MT-myc transfiziert. ....	31
Abbildung 11: Ergebnisse des Proximity Ligation Assays. Vergrößerung 100. Blaue Fluoreszenz=DAPI-Färbung der Nuclei; Rote Fluoreszenz=amplifiziertes SONDENSIGNAL. ....	32
Abbildung 12: Dose Response Versuche. A) 200 ng NHE3-flag mit aufsteigenden Dosen MAGED2-WT-myc; unspezifische Bande zum Vergleich der Proteinmenge. B) 200 NHE3-flag mit aufsteigenden Dosen MAGED2-MT-myc; unspezifische Bande zum Vergleich der Proteinmenge. ....	33
Abbildung 13: Nachweis von endogenem MAGED2 in HEK293-Zellen, MAGED2 knock-down HEK293-Zellen zur Kontrolle. Die Banden unter 1 zeigen das endogene MAGED2 der HEK293-Zellen. In 2 wurde die Expression durch siRNA unterdrückt. ....	34
Abbildung 14: Cycloheximide Chase Ergebnisse. A): Anti-flag Immunoblot. B): Konzentration von NHE3 in Relation zur NHE3-Konzentration zum Ausgangszeitpunkt 0 Stunden .....	35
Abbildung 15: Ergebnisse der Cell Surface Biotinylation. Surface NHE3=Oberflächenfraktion von NHE3 mithilfe von Streptavidin extrahiert; Total NHE3=Gesamtes NHE3 in der Zelle. A) Blot im Vergleich. B) Quantifizierung von Oberflächen NHE3 zu Gesamt-NHE3. ....	36

Tabelle 1: Alle Störungen präsentieren Hypokaliämie und Alkalose. BS = Bartter-Syndrom; GS = Gitelman-Syndrom; BS IV = Bartter Syndrom mit sensorer Taubheit; BS V= transientes antenatales Bartter-Syndrom; TAL = dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife; DCT = distales Konvolut; NDI = nephrogener Diabetes insipidus; HAS = Hyperaldosteronismus; NK = Nephrokalzinose (modifiziert nach Seyberth et al. 2017) .....	14
Tabelle 2: Vergleich von Symptomen zwischen Formen des Bartter-Syndrom, n=Anzahl der Patienten (nach Brochard et al., 1999) .....	16
Tabelle 3: Chemikalie, Gesamtaufstellung .....	19
Tabelle 4: Reaktionskits .....	20
Tabelle 5: Antikörper .....	21
Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterial .....	23
Tabelle 7: Programme zur Datenverarbeitung .....	23
Tabelle 8: Zellkulturmaterialien .....	24
Tabelle 9: Zellaussaatprotokoll für Transfektion; Nach Versuchen aufgelistet, CC=Cycloheximid Chase, DR=Dose Response, CSB=Cell Surface Biotinylation, PLA=Proximity Ligation Assay. ....	25

## 1. Einleitung

Die Nieren spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase und Entwicklung vom Fetus bis zum Greis. Physiologisch sind die Nieren komplex und sollen hier, als Einstieg, vorgestellt werden.

### 1.3. Nierenphysiologische Grundlagen

In erster Linie dienen die Nieren der Homöostase des menschlichen Körpers. Hierbei spielen sie die entscheidenden Rollen in der Regulation der Elektrolyte, des Säure-Basen-Haushalts und des intravasalen Wasseranteils. Außerdem führen die Nieren harnpflichtige Substanzen über den Urin ab.

Die paarig angelegten Organe, retroperitoneal gelegen und durch je eine Arteria renalis versorgt, bestehen aus jeweils etwa 1,4 Millionen Nephronen, intrarenalen Gefäßen und dem autoregulatorischen juxtaglomerulären Apparat (Aumüller et al. 2017).

Die Glomeruli filtern täglich etwa 180 Liter Primärharn und klären so etwa 300-mal pro Tag das gesamte Blutvolumen eines erwachsenen Menschen (Pape et al. 2014). Die Konzentration des Primärharns erfolgt entlang des Nephrons und wird im Folgenden (Kapitel 1.1.2) näher beschrieben.

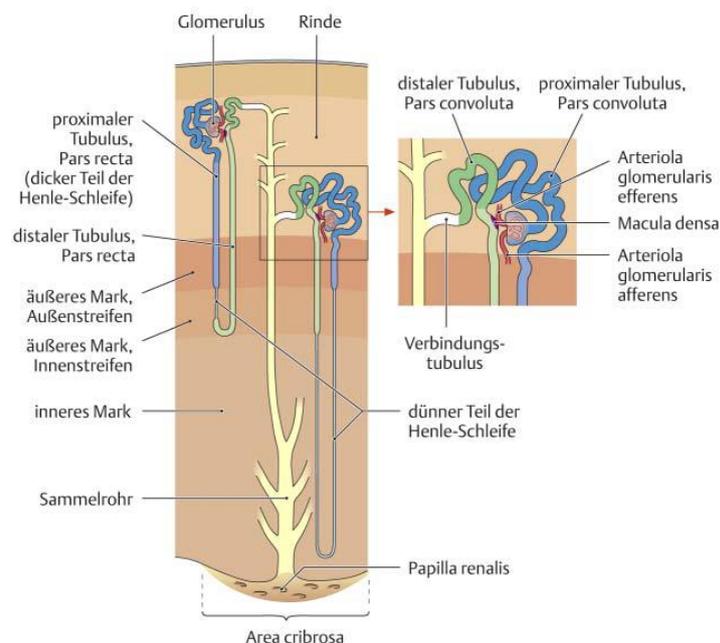


Abbildung 1: Aufbau der Nephronen und Glomeruli (aus Aumüller et al.)

Außerdem haben die Nieren endokrine Funktionen, welche der Blutdruckregulation und der Blutbildung, sowie der Regulation des Knochenstoffwechsels dienen. Das Hormon Renin wird von den Nieren gebildet und ist Ausgangspunkt im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Es wirkt über die Synthese von Angiotensin II und die Aldosteron-Freisetzung sowohl peripher an den

## Einleitung

---

Gefäßen, als auch an der Niere und der Nebenniere selbst. Weiterhin produziert die Niere Erythropoetin, welches ein hämatopoetisches Wachstumshormon ist und zur Bildung von Erythrozyten benötigt wird. Die Nieren sind durch die Synthese von Calcitriol, dem aktiven D-Hormon aus Clacidiol, auch ein wichtiger Teil des Knochenstoffwechsels (Pape et al. 2014).

### 1.3.1. Entwicklung der Niere

Schon vor der Geburt spielen die Nieren eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Kindes und sind zwischen der 16. und 18. Schwangerschaftswoche für die Produktion des Fruchtwassers mitverantwortlich. Ein Anhydramnion führt durch die mechanische Kompression zu Missbildungen und einer Lungenhypoplasie, wohingegen ein Polyhydramnion eine Frühgeburt zur Folge haben kann (Lentze 2001).

Bereits in der vierten Woche beginnt die Entwicklung der Niere aus der Urogenitalleiste. Diese vollzieht sich in drei Abschnitten. Beginnend mit der nichtfunktionalen Vorniere (Pronephros), folgend der Urniere (Mesonephros), welche bereits kurzzeitig Ausscheidungen produziert, sich dann jedoch zu Teilen des Genitalsystems umwandelt, bis zur Nachniere (Metanephros), die zusammen mit der Ureterknospe die eigentliche Niere bildet. Die harnleitenden Nierengänge, aus welchen die Ureterknospe entsteht, entwickeln sich bereits mit der Vorniere und bleiben von dort an bestehen. Erst mit der Einsprossung der Ureterknospe in das Mesenchym der Nachniere entwickelt sich das Tubulussystem. Daher besteht die fertige Niere embryologisch aus zwei Geweben: Zum einen aus dem des metanephrogenen Blastems, aus welchem sich die Tubuli und Glomeruli bilden und zum anderen aus dem der pronephrogenen Ureterknospe, aus welchem sich die Sammelrohre und die ableitenden Harnwege bilden.

Durch das Längenwachstum des Fötus ascendieren die Nieren. Während des Aszensus ändert sich auch die arterielle Versorgung, welche zuerst durch die Arteriae iliacae, dann durch die untere Aorta abdominalis und schließlich durch die Arteriae renalis erfolgt. Außerdem rotiert der Nierenhilus nach medial. Fehlerhafte Einsprossung der Ureterknospe führt hierbei zu Nierenagenesie; ein fehlerhafter Aszensus führt zu akzessorischen Nierengefäßen oder atypischen Lagen der Nieren (Moore et al. 2011).

Bereits zwischen der 11. und 13. Schwangerschaftswoche produzieren die Nieren Urin, abgeschlossen ist die Nierenentwicklung jedoch erst mit der 35. bis 36. Schwangerschaftswoche (Lentze 2001).

## Einleitung

### 1.3.2. Renale Konzentrationsmechanismen

Evolutionsbiologisch mussten Tiere, die sich aus dem wässrigen Milieu der Ozeane begaben, Strategien entwickeln, mit welchen sie ihren Wasser- und besonders ihren Salzhaushalt regulieren konnten. Hierbei spielen die Nieren die entscheidende Rolle.

Entlang der Nierentubuli werden über verschiedene Mechanismen Elektrolyte, Wasser, Proteine, Zucker, sowie Aminosäuren und diverse andere Stoffe aus dem ultrafiltrierten Primärharn rückresorbiert. Generell erfolgt die Konzentrierung des Harns in vier Schritten – zuerst wird das Plasma im Glomerulus filtriert, dem Primärharn werden dann Elektrolyte und Wasser (passiv) im proximalen Tubulus entzogen. Im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife werden nur Elektrolyte, jedoch kein Wasser mehr rückresorbiert; der damit erzeugte osmotische Gradient zwischen intertubulärem Harn und interstitiellen Nierenepithel dient dann im Sammelrohr der weiteren Wasser-Rückresorption (Silbernagl et al. 2007).

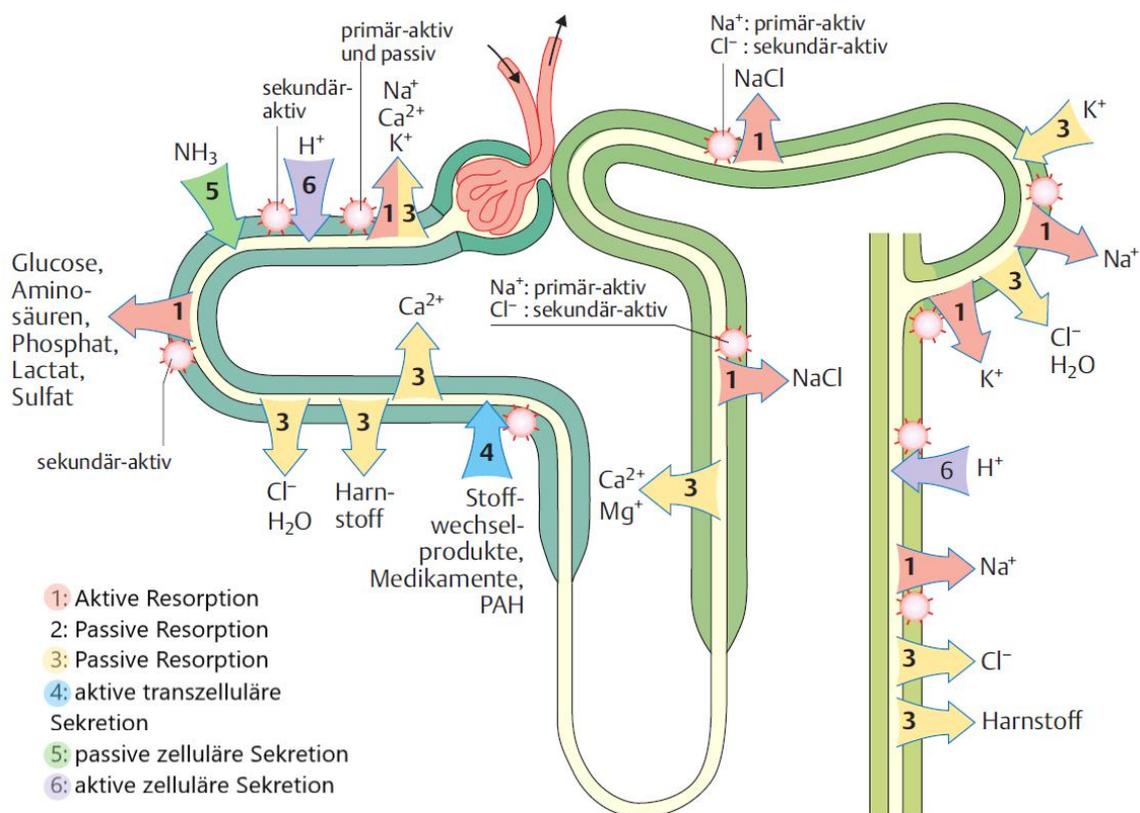


Abbildung 2: Übersicht wichtiger Transportprozesse entlang des Nephrons (modifiziert nach Silbernagl et al. 2007)

Entlang des Nephrons finden sich unterschiedliche Transportmechanismen, um die Massen an wertvollen Substanzen dem Körper wieder zuzuführen und so die Homöostase zu gewährleisten. Da der Primärharn eine Natriumkonzentration dem Plasma entsprechend (ca. 145mmol/l) aufweist, eignen sich die Natriumionen ( $\text{Na}^+$ ) besonders für die Rückresorption anderer Substanzen

## Einleitung

mittels Symport oder Antiport.  $\text{Na}^+$  wird durch den Antiporter NHE3 gegen Protonen ( $\text{H}^+$ ) ausgetauscht. Diese dienen intraluminal dann der Carboanhydrase-vermittelten Rückresorption von Bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ). Außerdem führt  $\text{Na}^+$  über eine Reihe von Symportern Aminosäuren, Glucose, Phosphat und andere Stoffe dem Körper wieder zu. Hierbei wird der hohe elektrochemische  $\text{Na}^+$ -Gradient genutzt. Basolateral wird  $\text{Na}^+$  über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wieder dem Blutstrom zugeführt, sodass der Gradient entlang der luminalen Membran aufrechterhalten wird. Sekundär folgt Wasser dem osmotischen Gradienten folgend para- und transzellulär.

Stoff	Konzentration im Plasmawasser (P) [mmol/l]	fraktionelle Resorption (FR) [%]			fraktionelle Ausscheidung (FE) [% der filtrierten Menge]
		% im proximalen Tubulus (TF/P-Wert)	% in der Henle-Schleife (TF/P-Wert)	% total	
$\text{H}_2\text{O}$	---	65%	10%	93%–99,5%	0,5%–7%
$\text{Na}^+$	153	65% (1,0)	25% (0,4)	95%–99,5%	0,5%–5%
$\text{K}^+$	4,6	65% (1,0)	10%–20%	u.U. Sekretion	2%–150%
$\text{Ca}^{2+}$	frei: 1,6	60% (1,1)	30%	95%–99%	1%–5%
$\text{Mg}^{2+}$	frei: 0,6	15% (2,5)	ca. 70%	80%–95%	5%–20%
$\text{Cl}^-$	112	55% (1,3)	ca. 20%	95%–99,5%	0,5%–5%
$\text{HCO}_3^-$	24	93% (0,2)		98%–99%	1%–2%
Phosphat	2,2	65% (1,0)	15%	80%–97%	3%–20%
Glucose	5	96% (0,1)	4%	=100%	=0%
Harnstoff	5	50% (1,4)	Sekretion	ca. 60%	ca. 40%
Kreatinin	0,1	0% (2,9)	0%	0%	100%

Abbildung 3: Resorption und fraktionelle Ausscheidung (modifiziert nach Silbernagl et al. 2007)

Durch die zunehmende Osmolarität des Primärharns reicht die Konzentrationsdifferenz von  $\text{Cl}^-$  nun aus, sodass diese para- und transzellulär passiv resorbiert werden können. Durch den Verlust der negativen Ladungen wird das Membranpotenzial nun positiv und  $\text{Na}^+$  und andere Kationen können ebenfalls passiv resorbiert werden. Am Ende des proximalen Tubulus sind so etwa 65%

## Einleitung

---

des ultrafiltrierten Wassers,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , etwa 55% des  $\text{Cl}^-$  und ganze 93% des filtrierten  $\text{HCO}_3^-$  rückresorbiert (siehe Abb. 3).

In der nun folgenden Henle-Schleife werden noch einmal 25% des ultrafiltrierten  $\text{Na}^+$  und ähnliche Anteile der anderen Kationen rückresorbiert. Durch die annähernde Undurchlässigkeit für Wasser wird der Harn somit sekundär verdünnt, sodass am Ende ein hypotoner Harn in das distale Konvolut abgegeben wird. Auch hier wird der  $\text{Na}^+$ -Gradient durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase generiert und  $\text{Na}^+$  dient wieder als treibende Kraft für die Resorption, welche durch den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Carrier (NKCC2) vermittelt wird (Pape et al. 2014). Obwohl intraluminal  $\text{K}^+$  in deutlich geringerer Konzentration vorliegt, ist dies nicht der limitierende Faktor, da  $\text{K}^+$  nach der Resorption durch den „Renal Outer Medullary Potassium Channel“ (ROMK) wieder nach intraluminal strömt und somit schlussendlich nicht resorbiert wird. Im Überleitungs- und Sammelrohr findet weiterhin  $\text{Na}^+$ -Resorption mittels dem epithelialen  $\text{Na}^+$ -Kanals (ENaC) statt.  $\text{Na}^+$  wird hierbei wiederum durch  $\text{K}^+$ , welches auch hier durch ROMK nach intraluminal strömt, ersetzt, um eine Potenzialverschiebung auszugleichen (Behrends (c) 2017).

### 1.3.3. Human embryonic kidney cells (HEK293)

In den 1970er Jahren gelang es Graham et al. mittels der von ihm und van der Eb 1973 entwickelten „calcium technique“, DNA von Adenovirus Typ 5 in die DNA von embryonalen Nierenzellen zu integrieren. Die hieraus entstandene immortale Zelllinie wurde von Graham HEK293 benannt (Graham et al. 1977). Anfänglich wurde die Zellreihe noch nicht auf ihre proteinphysiologischen und Kanalfunktionen hin untersucht, erfreute sich aber immer größerer Beliebtheit, da sie leicht zu kultivieren ist, hohe Transfektionseffizienzen aufweist und stabil die transfizierten Proteine produziert. Mittlerweile sind auch andere stabil transfizierte Zellreihen aus den HEK293-Zellen entstanden (Thomas und Smart 2005). HEK293 Zellen eignen sich also mit ihrer Stammzellenkonfiguration besonders dazu, eine Vielzahl gewebespezifischer Proteine herzustellen. Die Herkunft aus menschlichen embryonalen Nierenzellen bietet vor allem den Vorteil der Spezieszugehörigkeit. HEK293-Zellen scheinen zwar auch neuronalspezifische Eigenschaften aufzuweisen (Shaw et al. 2002), exprimieren aber auch Proteine, die besonders im proximalen Tubulus zu finden sind. Auch die beiden hier untersuchten Proteine (NHE3 und MAGED2) werden endogen in der Zelle produziert, weshalb davon auszugehen ist, dass auch transfiziertes humanes NHE3 (Watanabe et al. 2017) und MAGED2 (Pirlot et al. 2016) korrekt translatiert und modifiziert werden.



## Einleitung

al. 1992). Zur *Nhe*-Genfamilie zählen inzwischen *Nhe1* bis *Nhe9* (Nakamura et al. 2005). Die Nummerierung folgte chronologisch nach der Entdeckung der Isoformen. Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass die *Nhe*-Genfamilie in vielen Spezies und Zellarten von einfachsten Prokaryoten wie *Escherichia coli* bis hin zu komplexen mehrzelligen Organismen ähnliche Strukturen aufweist (Abb. 4) (Bobulescu und Moe 2006).

### 1.4.2. Aufbau, Funktion und Regulationsmechanismen

NHE3 wird vom *SLC9A3*-Gen codiert, welches auf dem p-Arm von Chromosom 5 an Position 15,33 lokalisiert ist (Brant et al. 1993). Das Protein besteht aus 839 Aminosäuren und hat eine Größe von etwa 93kDa.

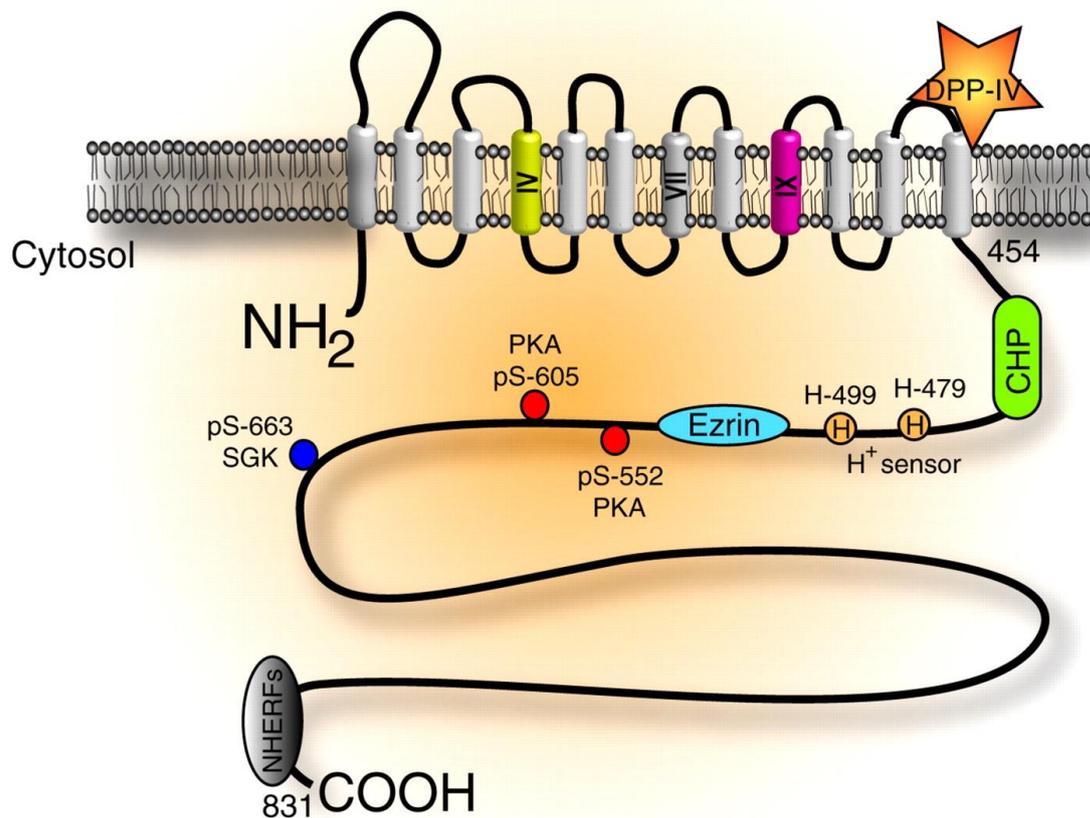


Abbildung 5: Struktur von NHE3 (nach Alexander und Grinstein 2009)

NHE3 weist N-terminal 12 Transmembrandomänen auf (Abb. 5). Die Domäne IV ist hierbei in den Ionenaustausch involviert, wohingegen Domäne IX für die Bindung von Amilorid verantwortlich ist. Der C-terminale Teil des Proteins reguliert die Aktivität und ist Bindungsstelle für das Cytoskelett und weitere regulatorische Mediatoren. Es finden sich intrazellulär Bindungsstellen für ein Calcineurin homologes Protein (CHP), Ezrin, als Verbindung zum Cytoskelett, und

## Einleitung

---

extrazellulär für die Dipeptidylpeptidase IV. In der Abbildung erkennt man weiter die „proton modifier sites“ ( $H^+$  Sensoren), sowie die Bindungsstellen von Proteinkinase A (PKA) und Phosphorylierungsstelle der Serum-Glukokortikoid-regulierten Kinase (SGK). Am Ende des C-Terminus findet sich schlussendlich die Bindungsstelle für den „sodium-hydrogen exchanger regulatory factor“ (NHERF), welcher zusammen mit Ezrin die cAMP-bedingte Inhibition von NHE3 vermittelt. Eine zweite Isoform des NHERF (E3KARP/NHERF-2) legt nahe, dass es an der  $Ca^{2+}$ -vermittelten Inhibition von NHE3 beteiligt ist (Alexander und Grinstein 2009). NHERF-Mutationen kommen auch beim Menschen vor und verursachen renalen Phosphatverlust (Karim et al. 2008).

Der Antiporter ist hochspezifisch in der apikalen Membran von proximalen Tubuluszellen (Bobulescu et al. 2005), im aufsteigenden dicken Teil der Henle-Schleife sowie im Intestinaltrakt zu finden. Geringe Mengen wurden jedoch auch in Thymus, Hoden, Ovarien und Prostata gefunden (Brant et al. 1995). Humanes NHE3 wird posttranslational nicht glykosyliert, im Gegensatz zu Hasen-NHE3, weshalb es eventuell einen anderen Mechanismus für den Transport zur Zelloberfläche gibt (Orlowski und Grinstein 2004). Wie bereits beschrieben, wird die NHE3-Aktivität durch cAMP inhibiert. Doch auch das Cytoskelett hat einen Einfluss auf die Mobilität von NHE3 in der Zellmembran und auf die Aktivität. (Alexander und Grinstein 2009).

### 1.5. Melanoma-associated antigen D2

#### 1.5.1. Geschichte und Entdeckung

Das Melanoma-associated antigen D2 (MAGED2) gehört zur Gruppe der melanoma antigen-Proteinfamilie mit über 50 Mitgliedern (Trussart et al. 2018). Im Unterschied zur Gruppe 1 („type I MAGE“), welche nur embryonal und in Krebszellen exprimiert werden, werden „type II MAGE“, wie beispielsweise MAGED2 konstitutiv und in vielen Geweben exprimiert. MAGED2 wird als Urform der „type II MAGE“-Proteine diskutiert (Lee und Potts 2017; Donato et al. 2017). Aufgrund der spezifischen Tumorexpression der zuerst entdeckten *Mage*-Gene wurden Versuche unternommen, diese als therapeutisches Target bei Tumorerkrankungen zu nutzen. Die Entdeckung der *Mage-d*-Familie führte jedoch dazu, dass diese Theorie überdacht wurde (Lucas et al. 1999). Nach der Erstbeschreibung durch Lucas et al. konnten durch Datenbankanalysen *Mage-d1* bis – *d4* identifiziert werden (Chomez et al. 2001). Die Funktion war bis hierhin noch unbekannt. Chomez et al. gingen jedoch schon davon aus, dass die *Mage-d*-Familie eine alte Gengruppe sein muss, da sie in vielen Spezies eine hohe Homologie aufweist (Donato et al. 2017).

Im weiteren Verlauf wurde eine Rolle von MAGED2 in der „X-linked mental retardation“ diskutiert, da MAGED2 auf Xp11,2, einem Hotspot für diese Erkrankung, im *Mage-d*-Gencluster kodiert wird (Langnaese et al. 2001).

## Einleitung

MAGED2 wird auch in der Niere im distalen Tubulus exprimiert, die Funktion ist jedoch unbekannt. Im proximalen Tubulus wird MAGED2 nur in der Embryonalperiode exprimiert (Lee et al. 2015). Aufgrund einer whole exome-Sequenzierung gelang Laghmani et al. 2016 die Identifizierung der MAGED2-Mutationen als Ursache des transienten antenatalen Bartter-Syndroms. Im gleichen Zuge konnte eine funktionelle Interaktion von MAGED2 mit NKCC2 und NCC nachgewiesen werden. Weitere Proteine, namentlich Hsp40 und Gs- $\alpha$ , interagieren direkt mit MAGED2 und könnten so über eine Aktivitätsänderung den Metabolismus der Zelle beeinflussen (Laghmani et al. 2016).

### 1.5.2. Aufbau, Funktion und Regulationsmechanismen

Wie bereits erwähnt, wird MAGED2 auf dem *Maged2*-Gen auf dem p-Arm des X-Chromosoms an Position 11,2 kodiert und ist mit 606 Aminosäuren und etwa 65kDa etwas kleiner als NHE3. Es kommt in fast allen Geweben vor, jedoch besonders in Hirn, Skelettmuskel, Herz, Plazenta, Pankreas, Niere und Lunge (Langnaese et al. 2001), sowie unterschiedlichen Tumorentitäten (Trussart et al. 2018). Es ist ubiquitär in der Zelle, vor allem jedoch im Cytosol, Nucleus und Nucleolus zu finden (Pirlot et al. 2016).

MAGED2 ist ein regulatorisches Protein, welches mit vielen Proteinen eine Bindung eingehen kann. Bekannt sind bis jetzt vor allem Funktionen in der Zellzyklusregulation, besonders bei zellulärem Stress (Trussart et al. 2018; Valiño-Rivas et al. 2018), sowie die Interaktion mit Gs- $\alpha$

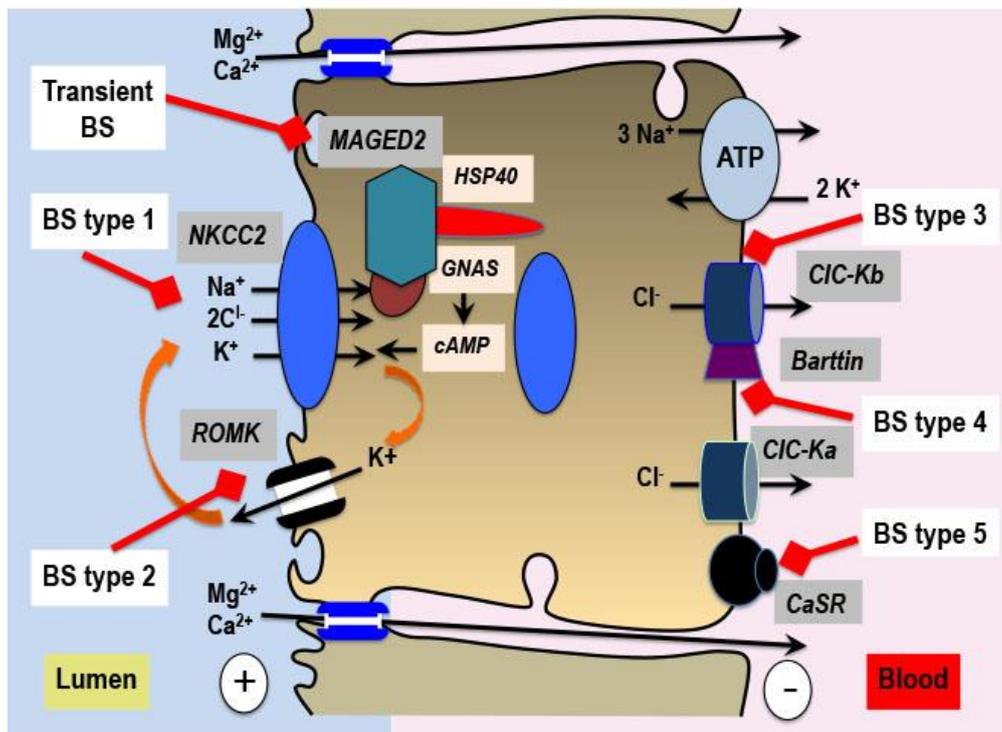


Abbildung 6: MAGED2 mit seinen möglichen Interaktionspartnern (modifiziert nach Kömhoff und Laghmani, 2018)

## **Einleitung**

---

und Chaperonen (Hsp40). Valiño-Rivas et al. konnten zeigen, dass MAGED2 in Tubuluszellen durch den Entzug von Wachstumsfaktoren und den Zusatz von TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) hochreguliert wird. Dies spricht für eine wichtige Rolle des MAGED2 während Stress in Tubuluszellen (Valiño-Rivas et al. 2018). Zudem interagiert MAGED2 funktionell mit dem Transporter NKCC2 und NCC und fördert deren Biosynthese. So hat die Mutation von MAGED2 einen Einfluss auf die Expression, Stabilität und Aktivität von diesen beiden Transportern (Kömhoff und Laghmani 2017). Andere MAGE-Proteine modulieren die Aktivität von Ubiquitin E3 Ligasen (Espantman und O'Shea 2010). Es ist nicht bekannt, ob auch MAGED2 mit ihnen interagiert.

Das *Maged2*-Gen beinhaltet, wie alle Familienmitglieder, eine „MAGE homology domain“ (MHD), die etwa 170 Aminosäuren lang ist und für die Bindung der Ubiquitin E3 Ligasen verantwortlich ist (Lee und Potts 2017).

### 1.6. Bartter-Syndrom

#### 1.6.1. Definition und Einteilung

Das Bartter-Syndrom ist eine seltene genetische Erkrankung, die sich klinisch mit Polyurie, Salzverlust-Syndrom, Hypokaliämie mit Alkalose und sekundärem Hyperaldosteronismus präsentiert. Der Beginn der Symptome kann dabei bereits antenatal liegen, oder im Extremfall erst im Erwachsenenalter manifestieren (Cunha und Heilberg 2018).

Die hypokaliämischen Salzverlust-Tubulopathien können in Abhängigkeit der betroffenen Nephronsegmente und damit nach dem Wirkort der Diuretika, in drei Untergruppen eingeteilt werden. Entweder besteht die Pathologie im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (Furosemid-Typ) oder im distalen Konvolut (Thiazid-Typ). Die dritte Gruppe besteht aus Störungen, die sowohl die Henle-Schleife, als auch das distale Konvolut betreffen (Furosemid- und Thiazid-Typ). Quantitativ hat sich aber die genetische Nomenklatur Bartter I-V durchgesetzt. (Seyberth et al. 2017).

#### 1.6.2. Pathophysiologie, Ätiologie und Symptomatik

Ätiologisch können viele Mechanismen zu einer Mutation der betreffenden Gene führen. Insgesamt sind aktuell fünf Gene bekannt, die bei einer Mutation zu einem Bartter-Syndrom führen können. Die meisten dieser Mutationen kommen in Ionenkanälen oder Transportern des Tubulus vor und lassen sich so pharmako-phänomenologisch einordnen. Je nachdem, wie die diuretischen Effekte einer Mutation mit der jeweiligen Wirkung eines Medikamentes übereinstimmen, werden die Gendefekte unterschiedlichen Gruppen zugeteilt. Hierbei wird in die Furosemid-sensitive

## Einleitung

Gruppe (NKCC2 und ROMK), die Thiazid-sensitive Gruppe (NCC, CIC-Kb, Kir 4.1 und CaSR) und die gemischte Gruppe (CIC-Ka+b, Barttin und MAGED2) eingeteilt (siehe Tabelle 1). ROMK zählt hierbei zur Furosemid-Gruppe, obwohl es nicht direkt mit Furosemid interagiert. Durch die Hemmung von NKCC2 bewirkt Furosemid jedoch eine Verringerung der intrazellulären Kaliumkonzentration. Hierdurch wird ROMK sekundär gehemmt. Die Nebenwirkungen von Furosemid ähneln Bartter-Syndrom Typ I und Typ II, weshalb eine Einteilung in diese Kategorie sinnvoll ist.

Typ	Name	Pharmakologischer Typ	Segmenteinteilung	Sekundäre Symptome	Plasmaelektrolyte		
Mut. Protein					Cl <sup>-</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Schleifen-Typ		Furosemid	TAL	NDI, HAS, NK			
NKCC2	BS I				-	-	(↑)
ROMK	BS II		(+Sammelrohr)	(trans. postnat. K <sup>+</sup> ↑)	-	-	(↑)
Konvolut-Typ		Thiazid	DCT	HAS			
NCC	GS				-	↓	-
CIC-Kb	BS III	(+Furosemid)	(+TAL)	(NK)	↓	(↓)	-
Kombinierter-Typ		Furosemid+	TAL+DCT	NDI, HAS			
		Thiazid					
CIC-Ka+b	BS IV				↓	(↓)	-
Barttin	BS IV				↓	(↓)	-
MAGED2	BS V			NK	(↓)	↓	-

Tabelle 1: Alle Störungen präsentieren Hypokaliämie und Alkalose. BS = Bartter-Syndrom; GS = Gitelman-Syndrom; BS IV = Bartter Syndrom mit sensorer Taubheit; BS V = transientes antenatales Bartter-Syndrom; TAL = dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife; DCT = distales Konvolut; NDI = nephrogener Diabetes insipidus; HAS = Hyperaldosteronismus; NK = Nephrokalzinose (modifiziert nach Seyberth et al. 2017)

Pathophysiologisch ist die Klinik meist durch den direkten oder indirekten Einfluss der Mutation auf die Na<sup>+</sup>-Rückresorption zurückzuführen. Bei den Na<sup>+</sup>-Transportern wie NKCC2 und NCC sind diese Effekte noch leicht nachzuvollziehen. Schwieriger wird es bei den indirekten Einflüssen, wie durch die Cl<sup>2-</sup>- oder K<sup>+</sup>-Kanäle CIC-K und ROMK oder Kir 4.1 (siehe Abb. 7). Sie hemmen durch ihre Dysfunktion die Funktion der Na<sup>+</sup>-Kanäle, weil diese meist den Konzentrationsgradienten anderer Ionen nutzen, um Na<sup>+</sup> in die Zelle zu transportieren. So leitet ROMK K<sup>+</sup>-Ionen in das tubuläre Lumen, sodass sie zusammen mit Na<sup>+</sup> durch NKCC2 wiederaufgenommen werden können. Barttin, CIC-Ka und CIC-Kb leiten zusammen die Cl<sup>-</sup>-Ionen basolateral aus der Zelle. Ohne diese Funktion steigt die Cl<sup>-</sup>-Konzentration und die Funktion von NCC und NKCC2 wird, je nach Lokalisation, wiederum eingeschränkt. Im distalen Konvolut spielt Kir4.1 eine entscheidende Rolle in der basolateralen K<sup>+</sup>-Exkretion. Bislang unklar ist weiterhin der Mechanismus, wie Mutationen von MAGED2 den Salztransport beeinflussen.

Klinisch sind besonders Schleifen- und Konvolut-Typen durch den Beginn der Symptomatik zu unterscheiden. Während Erkrankungen des Konvoluts erst in der Säuglingsperiode oder frühen Kindheit auffallen, sind Erkrankungen des Schleifen-Typs bereits perinatal symptomatisch und führen zu Schwangerschaftskomplikationen wie fetaler Polyurie, Polyhydramnion und damit verbundener Frühgeburtlichkeit. Patienten mit einer Erkrankung des Konvolut-Typs präsentieren

## Einleitung

sich charakteristisch mit Hypokalziurie. Die schwerste klinische Symptomatik weisen jedoch Erkrankungen vom kombinierten Typ auf. Sie treten meist vorgeburtlich mit schwerem Polyhydrion auf und haben postnatal einen stärkeren Salzverlust mit drastischen Elektrolytverschiebungen, während die Urinosmolalität unbeeinflusst bleibt (Seyberth et al. 2017).

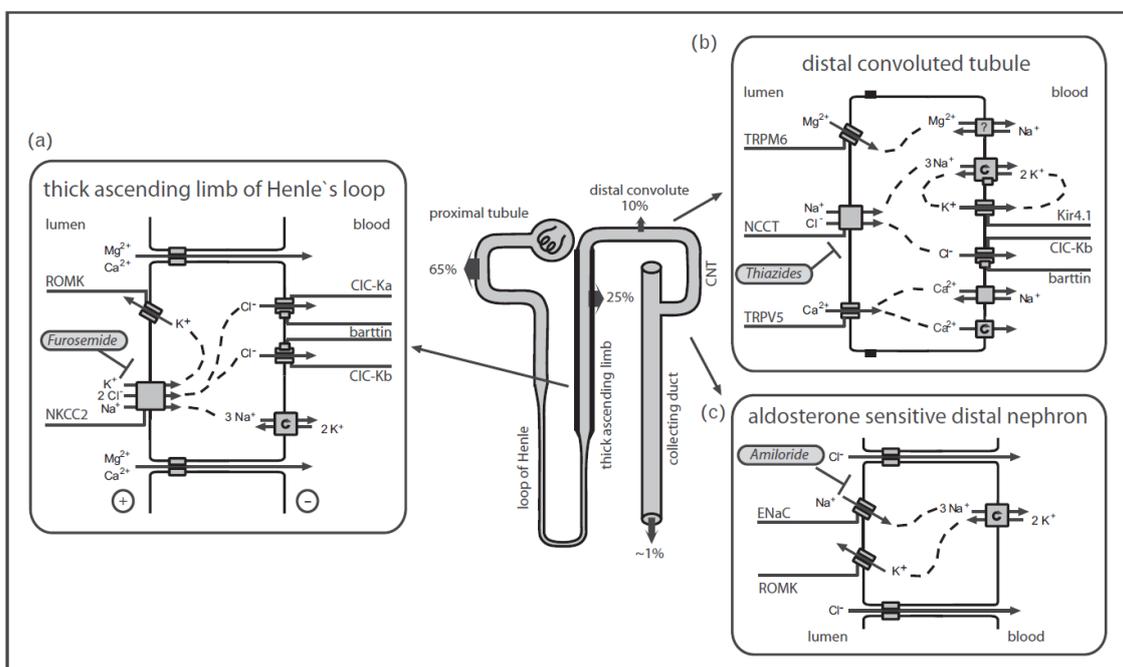


Abbildung 7: Darstellung der an Formen des Bartter-Syndroms beteiligten Kanäle (nach Seyberth et al., 2017)

### 1.6.3. Therapie

Bis zur Entwicklung von Gentherapien wird sich die Therapie des Bartter-Syndroms auf die Symptomkontrolle begrenzen. Deshalb sollte das oberste therapeutische Gebot die Homöostase, welche durch Gabe von Flüssigkeit und Elektrolyten erreicht werden kann, sein. So wie sich der Zeitpunkt und die Schwere der Symptomatik unterscheidet, sind auch Unterscheidungen bei der weiteren Therapie vorzunehmen. Da Patienten mit Erkrankungen vom Konvolut-Typ erst später und manchmal zufällig entdeckt werden, reicht häufig schon eine Umstellung auf eine Kalium- und Salz-reiche Ernährung. Ein Mangel an Magnesium führt über eine geänderte Aktivität der  $Na^+/K^+$ -ATPase zu einer Verschiebung von Kalium in Muskelzellen (Schrier 2017). Deshalb sollte Magnesium in ausreichender Menge zugeführt werden um Hypokaliämien zu vermeiden. Dies gilt besonders für schwangere Patientinnen mit Bartter-Syndrom vom Konvolut-Typ. Patienten mit einem Bartter-Syndrom vom kombinierten- oder Schleifen-Typ weisen hingegen eine deutlich frühere und schwerere Symptomatik auf und müssen dementsprechend intensiver therapiert werden. Hierbei wird jedoch nicht die Polyurie therapiert, welche durch die zusätzliche Volumengabe noch verstärkt wird (Seyberth et al. 2017). Ein vermehrtes intravasales Volumen bedingt durch das Tubuloglomeruläre Feedback eine gesteigerte Synthese von  $PGE_2$ , welches

## Einleitung

durch die Aktivierung des RAAS eine Steigerung der GFR zur Folge hat (Kömhoff und Laghmani 2017). Eine Hemmung der PGE<sub>2</sub>-Synthese mittels COX-Inhibitoren, wie Indomethacin, sollte deshalb angestrebt werden. Paradoxe Weise schienen auch gewisse Diuretika einen positiven Effekt zu haben. In der klinischen Anwendung stehen besonders Aldosteronrezeptor-Antagonisten im Vordergrund, mit deren Hilfe die Kaliumausscheidung vermindert wird. Bei der Wahl des Diuretikums stehen Effekt und Nebenwirkung der einzelnen Diuretika im Vordergrund. Experimentell werden ACE-Hemmer angewandt, um die Hypokaliämie verbessern (Cunha und Heilberg 2018).

### 1.6.4. Das transiente antenatale Bartter-Syndrom und MAGED2

Das transiente antenatale Bartter-Syndrom präsentiert sich pränatal durch fetale Polyurie mit massivem Polyhydramnion, welches sich zwischen der 19. und 20. Gestationswoche manifestiert. Das Polyhydramnion bildet sich also früher als bei anderen Formen des antenatalen Bartter-Syndroms (siehe Tabelle 2). Ferner ist das Polyhydramnion beim transienten antenatalen Bartter-Syndrom auch stärker ausgeprägt als bei anderen Formen des Bartter-Syndroms und des idiopathischen Polyhydramnions. Es kann bereits im 2. Trimenon der Schwangerschaft so stark ausgeprägt sein, dass die betroffenen Kinder frühgeburtlich sind und zum Teil vor der 22. SSW geboren werden (Laghmani et al. 2016).

disease	transient Bartter (n=15)	Bartter I * (n=13)	Bartter II * (n=19)	Bartter III * (n=6)	Bartter IV * (n=4)
gestational age at onset of polyhydramnios	19 (19-20)	27 (23-30)	25 (23-26)	25 (23-26)	25 (23-26)
gestational age at birth	29 (21-37)	33 (32-34)	33 (31-35)	37 (34-38)	32 (30-35)
duration polyuria/salt-wasting (weeks)	4,5 (0-10)	∞	∞	∞	∞
survival	11 / 15	all	all	all	all
hypercalciuria	17 (8.5-40)	6.30 (3-8)	2.8 (2.4-5.5)	1.6 (0.3-2.5)	1.2(0.2-2.2)

Tabelle 2: Vergleich von Symptomen zwischen Formen des Bartter-Syndrom, n=Anzahl der Patienten (nach Brochard et al., 1999)

Bereits in den 1990-er Jahren fielen der Arbeitsgruppe um Professor Hannsjörg Seyberth in Marburg Patienten auf, die ein passageres Salzverlust-Syndrom nach vorangegangenem Polyhydramnion aufwiesen. Diese Kombination wurde damals nur bei männlichen Neugeborenen beschrieben (Engels et al. 1991). Der Verdacht, dass es sich um eine X-chromosomale Erkrankung handeln könnte, wurde durch die whole-exome Sequenzierung, wie oben beschrieben, bestätigt. Das *Maged2*-Gen konnte als ursächliche Mutation in sieben Familien mit transientem antenatalen Bartter-Syndrom identifiziert werden. Diese Entdeckung lässt es nun zu, Familien mit rezidivierendem Polyhydramnion gezielt auf diese Erkrankung zu untersuchen. Hinzu kommt, dass bei den erkrankten Kindern zwischen der 30. und 33. Gestationswoche die Polyurie sistierte, sodass

## Einleitung

---

eine weitere Therapie, etwa mit Indomethacin, nicht mehr indiziert war (Laghmani et al. 2016). Welche Rolle MAGED2 in den Tubuluszellen spielt ist unklar. Die Einflüsse auf NKCC2 und NCC sind weiter oben beschrieben. Auch die Interaktionen mit Hsp40 und Gs- $\alpha$  geben Hinweise auf einen Einfluss auf die Proteinreifung und cAMP-Konzentration in der Zelle (Kömhoff und Laghmani 2017).

Ebenfalls weiterhin unklar ist die transiente Natur dieser Erkrankung. Kömhoff und Laghmani vermuten, dass die Proteinexpression auch vom Stress abhängt und so die geringen Sauerstoffkonzentrationen intrauterin zu einer vermehrten MAGED2 Expression führen. Postnatal sinkt der Stress und durch die weitere Reifung der Nieren sistiert die Polyurie (Kömhoff und Laghmani 2018).

Für diese Theorie spricht auch, dass MAGED2 bei zellulärem Stress verstärkt exprimiert wird (Trussart et al. 2018; Valiño-Rivas et al. 2018).

### 1.7. Wissenschaftliche Einordnung und Fragestellung

Der extreme Phänotyp des transienten antenatalen Bartter-Syndroms und der extrem frühe Beginn des Polyhydramnions lassen vermuten, dass nicht nur NKCC2 und NCC, sondern auch andere Kanalproteine, die in die Na<sup>+</sup>-Rückresorption involviert sind, beeinflusst werden. Wie beschrieben, ist das Bartter-Syndrom eigentlich eine Erkrankung des distalen Tubulus, was selbstverständlich nicht bedeutet, dass dies auch beim transienten antenatalen Bartter-Syndroms zutreffen muss. Wie bereits beschrieben, wird MAGED2 in vielen Geweben exprimiert. Während der Embryogenese wird MAGED2 auch im proximalen Tubulus exprimiert (Laghmani et al. 2016).

Wie oben dargelegt ist NHE3 für die Rückresorption von erheblichen Mengen von Na<sup>+</sup> verantwortlich. Auch ist bekannt, dass NHE3-knock-out Mäuse unter nur milden Symptomen von Salzverlust und Hypotonie, sowie Diarrhoe leiden und eine kürzere Lebensdauer bei Na<sup>+</sup>-armer Diät haben (Donowitz et al. 2009). Die nur milde Nierensymptomatik lässt sich durch das, im Unterschied zu Bartter Typ I und II, intakte tubuloglomeruläre Feedback erklären. Beim Ausfall von NHE3 wird reflektorisch durch eine höhere Salzkonzentration an der Macula densa die glomeruläre Durchblutung mittels TGF gedrosselt und NKCC2 und NCC im distalen Tubulus hochreguliert und so ein Teil des Salzverlustes ausgeglichen. Beim transienten antenatalen Bartter-Syndrom wissen wir jedoch, dass sowohl NKCC2 als auch NCC in ihrer Expression und Aktivität vermindert sind. Dazu kommt, dass NKCC2 in der Macula densa für den Na<sup>+</sup>-Einstrom verantwortlich ist, das tubuloglomeruläre Feedback beim transienten antenatalen Bartter-Syndrom also nur eingeschränkt funktionieren sollte.

Eine Einschränkung der NHE3-Funktion oder Expression, so wie es bei NKCC2 und NCC durch mutiertes MAGED2 bedingt wird, würde zur Erklärung des Phänotyps beitragen.

**Einleitung**

---

Die hieraus entwickelte These lautet deshalb, dass auch NHE3 durch MAGED2 beeinflusst und die Funktion so eingeschränkt wird.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Reaktionskits

Chemikalien	Firma
APS 10%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Biotin	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Clarity™ Max	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA
Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA Purified 100x 10mg/ml	New England BioLabs Inc., Frankfurt a.M.
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	Capricorn Ltd, Fordingbidge, UK
DMSO 100%	New England BioLabs Inc., Frankfurt a.M.
Dulbeccos PBS, w/o Ca & Mg, w/o Phenol Red	Capricorn Ltd, Fordingbidge, UK
EDTA	Serva, Heidelberg
EmbryoMax® 0,25% TRYPsin	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	BioChrom GmbH, Berlin
Full Range Rainbow, Recombinant Protein Molekular Weight Marker	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lipofectamin™ 3000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Methanol	Honeywell, New Jersey, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Opti-MEM®	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
P 3000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PBS	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin (1000 U/ml) / Streptomycin (10mg/ml)	Capricorn Ltd, Fordingbidge, UK
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protease Inhibitor	Sigma-Aldrich, Steinheim
Roti®-Load 1	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
SDS	AppliChem, Darmstadt
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
TEMED	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan +99%	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween ® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Water Mol Bio grade DNase-, RNase- und Protease frei	5 PRIME GmbH, Hamburg

Tabelle 3: Chemikalie, Gesamtaufstellung

## Material und Methoden

Reaktionskit	Firma
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Tabelle 4: Reaktionskits

### 2.2. Lösungen und Antikörper

10% APS:	- 1 g Ammoniumpersulfat auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
4% Blocklösung:	- 4 g Magermilchpulver auf 100 ml mit TTBS auffüllen bei 4°C lagern
10x Laufpuffer:	- 60 g TRIS Base (pH 8,3) - 100 g Glycin - 10 g SDS auf 1 L mit destilliertem Wasser auffüllen
10x TBS:	- 60,56 g TRIS - 174 g NaCl erst pH 7,5 mit 25%iger Salzsäure einstellen auf 1 L mit destilliertem Wasser auffüllen
Tris-SDS pH 6,8:	- 3,94 g TRIS Base - 0,2 g SDS pH 6,8 mit 25%iger Salzsäure einstellen auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
Tris-SDS pH 8,8:	- 11,82 g TRIS HCl - 0,2 g SDS pH 8,8 mit 25%iger Salzsäure einstellen auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen

## Material und Methoden

---

Triton X-100-Lysepuffer	- 0,88 g NaCl - 100 µl Triton X-100 - 0,6 g TRIS HCl auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
1x TTBS:	- 250 µl Tween - 50 ml 10x TBS auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
Harsh-stripping Puffer:	- 20 ml SDS 10% - 12,5 ml Tris HCl, pH 6,8; 0,5 M - 67,5 ml destilliertes Wasser - 800 µl β-Mercaptoethanol

Name	Host	Firma	Bestellnummer
<b>Anti-flag</b>	Mouse	Sigma-Aldrich, Steinheim	F3165
<b>Anti-flag</b>	Rabbit	Eurogentec, Lüttich, Belgien	custom
<b>Anti-MAGED2</b>	Rabbit	Eurogentec, Lüttich, Belgien	1145
<b>Anti-mouse IgG HRP</b>	Goat	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, USA	A4416
<b>Anti-rabbit IgG HRP</b>	Goat	Santa Cruz, Biotechnology, Dallas, USA	Sc-2004
<b>c-myc monoclonal AB</b>	Mouse	Clontech-Takara, Mountain View, USA	631206

Tabelle 5: Antikörper

### 2.3. Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden von Frau Dr. Aparna Renigunta zur Verfügung gestellt. Die *Maged2*-Gene wurden mit *myc* getaggt und in pcDNA3.1-Vektoren eingefügt. Das *Nhe3* hingegen wurde mit *flag* getaggt und in PIRE5-Vektor eingefügt. Dieser Vektor verfügt über einen Abschnitt, der für GFP, ein fluoreszierendes Protein, codiert. Hierdurch war es möglich die Transfektionseffizienz abzuschätzen. Über die angefügten Tags sind die Proteine sowohl immunzytochemisch wie auch auf den angefertigten Blots zu identifizieren.

## Material und Methoden

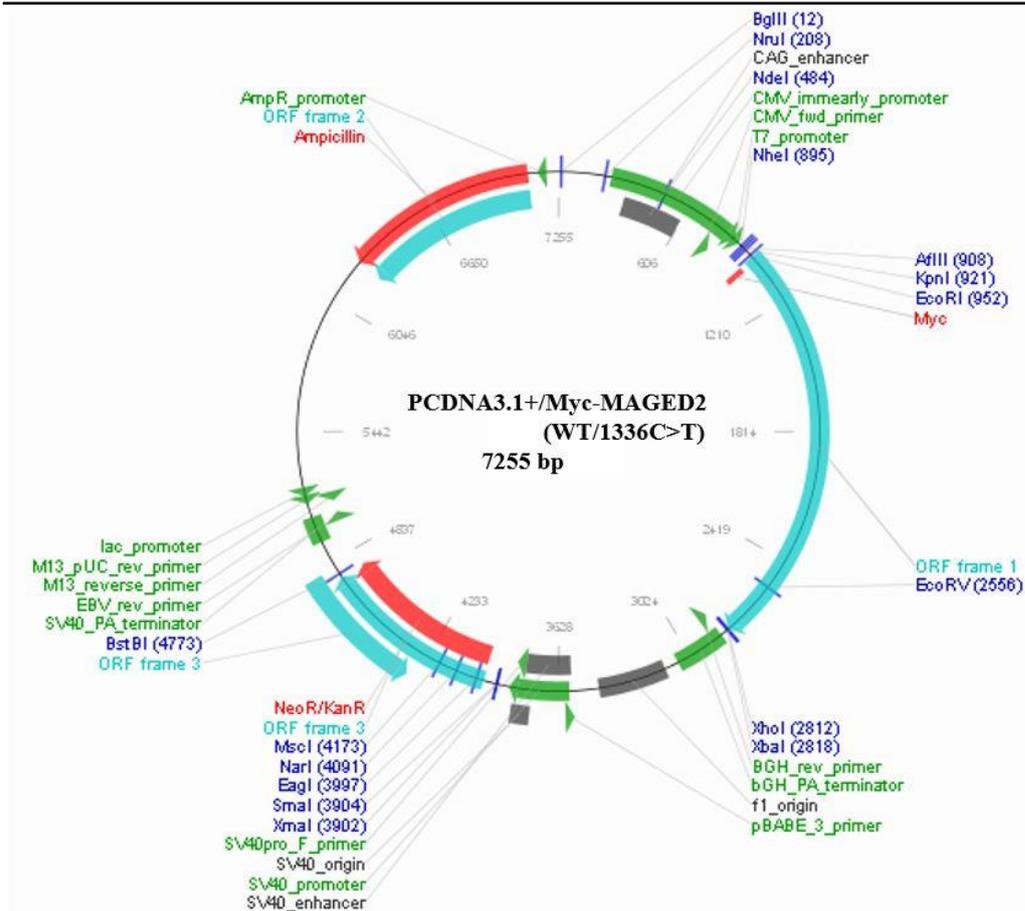


Abbildung 8: pCDNA3.1-Vektor mit Myc-getagtem MAGED2-WT bzw. -MT mit Mutation 1336 C&gt;T

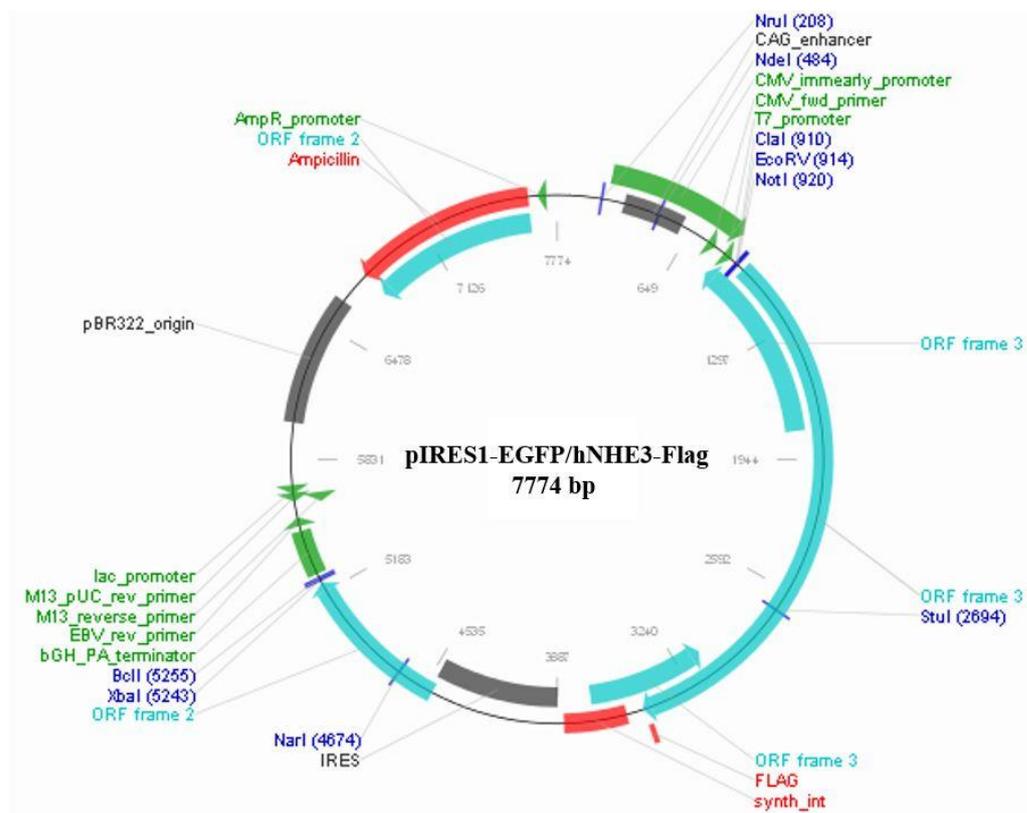


Abbildung 9: : PIRES-Vektor mit EGFP und flag-getagtem NHE3-WT

## Material und Methoden

### 2.4. Geräte, Verbrauchsmaterial und Programme

Name	Firma
<b>Amershan Protran™ 0,45µm Nitrocellulose Membran</b>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<b>Blotting Paper 1,5mm</b>	Kobe KG, Marburg
<b>Adventurer™ Waage</b>	Ohaus, Pine Brook, USA
<b>Biofuge Fresco Refrigerated Microliter Centrifuge</b>	Heraeus, Hanau; Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<b>Eclipse Ts2R Mikroskop</b>	Nikon, Minato, Japan
<b>Eppendorfröhrchen</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Falcons (15/ 50 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Heizblock neoBlock 1</b>	neoLab, Heidelberg
<b>Heizblock Thermomixer 5436</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Mikroliterpipette: Transferpipette (10, 100, 1000 µl)</b>	Brand, Wertheim
<b>Mini-PROTEAN® 3 Cell Gelkammer</b>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA
<b>Multitron</b>	Infors, Bottmingen, Schweiz
<b>NanoDrop 2000c</b>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<b>Pasteurpipetten</b>	Kobe, Marburg
<b>pH-Meter MP220</b>	Mettler Toledo, Columbus, USA
<b>Pipette (Serological) (5/10 /25 ml)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Pipettespitze TipOne RPT (10/100/1000 µl)</b>	Starlab GmbH, Hamburg
<b>Pipetus®</b>	Hirschmann, Eberstadt
<b>Spannungsquelle Standard Power Pack P25</b>	Biometra, Göttingen
<b>Tischzentrifuge FVL-2400</b>	Biosan, Riga, Lettland
<b>Trans-Blot® Turbo</b>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond; USA
<b>Varifuge 3.0 RS</b>	Heraeus, Hanau

Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterial

Name	Nutzung	Firma
<b>Excel 2016</b>	Berechnungen	Microsoft, Redmonde, USA
<b>Fusion FX</b>	Aufnahmen der belichteten Blots	Viber Lourmat, Collégien, Frankreich
<b>ImageJ</b>	Quantifizierung, Bildbearbeitung	Open Source
<b>Microwin 2000</b>	BCA-ELISA Absorptionsbestimmung	Labsis Laborsysteme, Neunkirchen-Seelscheid
<b>NIS Elements D</b>	Fluoreszenzaufnahmen	Nikon, Minato, Japan
<b>PowerPoint 2016</b>	Erstellung von Abbildungen	Microsoft, Redmonde, USA

Tabelle 7: Programme zur Datenverarbeitung

## Material und Methoden

### 2.5. Zellkultur

#### 2.5.1. Zelllinien, Medien und Material

In allen Versuchen wurden HEK293 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in DMEM, welches mit L-Glutamin (1%), Natriumpyruvat, FCS (10%) und Penicillin/Streptomycin (1%) versetzt war, in Kultur gehalten. Je nach Anforderung des Versuchs wurden sie in Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe, oder 6-well Platten, beziehungsweise 8-well Objektträgern ausgesät.

Name	Firma
<b>6-Well TC-Platte</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>8-well Lab-Tek® Chamber Slide™</b>	Nalge Nunc Int., Naperville, USA
<b>BBD 6220 (Inkubator)</b>	Thermo Scientific, St-Leon-Rot
<b>Neubauer improved Zählkammer</b>	Marienfeld, Lauda Königshofen
<b>Zellkulturflaschen (TC-Flasche T75 Standard)</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Zellkulturschale (TC 35)</b>	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 8: Zellkulturmaterialien

#### 2.5.2. Methoden der Kultivierung

Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und 85% Luftfeuchtigkeit gehalten. Bei 80 bis 100% Zellkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin (0,25%) von der Flasche gelöst, zentrifugiert, gezählt und erneut ausgesät. Bei jeder Aussaat und vor jedem Versuch wurden die Zellen lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und Konfluenz beurteilt. Die Versuche wurden mit derselben Zelllinie durchgeführt.

### 2.6. Zellbiologische Methoden

#### 2.6.1. Transfektionen

Die Transfektion ist eine weitverbreitete Methode, um bestimmte Proteine durch eine Zelle produzieren zu lassen und auf dieser Grundlage weitere Experimente durchzuführen. Hierbei werden Plasmide des zu produzierenden Proteins in die Zelle geschleust, dort von den Ribosomen translatiert und anschließend modifiziert. Die Transfektion ist die Grundlage für unsere Forschungen zum Einfluss von MAGED2 auf NHE3.

Die Zellen wurden vor der Transfektion entsprechend des Versuchsgefäßes ausgesät. Für Versuche in 6-well Platten wurden etwa  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro well ausgesät. Bei der Aussaat der Zellen für 60mm Schalen wurden etwa  $3,5 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Für die PLA Versuche wurden etwa  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro well ausgesät. Einen Tag später konnten die Zellen bei einer Konfluenz von mindestens 80% transfiziert werden.

## Material und Methoden

Es wurden insgesamt 2 µg der zu transfizierenden DNA in 100 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium gegeben. Vom bereits vorbereiteten P3000-Reagenz aus dem Transfektions-Kit kamen nun 5 µl zum Ansatz hinzu. 5 µl Lipofectamin 3000 wurden in 100 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium gelöst. Der DNA-Ansatz und das verdünnte Lipofectamin 3000 wurden nun gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Versuch	Zellcontainer (Fläche)	Aussaatdichte	Plasmidkonzentration/well	Lipofectamin + Opti-MEM
CC	Petrischale (8,8 cm <sup>2</sup> )	1,5 x 10 <sup>6</sup>	2 µg	5 µl + 200 µl
DR	6-well Platte (9,6 cm <sup>2</sup> )	1,5 x 10 <sup>6</sup>	2 µg	5 µl + 200 µl
CSB	Petrischale (21,5 cm <sup>2</sup> )	3,5 x 10 <sup>6</sup>	4 µg	10 µl + 400 µl
PLA	8-well Chamber Slides (0,7 cm <sup>2</sup> )	2,5 x 10 <sup>4</sup>	100 ng	0,25 µl + 5 µl

Tabelle 9: Zellaussaatprotokoll für Transfektion; Nach Versuchen aufgelistet, CC=Cycloheximid Chase, DR=Dose Response, CSB=Cell Surface Biotinylation, PLA=Proximity Ligation Assay.

Während dieser Zeit wurden die Zellen zuerst mit PBS gespült und dann mit 800 µl Opti-MEM Reduced Serum Medium bedeckt. Nach der Inkubation des Transfektionsmediums wurden die 200 µl der inkubierten DNA komplett in das Well gegeben und durch vorsichtiges kreisen gemischt. Die 6-Well-Platte wurde daraufhin zurück in den Inkubator bei 37°C gestellt und für 5 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 2 ml DMEM hinzugefügt, um die Transfektion zu stoppen.

### 2.6.2. Dose Response

Dose Response-Versuche dienen der Untersuchung von quantitativem Einfluss von einem Protein auf ein anderes.

Bei den Dose Response-Versuchen wurden unterschiedliche Mengen MAGED2-Plasmid in aufsteigender Menge in die Zellen transfiziert. Die Zusammensetzung der Plasmid-Ansätze bestand jeweils aus 300 ng *Nhe3*-Plasmid (3x *flag* getaggt), einer definierten Menge *Maged2-wt*- oder *mt*-Plasmid (*myc* getaggt) und leerem pcDNA3.1-Vektor, mit dem die Menge an transfizierter DNA auf 2 µg korrigiert wurde. Die Zellen wurden wie beschrieben transfiziert, nach 24 Stunden lysiert und denaturiert.

### 2.6.3. Cycloheximide Chase

Im Cycloheximide Chase-Versuch wird die Translation von Proteinen am Ribosom durch Cycloheximid gestoppt. Die bereits produzierten Proteine werden nun nur weiter abgebaut, ohne dass

## Material und Methoden

---

neue Proteine produziert werden. Indem die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert werden, kann so eine Halbwertszeit für die einzelnen Proteine bestimmt werden. Hierdurch erlaubt diese Methode Unterscheidungen in der Abbaugeschwindigkeit unterschiedlicher Proteine.

Die Zellen wurden für diese Versuche in 35 mm Petrischalen ausgesät. Nach stattgehabter Transfektion wurde am nächsten Tag Cycloheximid in einer Konzentration von 50 µg/ml zu den Zellen gegeben. Als nächstes wurden die Zellen zu festen Zeitpunkten lysiert, wobei die Zeitpunkte je nach Versuchsaufbau variierten. Das mit Cycloheximid versetzte Medium wurde bei Versuchen mit Zeitpunkten über 6 Stunden alle 6 Stunden gewechselt.

### 2.6.4. Cell Surface Biotinylation

Bei der Cell Surface Biotinylation wird eine Eigenschaft des Biotins genutzt, welche es Biotin erlaubt an Protein zu binden. Hierbei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, wie Biotin an die Proteine binden kann. In diesem Versuchsaufbau bindet das aktivierte Biotin unspezifisch an die Aminosäure Lysin, welche sich in den extrazellulären Domänen der Zellwandproteine befindet (Barat und Wu 2007). Bei der CSB wird das Biotin auf die intakte Oberfläche der Zellen gegeben und die an der Oberfläche exprimierten Proteine somit markiert. Nach der Lyse können die so markierten Proteine mithilfe von Avidin aus dem Lysat gebunden werden und somit die Zelloberflächenfraktion des Lysats isoliert werden.

Die Zellen wurden für diese Versuche in 60 mm Petri-Schalen ausgesät und entsprechend der größeren Fläche transfiziert. Nach Transfektion wurden die Zellen auf Eis dreifach mit PBS (versetzt mit  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$ ) gewaschen und anschließend mit 1,5 mg Biotin in PBS gelöst für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach folgte die dreifache Waschung der Zellen mit dem bereits beschriebenen PBS, welches zusätzlich mit Glycin versetzt war. Der letzte Ansatz wurde für 10 Minuten inkubiert und anschließend nochmals mit PBS ohne Glycin zweifach gewaschen. Es folgte die Herstellung des Zelllysats und die Messung des Proteingehalts.

Die Lysate wurden auf dieselbe Proteinkonzentration verdünnt und ein Teil für die Gesamtproteinfraction aliquotiert. Das vorbereitete Avidin wurde mit jeweils 40 µl pro Probe in die Lysate gegeben und unter Agitation bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben siebenfach mit Lysepuffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit Ladepuffer gekocht.

## Material und Methoden

---

### 2.6.5. Proximity Ligation Assay

Mithilfe der Proximity Ligation Assays ist es möglich eine räumliche Nähe (bis zu 40 nm) von zwei unterschiedlichen Proteinen nachzuweisen. Dabei werden DNA-Sonden an Antikörper gekoppelt und bei räumlicher Nähe ligiert. Die entstandene cyclische DNA wird durch eine Polymerase amplifiziert. Schlussendlich werden Fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonden an die amplifizierte DNA gebunden. Diese sind unter polarisiertem Licht im Mikroskop sichtbar.

Für die Proximity Ligation Assays wurden die Zellen auf Chamberslides ausgesät und transfiziert. Die Zellen wurden dreifach mit PBS gewaschen und anschließend mit Paraformaldehyd 4% für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einer erneuten Waschung wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 für 4 Minuten inkubiert, um diese zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen nach Kit-Anleitung mit Blockinglösung bedeckt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert sowie anschließend wieder gewaschen.

Es folgte die Inkubation mit den primären Antikörpern von zwei unterschiedlichen Spezies (Verdünnung 1:100; jeweils 40 µl pro well) für weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur. In dieser Zeit wurden die Duolink PLA Sonden vorbereitet, indem Plus- und Minus Sonde mit den sekundären Antikörpern inkubiert wurden.

Die überschüssigen primären Antikörper wurden von den Zellen gewaschen und die Duolink PLA Sonden zu den Zellen gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Hiernach folgte die Ligation mittels der im Kit enthaltenen verdünnten Ligase, mit welcher die Zellen für 30 Minuten bei 37°C inkubiert wurden.

Abschließend wurden die gebundenen Sonden, die im letzten Schritt ligiert wurden amplifiziert. Hierzu wurden die Zellen mit dem enthaltenen Waschpuffer inkubiert und Amplifikationspuffer entsprechend der Anleitung hinzugeben. Die Zellen wurden mit dem Amplifikationspuffer für 100 Minuten bei 37°C lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des 2. Waschpuffers des Kits gewaschen und mit Duolink mounting media eingedeckt. Die fertigen Slides wurden bei -20°C gelagert.

### 2.6.6. Herstellung der Zellysate

Um die Proteine der Zellen zu untersuchen müssen die Zellwände aufgelöst und die intrazellulären Proteine abgeschöpft werden. Damit Komplexbildung und Abbau verhindert werden, werden die Lysate im letzten Schritt mit Hilfe von Hitze und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert und haltbar gemacht.

Sämtliche Arbeiten fanden auf Eis und mit eisgekühlten Reagenzien statt. Die einzelnen Wells wurden mit PBS gespült und dann mit 100 µl Lysepuffer versetzt. Mit einem Zellenkratzer wurden die anhaftenden Zellen gelöst und mit einer 200 µl-Pipette auf und ab pipettiert. Anschließend

## Material und Methoden

---

wurde das Lysat in Eppendorfröhrchen überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurden die Lysate für 30 Minuten rotierend in Bewegung gehalten, gefolgt von 20 Minuten Zentrifugation bei 16.000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der entstandene Überstand wurde abpipettiert und in ein neues Eppendorfröhrchen überführt.

Nach der Messung der Proteinkonzentration und Anpassung des Proteingehalts wurden den Proben 60  $\mu\text{l}$  Roti®-Load 1 hinzugefügt, diese bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten denaturiert und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.7. Proteinbiochemie

#### 2.7.1. BCA-Proteinbestimmung

Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Ergebnissen und Versuchen herzustellen ist es wichtig, dass mit gleichen Mengen an Protein gearbeitet wird. Durch die BCA-Proteinbestimmung kann der Proteingehalt gemessen und die Proben anschließend entsprechend auf eine Verdünnung titriert werden.

Die Zelllysate wurden 1:5 mit PBS verdünnt und mit den Reagenzien des BCA-Assay-Sets vermischt. Alle Arbeiten fanden auf Eis statt. Neben der Doppelbestimmung der Proben wurden Proteinstandards in die 96-Well-Platte pipettiert. Nach kurzer Agitation wurden die Proben für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und schließlich mittels ELISA-Reader bei 562 nm Wellenlänge ausgelesen.

#### 2.7.2. Koimmunpräzipitation

Bei der Koimmunpräzipitation können direkte Protein-Protein-Bindungen nachgewiesen werden. Hierzu werden magnetische Kügelchen mit Antikörpern besetzt, sodass die Zielproteine an die sogenannten „Beads“ gebunden werden. Nach der Reinigung werden die Proteine von den Beads gelöst und mittels Western Blot aufgetrennt. Die Membran kann daraufhin mit einem Antikörper gegen den vermuteten Bindungspartner entwickelt werden, um so eine direkte Bindung nachzuweisen.

Für die Koimmunpräzipitation wurden die Zellen lysiert, aber noch nicht denaturiert. Etwa 30  $\mu\text{l}$  vorbereitete und gewaschene Beads wurden mit 2  $\mu\text{l}$  Antikörper bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Agitation inkubiert. Die fertig beschichteten Beads wurden wiederum gewaschen, um überschüssige und nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurden die Beads mit den Zelllysaten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, kurz zentrifugiert, 100  $\mu\text{l}$  Überstand gesichert und die Beads mit PBS gewaschen. Um

## Material und Methoden

---

die Proteine von den Beads zu lösen, wurden die Ansätze zusammen mit Lysepuffer für 10 Minuten bei 95°C gekocht.

### 2.7.3. Western Blot

Western Blots sind seit vielen Jahren die Methode der Wahl um Proteine entsprechend ihrer Größe zu trennen. Dabei laufen die Proteinproben entlang eines elektrischen Feldes durch ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel, wobei größere Proteine aufgrund des höheren Widerstandes langsamer laufen als kleine Proteine mit einem geringeren Gewicht. Die so aufgetrennten Proteinfractionen werden dann aus dem Gel auf eine Membran geblottet, welche nun mit Antikörpern inkubiert werden kann. Über die Antikörper können so spezifische Proteine nachgewiesen werden und im Vergleich miteinander eine Aussage über die exprimierte Menge getroffen werden.

Sollen die Membranen wiederverwendet werden, um zum Beispiel andere Proteine nachzuweisen, können die gebundenen Antikörper auch wieder von der Membran entfernt werden (siehe Stripping).

#### 2.7.3.1. SDS-Gele

Die SDS-Gele wurden in BioRad-Glasplatten (1,5 mm) gegossen. Dabei bestand das Trenngel aus 8% Acrylamid, sowie Tris-SDS, TEMED und APS nach Laborstandard. Das obenaufgefügte Sammelgel unterschied sich vom Trenngel im Acrylamidanteil, welcher hier nur 4% betrug. Um eine glatte Trennkante zu gewährleisten wurde das zuerst eingefüllte Trenngel mit Isopropanyl bedeckt, bis es ausgehärtet war. Anschließend wurde das Sammelgel aufgegossen und der Probenkamm eingesetzt. Die fertigen Gele wurden feucht bei 4°C über Nacht gelagert.

#### 2.7.3.2. Laufprotokoll

Vor dem Gellauf wurde die Glasplatte in den Laufapparat eingespannt und in der Laufkammer mit Laufpuffer bedeckt. Die Gele wurden entsprechend des Versuchs mit den Zelllysaten (etwa 25 µl pro well) und einem Größenmarker geladen. Zuerst wurde eine Einlaufphase mit 30 mA bei etwa 100 V für 20 bis 30 Minuten durchgeführt, bis die Proben und der Marker die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 150 V gestellt und der eigentliche Gellauf für etwa eine Stunde durchgeführt.

### 2.7.3.3. Blotten

Für das Blotten wurde ein Trans-Blot Turbo von BioRad genutzt. Zwischen Blottingpapier wurde die aktivierte Nitrocellulosemembran auf das Gel gelegt und mit Transferpuffer getränkt. Das Blotten wurde dann mit dem vom Hersteller vorgegebenen Programm durchgeführt. Um den Erfolg und die Qualität des Blots zu überprüfen, wurde Ponceau-Rot-Lösung auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran mit 4 %iger Milchpulver-TBST-Lösung geblockt, damit die proteinaffine Membran keine fremden Proteine bindet.

### 2.7.3.4. Immunfärbung und Immundetektion

Für die Immunfärbung wurden die primären Antikörper mit Blocklösung in unterschiedlichen Verdünnungen angesetzt. Die Membranen wurden dann über Nacht bei 4°C mit der Antikörper-Lösung inkubiert. Es folgte die dreifache Waschung der Membran mit TBST für jeweils 5 Minuten. Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde bei Raumtemperatur für 1 Stunde durchgeführt. Zum Abschluss der Immunfärbung wurden die Membranen wiederum dreifach mit TBST für jeweils 10 Minuten gewaschen.

Zur Detektion wurde die Horseradish-Peroxidase mit Luminol (ECL-Lösung von BioRad) versetzt und auf die Membran gegeben. Unter Lichtschutz wurde die Membran hieraufhin unter die Kamera gelegt und für unterschiedliche Zeiten mit polarisiertem Licht entwickelt.

### 2.7.3.5. Stripping

Für jedes Stripping wurde der Puffer frisch angesetzt. Dieser wurde zuerst auf 50°C in einem Inkubator erhitzt. Dann wurde die Membran in den Harsh-stripping Puffer gegeben und bei 50°C unter Agitation für 45 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran erst für etwa 2 Minuten unter fließendem Wasser gespült und dann für 5 Minuten in TBST gewaschen. Hiernach war die Membran bereit, wieder mit Milchpulverlösung geblockt zu werden.

### 3. Ergebnisse

Zur Untersuchung der verschiedenen Einflussmöglichkeiten nutzten wir die bereits beschriebenen Methoden. Hierbei gibt es unterschiedliche Ebenen und Effekte über welche MAGED2 einen Einfluss auf NHE3 haben könnte.

#### 3.1. Koimmunpräzipitation

Um eine Interaktion zwischen MAGED2 und NHE3 festzustellen, galt es zuerst zu untersuchen, ob beide Proteine mit einander eine Bindung eingehen. Mittels Koimmunpräzipitation wurde untersucht, ob durch eine Extraktion der NHE3-Fraktion auch MAGED2 nachgewiesen werden konnte.

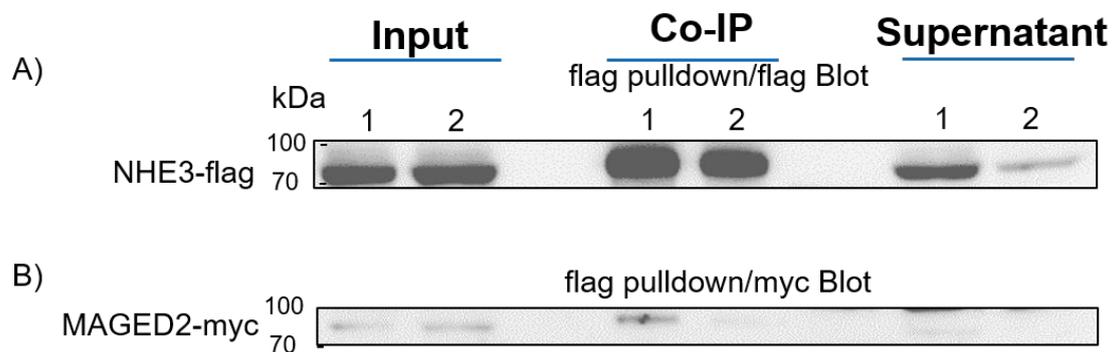


Abbildung 10: Koimmunpräzipitation Ergebnisse. Input=natives Zelllysate; Co-IP= Zellproteinfraktion mit flag-Antikörpern herausgefiltert; Supernatant=Restliches Zelllysate, nach Inkubation mit flag-Beads. 1=NHE3-flag + MAGED2 WT-myc transfiziert; 2=NHE3-flag + MAGED2 MT-myc transfiziert.

Die exemplarischen Ergebnisse (Abbildung 10) zeigen dreigeteilt von links nach rechts das Gesamtzelllysate der transfizierten HEK293-Zellen, welches sowohl für NHE3 als auch für MAGED2-WT und -MT das gleiche Maß an Proteinexpression zeigt. Die Auszüge mit der Überschrift „Co-IP (flag pulldown)“ zeigt hingegen die Fraktion des NHE3. Hierbei ist ersichtlich, dass sowohl MAGED2-WT als auch -MT über NHE3 aus dem Zelllysate extrahiert wurde.

Rechts findet sich der restliche Überstand nach der Extraktion der NHE3-Fraktion. Hier sind sowohl NHE3 als auch beide MAGED2-Typen vorhanden. Unterschiede in den Sättigungen der Banden sind hierbei als Artefakt durch die unterschiedliche Proteinquantität und -stabilität zu sehen.

Es ist hieraus ersichtlich, dass NHE3 mit MAGED2-WT in einem Komplex existiert. Die untersuchte Mutation des *Maged2*-Gens (1336 C>T) hat scheinbar keinen Einfluss auf die Bildung dieses Komplexes.

## Ergebnisse

### 3.2. Proximity Ligation Assay

Um die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation zu bestätigen, wurde das Proximity Ligation Assay in HEK293-Zellen verwendet. Mit dieser Methode kann eine räumliche Nähe von bis zu 40 nm zwischen zwei Proteinen untersucht werden. Die beiden Proteine von Interesse werden mit Antikörpern markiert, die in zwei unterschiedlichen Spezies erzeugt wurden. Durch den Speziesunterschied können sekundäre Antikörper, an welche DNA-Sonden gebunden sind, spezifisch an die gesuchten Proteine binden. Die beiden DNA-Sonden formen nach einer Ligation eine cyclische DNA, welche durch eine Polymerasekettenreaktion vervielfältigt wird. Im letzten Schritt werden Fluoreszenz-markierte Hybridisierungssonden an die amplifizierte DNA gebunden. Diese können in der Fluoreszenzmikroskopie als rotes Licht nachgewiesen werden. Bei Proteinen, die keine räumliche Nähe aufweisen, sind diese Signale nicht zu finden, da die Sonden zu weit entfernt sind, sich keine cyclische DNA bildet und die Polymerase somit keine DNA amplifizieren kann.

Zur Identifikation der gesunden Zellen und zur Kontrolle der korrekten Aufnahme der Antikörper und Sonden in die Zellen wurde die DNA mit DAPI markiert. 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, ist ein blauer Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA eingesetzt wird.

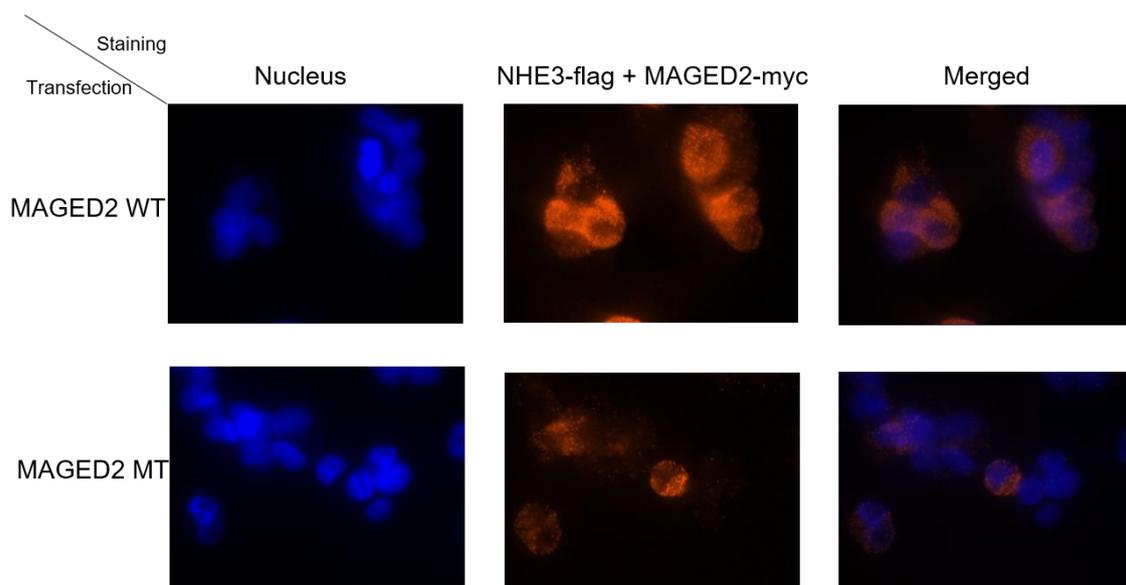


Abbildung 11: Ergebnisse des Proximity Ligation Assays. Vergrößerung 100. Blaue Fluoreszenz=DAPI-Färbung der Nuclei; Rote Fluoreszenz=amplifiziertes Sondersignal.

In der Abbildung 11 sind exemplarisch Zellen aus den PLA-Versuchen abgebildet. Die Nucleus-Färbung ist zur Kontrolle, wie oben beschrieben, gedacht. Die roten Signale in den mittleren Bildern zeigen, dass sowohl MAGED2-WT als auch –MT eine räumliche Nähe zu NHE3 aufweisen.

## Ergebnisse

Diese Ergebnisse untermauern die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation. Die Verteilung der Proteine in der Zelle ist aufgrund des Zelltyps nicht zu bestimmen. Die Verteilungsmuster der Komplexe von MAGED2-WT beziehungsweise –MT und NHE3 ähneln sich jedoch.

### 3.1. Dose Response

Um einen Einfluss von MAGED2-WT und –MT auf die Gesamtexpression von NHE3 zu untersuchen, wurden Dose Responseversuche durchgeführt. Hierbei werden steigende Mengen *Maged2*-Plasmid in den Zellen mit *Nhe3*-Plasmid koexprimiert. Die Proteinmenge an NHE3 kann danach in Zusammenhang mit der Proteinmenge des MAGED2 gebracht werden. Bei diesen Versuchen ist dem Umstand, dass MAGED2-MT instabiler ist, durch höhere Mengen MAGED2-MT-Plasmids, die eingesetzt werden, Rechnung getragen.

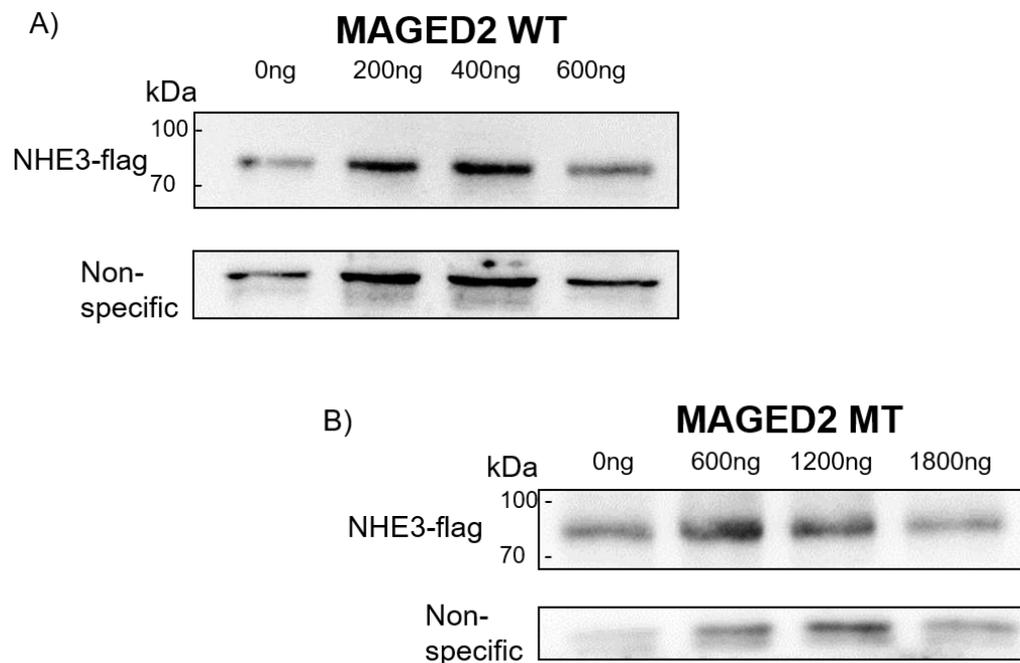


Abbildung 12: Dose Response Versuche. A) 200 ng NHE3-flag mit aufsteigenden Dosen MAGED2-WT-myc; unspezifische Bande zum Vergleich der Proteinmenge. B) 200 NHE3-flag mit aufsteigenden Dosen MAGED2-MT-myc; unspezifische Bande zum Vergleich der Proteinmenge.

Die Auszüge der Western Blot-Membranen zeigen die Fraktion für NHE3 und zum Vergleich der Proteinmenge eine unspezifische Bindung. In Abbildung 12 A) wurde NHE3 mit steigenden Mengen MAGED2-WT exprimiert. Die Expression mit MAGED2-MT ist in Abbildung 12 B) exemplarisch dargestellt.

Die Expression von NHE3 war in allen Versuchen vergleichbar und die Bandenstärke nur aufgrund der unterschiedlich geladenen Proteinmengen leicht verschieden. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Banden zu ermöglichen, wurden die nichtspezifischen Bindungen miteingeschlossen. Da die unspezifischen Bindungen an Proteinen vorkommen, die nicht überexprimiert wurden, lässt sich hierüber die geladene Proteinmenge vergleichen.

## Ergebnisse

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Gesamtexpression von NHE3 weder durch MAGED2-WT noch durch –MT beeinflusst wird.

### 3.2. Cycloheximide Chase

In den Cycloheximide Chase-Versuchen wurden die Ribosomen der HEK293 Zellen durch Cycloheximid gehemmt, sodass keine neuen Proteine synthetisiert werden konnten. Es wurde die Proteinkonzentration von NHE3 zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 24 Stunden bestimmt und in Abhängigkeit der Anwesenheit von MAGED2 betrachtet. Hierzu wurde in HEK293-Zellen NHE3 mit MAGED2 überexprimiert. Zum Vergleich der Proteinstabilität in Abwesenheit von MAGED2 wurden mittels siRNA MAGED2 knock down Zellen erstellt. Durch den knock down von MAGED2 konnte die endogene MAGED2-Produktion der HEK293-Zellen minimiert werden (Abbildung 13).

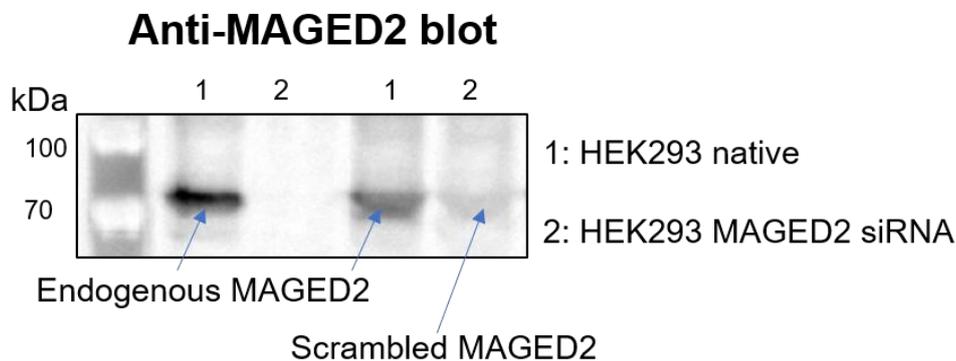


Abbildung 13: Nachweis von endogenem MAGED2 in HEK293-Zellen, MAGED2 knock-down HEK293-Zellen zur Kontrolle. Die Banden unter 1 zeigen das endogene MAGED2 der HEK293-Zellen. In 2 wurde die Expression durch siRNA unterdrückt.

Ziel der Versuche war es, Unterschiede der Proteinstabilität direkt posttranslational zu untersuchen. Dies ist durch eine höhere zeitliche Auflösung besser möglich. Die Versuche konnten deshalb in unserem Versuchsansatz die Halbwertszeit von NHE3 nicht bestimmen, da die gewählten Zeitpunkte vor der bereits bekannten Halbwertszeit von NHE3 (25 h) lagen (Hu et al. 2013).

Abbildung 14 A) zeigt exemplarisch einen Anti-flag-Immunoblot des Cycloheximide Chase-Versuchs. Die Überschriften bezeichnen hierbei die transfizierten Plasmide, beziehungsweise die MAGED2 knockdown Zellen. Die Zahlen beschreiben die Zeitpunkte der Zellyse (s. Kapitel 2.6.3). B) zeigt die NHE3-Konzentration abhängig von der NHE3-Konzentration zum Zeitpunkt 0 Stunden gegen die Zeit.

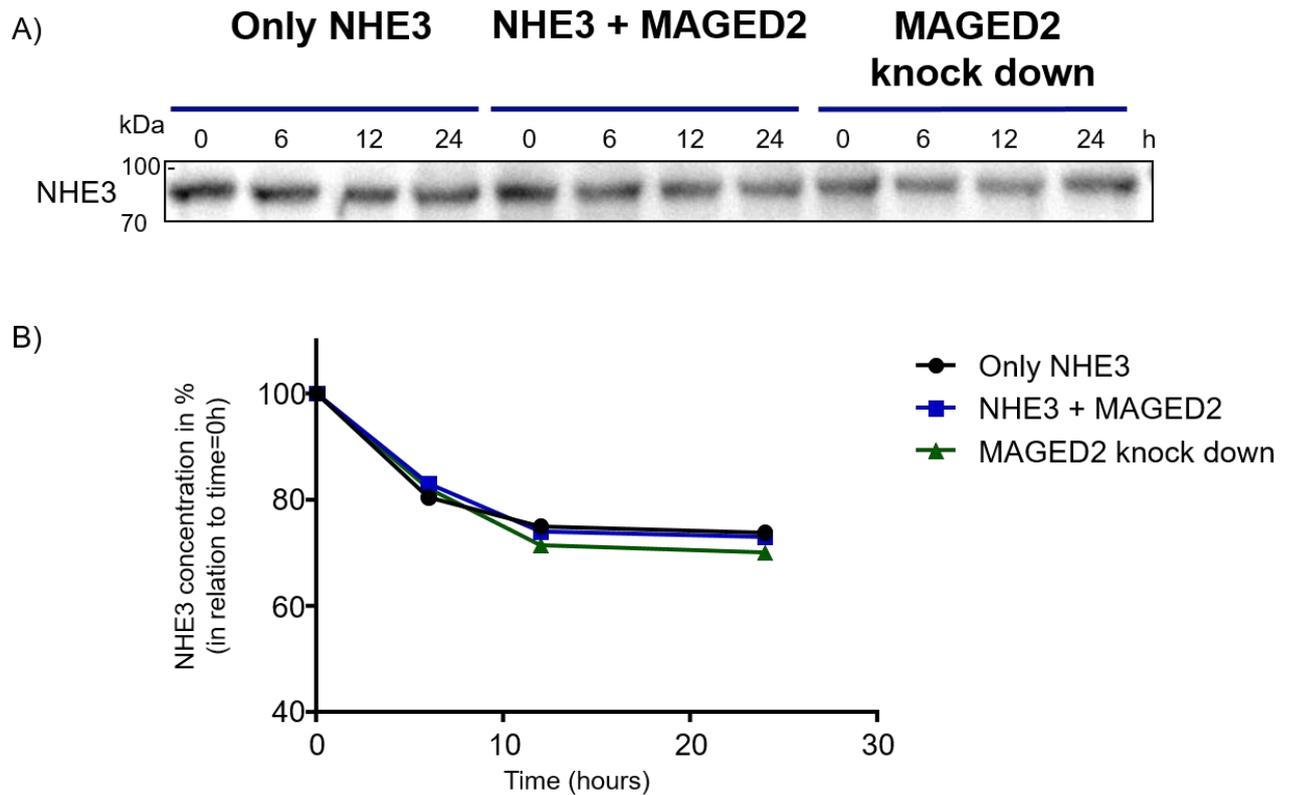


Abbildung 14: Cycloheximide Chase Ergebnisse. A): Anti-flag Immunoblot. B): Konzentration von NHE3 in Relation zur NHE3-Konzentration zum Ausgangszeitpunkt 0 Stunden

Es wird ersichtlich, dass sich die NHE3-Protein-Konzentration weder durch die Überexpression von MAGED2 noch durch die komplette Abwesenheit verändert. Es ist also zu festzustellen, dass MAGED2 keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von NHE3 hat.

### 3.3. Cell Surface Biotinylation

Nachdem bereits ein Einfluss von MAGED2 auf die Expression und Halbwertszeit von NHE3 ausgeschlossen wurde, stellt sich die Frage, ob es einen Einfluss auf andere Prozesse gibt, welche nach der Proteinbiosynthese und der Faltung der Proteine stattfinden. Durch eine verminderte Zelloberflächenintegration könnte es zu einer deutlichen Verminderung der proximalen Natriumrückresorption kommen. Zur Überprüfung dieser These wurde mittels Cell Surface Biotinylation die Integration von NHE3 in die apikale Plasmamembran in Abhängigkeit von MAGED2 untersucht.

HEK293-Zellen wurden mit *Nhe3*- und entweder *Maged2-wt*- oder *-mt*-Plasmid transfiziert. Nach der Biotinylierung und Zelllyse konnte so die Oberflächenfraktion der intrazellulären Proteine isoliert werden. Diese Fraktion wurde dann mittels Western-Blot auf ihre NHE3-Konzentration untersucht.

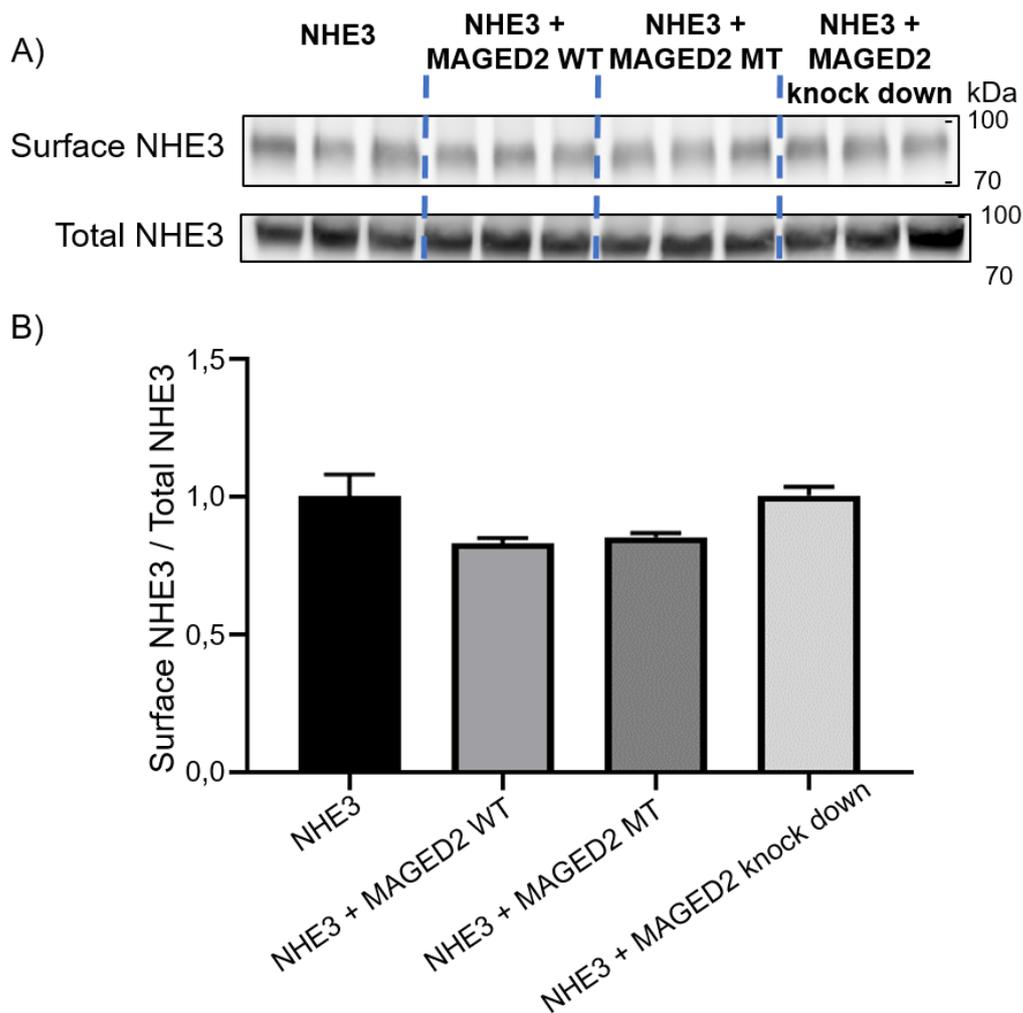


Abbildung 15: Ergebnisse der Cell Surface Biotinylation. Surface NHE3=Oberflächenfraktion von NHE3 mithilfe von Streptavidin extrahiert; Total NHE3=Gesamtes NHE3 in der Zelle. A) Blot im Vergleich. B) Quantifizierung von Oberflächen NHE3 zu Gesamt-NHE3.

Aus den Ergebnissen (Abbildung 15) wird ersichtlich, dass die Zelloberflächenfraktion des NHE3 nicht durch die Anwesenheit von MAGED2-WT, oder MAGED2-MT noch durch die Abwesenheit von MAGED2 beeinflussen lässt. Auch die Gesamtmenge von NHE3 variiert nicht, wie bereits die Dose Response Versuche gezeigt haben. Die Gesamtkonzentration des NHE3 ist deshalb als Kontrolle und zum Ausschluss möglicher Artefakte mit aufgeführt.

### 3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Wie bereits beschrieben zeigt MAGED2 einen Einfluss auf NCC und NKCC2, der sich besonders in der Expression zeigt. Auf NHE3 trifft dies nicht zu, obwohl beide Proteine einen Komplex bilden können. Die Koimmunpräzipitation und die Proximity Ligation Assays stützen sich hierbei in ihren Aussagen. Beide Experimente lassen den Schluss zu, dass NHE3 entweder direkt oder über dritte Proteine mit MAGED2 verbunden ist.

## **Ergebnisse**

---

In den Dose Response-Versuchen konnten keine Einflüsse auf die Expression von NHE3 nachgewiesen werden. Weder MAGED2-WT noch -MT scheinen an der posttranslationalen Modifikation beteiligt zu sein, da auch kein Effekt auf die Stabilität des NHE3 nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse lassen sich aus den Cycloheximide Chase-Versuchen ableiten. Aus den Ergebnissen der anschließenden Cell Surface Biotinylation ist ersichtlich, dass MAGED2 keinen Einfluss auf die Zelloberflächenintegration von NHE3 hat.

Somit sind sowohl die Expression und Modifikation als auch das Protein-Trafficking von NHE3 nicht durch MAGED2 beeinflusst.

## 4. Methodenkritik

Die genutzten Methoden sind weit verbreitet und im Labor der AG Weber/Kömhoff mittlerweile etabliert. Während der Erstellung dieser Arbeit mussten jedoch fast alle Methoden erarbeitet und Fehler beseitigt werden. Auch wenn es möglich war, viele Fehlerquellen zu beheben, ist eine ständige Kontrolle dieser Methoden notwendig, um weiterhin verlässliche Ergebnisse zu erzielen.

Allgemein ist die Transfektion mit vielen möglichen Fehlern behaftet, die eine Vergleichbarkeit von Experimenten schwierig machen können. Die Dauer und Erfolgsrate der Transfektion ist entscheidend für den späteren Gehalt an transfiziertem Protein. Außerdem führt eine Transfektion zu zellulärem Stress, der den Metabolismus der Zelle verändert (Lonez et al. 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch andere Zellreihen getestet, die jedoch entweder eine geringere Transfektionseffizienz aufwiesen oder durch die Transfektion gestorben sind.

Gerade HEK293-Zellen eignen sich besonders zur Transfektion, da sie leicht zu transfizieren sind und eine gute Stresstoleranz aufweisen. Sie haben aber, wie bereits beschrieben, auch Merkmale neuronaler Zellen (Shaw et al. 2002). Es ist somit nicht vorauszusetzen, dass die beobachteten Effekte in der Niere genauso ablaufen. Dies gilt jedoch für die meisten Zellsysteme und Versuche, die mit Überexpression arbeiten. Ziel dieser Arbeit ist aber auch nicht die korrekte Darstellung der physiologisch gesunden Niere, sondern die Beobachtung von Interaktionen zwischen MAGED2 und NHE3. Die gewählten Zellen eignen sich hierfür auch gerade dadurch, dass sie beide Proteine, zwar in geringem Maße, endogen produzieren.

Die bereits gelösten Probleme werden hier nicht weiter berücksichtigt, sondern die unvermeidlichen möglichen Fehlerquellen und deren mögliche Vermeidung behandelt.

### 4.1.1. Koimmunpräzipitation

Bei der Koimmunpräzipitation treten Fehler besonders bei der Beschichtung der „Beads“ mit den Antikörpern auf. Daher muss die korrekte Bindung später im Western Blot überprüft werden. Je nach Antikörper schwankt die Bindungsaffinität mit dem Zielprotein nach der Beschichtung der „Beads“. Während der Waschung der „Beads“ kann es aufgrund von mangelnder Erfahrung mit dem Magnetsystem dazu kommen, dass nicht alle ungebundenen Proteine ausgewaschen werden. Im späteren Schritt der Denaturierung kann es vorkommen, dass aufgrund von zu kurzer Kochzeit die Antikörper nicht vollständig von den „Beads“ gelöst werden und somit nicht die gesamte Fraktion in der Probe bleibt, sondern mit den „Beads“ verworfen wird.

Bei ausreichender Erfahrung mit dieser Methode sind valide Ergebnisse zu erwarten. Die Aussa-

## Methodenkritik

---

gekraft ist jedoch begrenzt, denn eine direkte Interaktion kann nicht mit letzter Sicherheit nachgewiesen werden. Sollten die beiden Proteine von Interesse über andere Proteine mit einander interagieren, fallen die Versuche ebenfalls positiv aus.

### 4.1.2. Proximity Ligation Assay

Da das Proximity Ligation Assay mit einem Reaktionskit durchgeführt wurde, sind sowohl Reagenzien, als auch das Protokoll zur Durchführung standardisiert und einfach zu befolgen. Der bereits erwähnte Nachteil der Methode ist, dass keine direkte Interaktion nachgewiesen werden kann, sondern nur die räumliche Nähe von zwei Proteinen. Für ein positives PLA-Signal ist eine Nähe von 40 nm oder weniger notwendig. Im Kontext von Proteinen ist dies jedoch eine Entfernung, bei der auch andere Proteine zwischen den Reaktionspartnern sein könnten.

Die Permeabilisierung ist zudem ein hoher zellulärer Stress, durch den viele Zellen sterben. Dies ist unter anderem der Grund, weshalb die Proximity Ligation Assays nur in HEK293-Zellen durchgeführt wurden. Versuche in anderen Zellreihen waren aufgrund der Zelltoxizität und des Zellstresses nicht erfolgreich. HEK293-Zellen haben nur wenig Zytoplasma und einen großen Kern. Daher ist eine Diskriminierung in cytosolischen und nucleären Proteinen schwer möglich. Die Transfektion mit anschließender Permeabilisierung war jedoch für die anderen zur Verfügung stehenden Zellen mit relativ größerem Zytoplasma zu toxisch, sodass keine Zellen die Experimente überlebten.

Sollte eine stabile Zelllinie für diesen Versuch ermittelt werden, ist eine Wiederholung zu empfehlen. Gerade eine unterschiedliche Verteilung von MAGED2-WT und -MT in der Zelle wäre hier von Interesse.

### 4.1.1. Dose Response

Um eine Vergleichbarkeit in Dose Response-Versuchen zu gewährleisten ist es wichtig, dass die gleichen Konzentrationen MAGED2-WT und -MT in den entsprechenden Zellen vorhanden sind. Da *Maged2-mt*- vermutlich ähnlich effizient wie *Maged2-wt*-Plasmid translatiert wird, aber MAGED2-MT-Protein vermutlich infolge der Missensmutation schneller abgebaut wird, ist es notwendig größere Mengen *Maged2-mt*-Plasmid zu transfizieren. Diesem Umstand wurde während der Planung der Versuche Rechnung getragen.

Aufgrund der ebenfalls erfolgten NHE3-Transfektion sind nicht alle molekularbiologischen Gegebenheiten, wie eine Aktivierung von Promotoren durch MAGED2, zu detektieren. Durch die Transfektion wird dieser Mechanismus umgangen. Diese ist jedoch ebenfalls notwendig, da die endogene Produktion von NHE3 in HEK293-Zellen zu gering ist. Falls die Detektion des endogenen NHE3-Protein verbessert werden könnte, wäre eine genauere Analyse des Einflusses von

## Methodenkritik

---

MAGED2 auf die Expression von NHE3 möglich. Denkbar wäre eine mRNA-RT-PCR, um die vorhandenen Mengen von NHE3-mRNA zu messen.

### 4.1.2. Cycloheximide Chase

In den Cycloheximid Versuchen sind potentielle Fehlerquellen besonders mit der Länge des Versuchs zu begründen. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, das die Proteinbiosynthese hemmt. Somit können keine neuen Proteine nachgebildet werden. Gerade in der längeren Inkubationszeit können Proteine jedoch weiter denaturiert werden oder Zellen sterben. Hierdurch kann der korrekte Abbau so nicht mehr gewährleistet werden. In diesem Fall könnten Halbwertszeiten fälschlich zu lang gemessen werden. Außerdem kann der Abbau durch die Modifizierung (Tag) der transfizierten Proteine beeinflusst werden.

Da in dieser Arbeit Unterschiede im Abbau der Proteine gesucht wurden, sind diese Effekte jedoch nicht ausschlaggebend für die Ergebnisse. Wichtiger ist der Unterschied in der Abbaurate der beiden Proteine im Vergleich. Ist die eine Halbwertszeit deutlich kürzer als die des anderen Proteins, kann ein möglicher Effekt eventuell nicht messbar sein. Hier bietet sich ein Pulse Chase Assay als alternative Methode an, bei dem die Proteine ohne relevante akute Toxizität mit radioaktiven Isotopen markiert und anschließend nach einer Koimmunpräzipitation die Strahlungsstärken gemessen werden.

### 4.1.3. Cell Surface Biotinylation

Bei der Cell Surface Biotinylation ist es unerlässlich, dass alle Arbeiten auf Eis stattfinden. Hierdurch wird der Zellmetabolismus verlangsamt, sodass kein Biotin in die Zelle gelangt. Sollte die anschließende Waschung nicht mit aller Sorgfalt erfolgen, bleibt ungebundenes Biotin auf den Zellen zurück und markiert während der Zellyse fälschlicher Weise intrazelluläre Proteine. Auch die Vorbereitung des Biotins ist mit einigen Fallstricken versehen. Da kein Protein an das Biotin gelangen darf, ist es essenziell, die Zeit, die das Biotin der Raumluft ausgesetzt ist, zu minimieren. Außerdem müssen alle Gerätschaften vorher mit Alkohol gesäubert werden.

Im weiteren Verlauf des Experiments ist auf die Verwendung von gleichen Mengen Avidin zu achten. Ungleiche Mengen können zu Messungenauigkeiten führen, da möglicherweise nicht die gesamte Zelloberflächenfraktion extrahiert wird.

Während der Etablierung dieser Methode ist deutlich geworden, dass viel Erfahrung nötig ist, um verlässliche Ergebnisse zu erheben.

---

## 5. Diskussion

Die Forschung zu MAGED2-vermittelten Effekten schreitet stetig voran. Für die zukünftige Forschung sind die oben beschriebenen Erkenntnisse hinweisgebend. Wie bereits eingangs erörtert sind noch nicht alle intrazellulären Interaktionspartner von MAGED2 identifiziert. Bis zum Abschließen dieser Forschung sind auch Einflussmöglichkeiten von MAGED2 und NHE3 weiterhin möglich. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen jedoch, dass sich NHE3 als Negativkontrolle für weitere Experimente eignet, die einen Einfluss von MAGED2 auf die Expression und Oberflächenintegration anderer Proteine untersuchen. Zur Weiterentwicklung der MAGED2-assoziierten Forschung sind die Methoden und Ergebnisse dieser Arbeit aber auch kritisch zu betrachten.

### 5.1. Einordnung der Ergebnisse

Zur korrekten Einordnung der Ergebnisse ist der theoretische Hintergrund dieser Arbeit wichtig. Die in der Einleitung beschriebenen Effekte und physiologischen Funktionen tragen zur Interpretation der Ergebnisse bei. Von anderen Formen des Bartter-Syndroms unterscheidet sich das transiente antenatale Bartter-Syndrom durch den extremen Phänotyp, den transienten Charakter und den frühen Beginn der Erkrankung (Seyberth et al. 2017). Aufgrund der schweren Symptomatik der Patienten ist zu erwarten, dass MAGED2 nicht nur NKCC2 und NCC beeinflusst (Laghmani et al. 2016), sondern auch andere Transportproteine betroffen sind. NHE3 wäre hierfür ein wahrscheinlicher Kandidat, weil das Protein für einen Großteil der proximalen  $\text{Na}^+$ -Rückresorption zuständig ist (Pape et al. 2014). Außerdem ist bekannt, dass es, zum Beispiel mit  $\text{G}\text{-}\alpha\text{s}$  interagiert (Kömhoff und Laghmani 2017), welches über die Adenylatcyklase und cAMP auch mit NHE3 funktionell interagiert (Alexander und Grinstein 2009), allerdings hat cAMP, im Unterschied zu NCC und NKCC2, einen hemmenden Einfluss auf die NHE3-Aktivität. Auf dieser Basis sollen die Erkenntnisse in die noch nicht in Gänze verstandene Pathophysiologie des transienten antenatalen Bartter-Syndroms eingebettet werden.

Aufgrund der beschriebenen Effekte von MAGED2 auf NKCC2 und NCC wurde zuerst die Interaktion von MAGED2 mit NHE3 mittels Koimmunpräzipitation untersucht und die Ergebnisse durch Proximity Ligation Assays überprüft. Wie bereits im Kapitel 4 Ergebnisse berichtet, konnte nachgewiesen werden, dass MAGED2 und NHE3 in vitro nach Überexpression in einem Komplex vorliegen, der möglicherweise auch die Situation in vivo widerspiegelt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es eine Interaktion zwischen MAGED2-WT beziehungsweise –MT und NHE3 gibt. Es ist zu vermuten, dass die beiden Proteine nicht in direkter Weise mit einander interagieren, sondern über andere Proteine in einem Komplex miteinander verbunden sind. Dies könnten zum Beispiel Proteine der intrazellulären Signalkaskade sein, welche mit MAGED2 interagiert,

## Diskussion

---

oder das Chaperon Hsp40, welches an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen beteiligt ist (Kömhoff und Laghmani 2017).

Ein Einfluss von MAGED2-WT oder -MT auf NHE3 in der Expression, Proteinmodifikation oder Zelloberflächenintegration konnte jedoch nicht gezeigt werden.

NHE3 ist somit das erste bekannte Kanalprotein der Niere, welches in diesen Aspekten nicht von MAGED2 beeinflusst wird. Eine mögliche Erkenntnis, die hieraus gewonnen werden kann, ist, dass sich die Stimulation von NHE3 für die Therapie des transienten antenatalen Bartter-Syndroms eignen könnte. Außerdem kann NHE3 bei Versuchen, die einen Einfluss von MAGED2 auf einen der genannten Aspekte untersucht, als Negativkontrolle genutzt werden.

Nicht auszuschließen ist, dass MAGED2 zwar einen Einfluss auf NHE3 hat, dieser jedoch durch die hier untersuchte Mutation nicht beeinflusst wird. Neue Mutationen von *Maged2* werden in der Fachliteratur immer wieder beschrieben (Legrand et al. 2018). Gegen diese Annahme spricht allerdings, dass der Phänotyp des transienten antenatalen Bartter-Syndroms sich unabhängig von der Mutation immer ähnlich präsentiert.

Für die Einordnung der Erkenntnisse bleibt festzustellen, dass MAGED2 auch mit NHE3 interagiert und das Potenzial für einen Einfluss aufweist. Denkbar wäre ein Einfluss auf die Funktionalität oder Aktivität des Antiporters. Von mehreren Proteinen (z.B. ROMK2) ist bekannt, dass ein vorliegender Komplex keinen Einfluss auf das Trafficking und die Oberflächenintegration, dafür aber auf die Funktion des Kanals haben kann (Renigunta et al. 2011). Dieser Einfluss könnte über intrazelluläre Signalwege, wie die cAMP-Konzentration, vermittelt werden. Bei einem Anstieg der cAMP-Konzentration der Zelle durch MAGED2-MT würde auch die Funktionalität von NHE3 eingeschränkt werden. Sollte NHE3 in solcher Form beeinflusst werden, könnte dies wie eingangs beschrieben zum Phänotyp der Erkrankung beitragen.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass es einen möglichen Einfluss von MAGED2 auf NHE3 gibt, der jedoch aufgrund der Überexpression und der damit verbundenen Proteintoxizität verdeckt wurde.

### 5.1.1. Zusammenfassende Interpretation

In Zusammenschau der Ergebnisse ist festzustellen, dass es keinen Anhalt für die strukturelle Veränderung oder ein verändertes Proteintrafficking gibt, obwohl NHE3 sowohl mit MAGED2-WT als auch -MT in einem Komplex vorliegt.

Für das transiente antenatale Bartter-Syndrom bedeuten diese Erkenntnisse, dass andere Kanalproteine wie ROMK oder Kir 4.1 durch MAGED2 beeinflusst sein könnten. NHE3 ist vorerst in der weiteren Forschung als Vergleichsmodell nützlich. Der extreme Phänotyp der Erkrankung

## Diskussion

---

kann durch diese Ergebnisse nicht weiter erklärt werden. Es zeigt jedoch, dass nicht alle Kanalproteine der Niere betroffen sind und die Identifikation von anderen nicht beeinflussten Kanalproteinen zu einem therapeutischen Ziel führen kann.

### 5.2. Ausblick

Die Forschungen zum transienten antenatalen Bartter-Syndrom und MAGED2 dauern weiter an. Zwar konnte der Einfluss auf einige Transportproteine gezeigt werden, jedoch erklären diese nicht ausreichend, wie der schwere Phänotyp dieser Erkrankung entsteht. Besonders der transiente Charakter der Erkrankung sollte weiter erforscht werden. Vorstellbar wäre, dass MAGED2 durch die intrauterine Hypoxie und den damit verbundenen intrazellulären Stress eine wichtigere Rolle einnimmt als in einer postnatalen Niere (Hinkelbein et al. 2015). Aufgrund des extrem frühen Beginns des Polyhydramnions ist auch eine weitere Forschung zur Rolle der Plazenta denkbar. Die Plazenta produziert gerade in der frühen Schwangerschaft, bei noch nicht funktionsfähigen Nieren, das Fruchtwasser. Da die Plazenta aus fetalem Gewebe besteht, sind auch Pathologien in der Plazenta denkbar (Moore et al. 2011). Hier könnte auch NHE3 wiederum eine Rolle spielen.

Auch NHE3 sollte weiterhin im Interesse der MAGED2-Forschung stehen. Weiterführende Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene und mögliche Einflüsse auf die Funktion von NHE3 sind notwendig, um abschließend einen Einfluss von MAGED2 auf NHE3 zu klären. Eine mögliche Beeinflussung von NHE3 könnte auch durch cAMP oder das Chaperon Hsp40 vermittelt werden.

Methodisch sollten stabile Zelllinien erzeugt werden, die mithilfe von CRISPR/Cas9 endogen MAGED2 und NHE3 in hohem Maße produzieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die bereits bekannten Einflüsse von MAGED2 auf die Expression und die Oberflächenintegration spezifisch und nicht universell sind. Bei Experimenten, die diesen Einfluss von MAGED2 auf andere Proteine überprüfen, kann NHE3 als Negativkontrolle dienen.

---

## 6. Zusammenfassung

Das transiente antenatale Bartter-Syndrom (taBS, OMIM # 300971) ist eine seltene X-chromosomal vererbte Erkrankung, die durch fetale Polyurie, Polyhydramnion, Frühgeburtlichkeit und transienten postnatalen renalen Salzverlust charakterisiert ist. Verantwortlich sind Mutationen des *Maged2*-Gens, welches einen Einfluss auf die posttranslationale Modifikation von Kanalproteinen im distalen Tubulus hat. Laghmani et al. konnten zeigen, dass NKCC2 und NCC in ihrer Expression durch mutiertes MAGED2 verringert werden. Grund hierfür scheint könnte eine gestörte Interaktion zwischen MAGED2 und dem Chaperon Hsp40, welches für die effiziente Faltung von NKCC2 und NCC notwendig ist, sein (Laghmani et al. 2016). Der extreme Phenotyp lässt vermuten, dass auch weitere Kanalproteine betroffen sind.

NHE3 ist ein Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter, der maßgeblich für die Na<sup>+</sup>-Rückresorption im proximalen Tubulus verantwortlich ist. MAGED2 wird im proximalen Tubulus jedoch nur im Fetus exprimiert. Die Regulation von NHE3 ist noch nicht gut verstanden. Eine verminderte Aktivität würde infolge verminderter Salzurückresorption mit verminderter Harnkonzentrierung einhergehen. Ziel dieser Arbeit ist, einen etwaigen Einfluss von MAGED2 auf NHE3 zu überprüfen.

Hierzu wurden HEK293-Zellen mit NHE3 und MAGED2 (Wildtyp und Mutante) transfiziert. Mittels SDS-PAGE und Western Blot-Analysen wurden die Proteine über ihre Tags, ihrer Größe entsprechend, identifiziert. Zur Ermittlung einer MAGED2-vermittelten Expression von NHE3 wurden Zellen mit steigenden Dosen MAGED2 (WT und MT) transfiziert. Analysiert wurde die Proteinhalbwertszeit durch Hemmung der Proteinsynthese mittels Cycloheximid (CC) in MAGED2 überexprimierten und knock-down Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Mittels Koimmunpräzipitation (CoIP) wurde nach Protein-Proteininteraktionen gesucht. Eine räumliche Nähe wurde mittels Proximity Ligation Assay (PLA) untersucht. Um die Zelloberflächenintegration zu beurteilen wurden die Zellen mit Biotin behandelt, über welches die Membranproteinfraktion isoliert werden konnte (CSB).

Die Ergebnisse der CoIP und PLA entsprachen sich und deuten darauf hin, dass NHE3 und MAGED2 (WT und MT) einen Komplex bilden. In den CC-Versuchen konnten keine MAGED2 vermittelten Unterschiede in der Halbwertszeit von NHE3 gezeigt werden. Die Dose Response-Versuche zeigten keine Veränderung der intrazellulären NHE3-Mengen abhängig von MAGED2. Auch in der CSB zeigte sich keine verringerte Integration von NHE3 in den mit der MAGED2-Mutante transfizierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp.

Wir konnten mit diesen Versuchen zeigen, dass NHE3 mit MAGED2 einen Komplex bildet und eventuell über andere Proteine miteinander interagiert. Anders als bei NCC und NKCC2, hat MAGED2 jedoch scheinbar keinen Einfluss auf die Proteinstabilität, Zelloberflächenintegration von NHE3 oder auf die Gesamt-NHE3-Proteinmenge. NHE3 könnte jedoch in seiner Funktion eingeschränkt sein. Weitere Untersuchungen sollten dies in Betracht ziehen. NHE3 kann bei MAGED2 Versuchen als negative Kontrolle dienen.

## 7. Summary

The transient antenatal Bartters-Syndrome (taBS) is a rare, x-chromosomal genetic disease, which presents with polyuria, polyhydramnios, prematurity and transient postnatal salt wasting. Mutations of *Maged2* were found to be responsible for the phenotype, most likely, by influencing the posttranslational modification of ion channel proteins in the distal kidney tubule. Laghmani et al. were able to show, that NKCC2- and NCC-expression was lowered in the presence of mutant MAGED2. This might be due to an altered interaction of MAGED2, Hsp40 and Gs- $\alpha$ . The severe phenotype suggests, that other ion channel proteins might be affected as well.

NHE3 is a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-antiporter, which is responsible for most of the Na<sup>+</sup>-reabsorption in the proximal tubule. However, MAGED2 is expressed in the proximal tubule only during the fetal period. NHE3 regulation is not well known. A lowered activity would present in lower urine concentration. The aim of this study is to find an influence of MAGED2 on NHE3.

HEK293-cells were transfected with NHE3 and MAGED2 (wildtype and mutant). For analyzing the effect of MAGED2 on NHE3 protein stability cycloheximide chase (CC) experiments were performed, where protein synthesis was inhibited with cycloheximide in MAGED2 overexpressing cells, as well as MAGED2-knock-down cells, at different timepoints. The influence of MAGED2 on the expression of NHE3 was investigated by co-transfecting NHE3 with increasing doses of MAGED2 (WT and MT). The effect of MAGED2 on the cell surface integration of NHE3 was examined using cell surface biotinylation (CSB) studies.

The results of the CoIP and PLA corresponded with one another and showed, that NHE3 and MAGED2 (WT and MT) may co-exist in a protein complex. In the CC, MAGED2 related changes in the halftime of NHE3 could not be observed. The dose response experiments showed no influence of MAGED2 on the levels of intracellular NHE3. Also the CSB could not show any changes in the cell surface integration of NHE3, when transfected with MAGED2 (WT or MT).

We were able to show, that MAGED2 and NHE3 form a complex at some point in the cell and might be interacting through other proteins. Other than NCC and NKCC2, MAGED2 does not seem to have an influence on protein expression, protein stability and cell surface integration of NHE3.

These studies however do not rule out the possibility that MAGED2 may influence NHE3 function. Further functional studies are required to study the effects of MAGED2 on NHE3 channel function. So far NHE3 can be used as a negative control in MAGED2-based experiments.

## 8. Anhang

### 8.1. Literaturverzeichnis

Alexander, R. Todd; Grinstein, Sergio (2009): Tethering, recycling and activation of the epithelial sodium-proton exchanger, NHE3. In: *The Journal of experimental biology* 212 (Pt 11), S. 1630–1637. DOI: 10.1242/jeb.027375.

Aumüller, Gerhard; Aust, Gabriela; Engele, Jürgen; Kirsch, Joachim; Maio, Giovanni; Mayerhofer, Artur et al. (2017): Anatomie. 4., aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York, Delhi: Georg Thieme Verlag (Thieme Electronic Book Library). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-005-143674>.

Barat, Bhaswati; Wu, Anna M. (2007): Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. In: *Biomolecular engineering* 24 (3), S. 283–291. DOI: 10.1016/j.bioeng.2007.02.003.

Behrends, Jan C. ((c) 2017): Physiologie. 3.,vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-004-132217>.

Bobulescu, I. Alexandru; Di Sole, Francesca; Moe, Orson W. (2005): Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers: physiology and link to hypertension and organ ischemia. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 14 (5), S. 485–494.

Bobulescu, I. Alexandru; Moe, Orson W. (2006): Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers in renal regulation of acid-base balance. In: *Seminars in nephrology* 26 (5), S. 334–344. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2006.07.001.

Brant, S. R.; Yun, C. H.; Donowitz, M.; Tse, C. M. (1995): Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na<sup>+</sup>/N<sup>+</sup> exchanger isoform, NHE3. In: *The American journal of physiology* 269 (1 Pt 1), C198-206. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.269.1.C198.

Brant, Steven R.; Bernstein, Michael; Wasmuth, John J.; Taylor, Eugene W.; McPherson, John D.; Li, Xiang et al. (1993): Physical and Genetic Mapping of a Human Apical Epithelial Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger (NHE3) Isoform to Chromosome 5p15.3. In: *Genomics* 15 (3), S. 668–672. DOI: 10.1006/geno.1993.1122.

Chomez, P.; Backer, O. de; Bertrand, M.; Plaen, E. de; Boon, T.; Lucas, S. (2001): An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. In: *Cancer research* 61 (14), S. 5544–5551.

- Clark, J. D.; Limbird, L. E. (1991): Na(+)-H+ exchanger subtypes: a predictive review. In: *The American journal of physiology* 261 (6 Pt 1), C945-53. DOI: 10.1152/ajpcell.1991.261.6.C945.
- Cunha, Tamara da Silva; Heilberg, Ita Pfeferman (2018): Bartter syndrome: causes, diagnosis, and treatment. In: *International journal of nephrology and renovascular disease* 11, S. 291–301. DOI: 10.2147/IJNRD.S155397.
- Donato, Marcos de; Peters, Sunday O.; Hussain, Tanveer; Rodulfo, Hectorina; Thomas, Bolaji N.; Babar, Masroor E.; Imumorin, Ikhide G. (2017): Molecular evolution of type II MAGE genes from ancestral MAGED2 gene and their phylogenetic resolution of basal mammalian clades. In: *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. DOI: 10.1007/s00335-017-9695-6.
- Donowitz, Mark; Mohan, Sachin; Zhu, Cindy Xinjun; Chen, Tian-E; Lin, Rong; Cha, Boyoung et al. (2009): NHE3 regulatory complexes. In: *The Journal of experimental biology* 212 (Pt 11), S. 1638–1646. DOI: 10.1242/jeb.028605.
- Engels, A.; Gordjani, N.; Nolte, S.; Seyberth, H. W. (1991): Angeborene passagere hyperprostaglandinurische Tubulopathie bei zwei frühgeborenen Geschwistern. In: *Mtschr Kinderheilk* (139), S. 185.
- Espantman, Kristen C.; O'Shea, Clodagh C. (2010): aMAGEing new players enter the RING to promote ubiquitylation. In: *Molecular cell* 39 (6), S. 835–837. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.006.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *The Journal of general virology* 36 (1), S. 59–74. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Grinstein, Sergio; Rotin, Daniela; Mason, Michael J. (1989): Na+/H+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 988 (1), S. 73–97. DOI: 10.1016/0304-4157(89)90004-X.
- Hinkelbein, Jochen; Bohm, Lennert; Spelten, Oliver; Sander, David; Soltesz, Stefan; Braunecker, Stefan (2015): Hyperoxia-Induced Protein Alterations in Renal Rat Tissue: A Quantitative Proteomic Approach to Identify Hyperoxia-Induced Effects in Cellular Signaling Pathways. In: *Disease markers* 2015, S. 964263. DOI: 10.1155/2015/964263.

Hu, Ming Chang; Di Sole, Francesca; Zhang, Jianning; McLeroy, Paul; Moe, Orson W. (2013): Chronic regulation of the renal Na(+)/H(+) exchanger NHE3 by dopamine: translational and posttranslational mechanisms. In: *American journal of physiology. Renal physiology* 304 (9), F1169-80. DOI: 10.1152/ajprenal.00630.2012.

Karim, Zoubida; Gérard, Bénédicte; Bakouh, Naziha; Alili, Rohia; Leroy, Christine; Beck, Laurent et al. (2008): NHERF1 mutations and responsiveness of renal parathyroid hormone. In: *The New England journal of medicine* 359 (11), S. 1128–1135. DOI: 10.1056/NEJMoa0802836.

Kömhoff, Martin; Laghmani, Kamel (2017): Pathophysiology of antenatal Bartter's syndrome. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 26 (5), S. 419–425. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000346.

Kömhoff, Martin; Laghmani, Kamel (2018): MAGED2: a novel form of antenatal Bartter's syndrome. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 27 (4), S. 323–328. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000422.

Laghmani, Kamel; Beck, Bodo B.; Yang, Sung-Sen; Seaayfan, Elie; Wenzel, Andrea; Reusch, Bjorn et al. (2016): Polyhydramnios, Transient Antenatal Bartter's Syndrome, and MAGED2 Mutations. In: *The New England journal of medicine* 374 (19), S. 1853–1863. DOI: 10.1056/NEJMoa1507629.

Langnaese, K.; Kloos, D. U.; Wehnert, M.; Seidel, B.; Wieacker, P. (2001): Expression pattern and further characterization of human MAGED2 and identification of rodent orthologues. In: *Cytogenetics and cell genetics* 94 (3-4), S. 233–240. DOI: 10.1159/000048822.

Lee, Anna K.; Potts, Patrick Ryan (2017): A Comprehensive Guide to the MAGE Family of Ubiquitin Ligases. In: *Journal of molecular biology* 429 (8), S. 1114–1142. DOI: 10.1016/j.jmb.2017.03.005.

Lee, Jae Wook; Chou, Chung-Lin; Knepper, Mark A. (2015): Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 26 (11), S. 2669–2677. DOI: 10.1681/ASN.2014111067.

Legrand, Anne; Treard, Cyrielle; Roncelin, Isabelle; Dreux, Sophie; Bertholet-Thomas, Aurelia; Broux, Françoise et al. (2018): Prevalence of Novel MAGED2 Mutations in

**Anhang**

---

Antenatal Bartter Syndrome. In: *Clinical journal of the American Society of Nephrology* : *CJASN* 13 (2), S. 242–250. DOI: 10.2215/CJN.05670517.

Lentze, Michael J. (Hg.) (2001): Pädiatrie. Grundlagen und Praxis : mit 482 Tabellen. Berlin: Springer.

Lonez, Caroline; Vandenbranden, Michel; Ruyschaert, Jean-Marie (2012): Cationic lipids activate intracellular signaling pathways. In: *Advanced drug delivery reviews* 64 (15), S. 1749–1758. DOI: 10.1016/j.addr.2012.05.009.

Lucas, S.; Brasseur, F.; Boon, T. (1999): A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. In: *Cancer research* 59 (16), S. 4100–4103.

Moore, Keith L.; Persaud, Trivedi V. N.; Viebahn, Christoph (2011): Embryologie. Entwicklungsstadien, Frühentwicklung, Organogenese, Klinik. 5. Aufl., [Nachdr.]. München: Elsevier Urban & Fischer.

Murer, H.; Hopper, U.; Kinne, R. (1976): Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. In: *Biochemical Journal* 154 (3), S. 597–604.

Nakamura, Norihiro; Tanaka, Shingo; Teko, Yoshinori; Mitsui, Keiji; Kanazawa, Hiroshi (2005): Four Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms are distributed to Golgi and post-Golgi compartments and are involved in organelle pH regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (2), S. 1561–1572. DOI: 10.1074/jbc.M410041200.

Orlowski, J.; Grinstein, S. (2004): Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. In: *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 447 (5). DOI: 10.1007/s00424-003-1110-3.

Pape, Hans-Christian; Klinke, Rainer; Brenner, Bernhard; Silbernagl, Stefan (2014): Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-98019>.

Pirlot, Céline; Thiry, Marc; Trussart, Charlotte; Di Valentin, Emmanuel; Piette, Jacques; Habraken, Yvette (2016): Melanoma antigen-D2: A nucleolar protein undergoing delocalization during cell cycle and after cellular stress. In: *Biochimica et biophysica acta* 1863 (4), S. 581–595. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2015.12.010.

- Renigunta, Aparna; Mutig, Kerim; Rottermann, Kathrin; Schlichthörl, Günter; Preisig-Müller, Regina; Daut, Jürgen et al. (2011): The glycolytic enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and enolase interact with the renal epithelial K<sup>+</sup> channel ROMK2 and regulate its function. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 28 (4), S. 663–672. DOI: 10.1159/000335761.
- Schrier, Robert W. (2017): *Renal and Electrolyte Disorders*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5568222>.
- Seyberth, Hannsjörg W.; Weber, Stefanie; Kömhoff, Martin (2017): Bartter's and Gitelman's syndrome. In: *Current opinion in pediatrics* 29 (2), S. 179–186. DOI: 10.1097/MOP.0000000000000447.
- Shaw, Gerry; Morse, Silas; Ararat, Miguel; Graham, Frank L. (2002): Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (8), S. 869–871. DOI: 10.1096/fj.01-0995fje.
- Silbernagl, Stefan; Despopoulos, Agamemnon; Gay, Rüdiger; Rothenburger, Astrid (2007): *Taschenatlas Physiologie*. 7., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Thomas, Philip; Smart, Trevor G. (2005): HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 51 (3), S. 187–200. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.08.014.
- Tosteson, D. C.; Hoffmann, J. F. (1960): Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. In: *The Journal of general physiology* 44, S. 169–194.
- Trussart, Charlotte; Pirlot, Céline; Di Valentin, Emmanuel; Piette, Jacques; Habraken, Yvette (2018): Melanoma antigen-D2 controls cell cycle progression and modulates the DNA damage response. In: *Biochemical pharmacology*. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.035.
- Tse, C. M.; Brant, S. R.; Walker, M. S.; Pouyssegur, J.; Donowitz, M. (1992): Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform (NHE-3). In: *The Journal of biological chemistry* 267 (13), S. 9340–9346.

**Anhang**

---

Valiño-Rivas, Lara; Cuarental, Leticia; Agustin, Mateo; Husi, Holger; Cannata-Ortiz, Pablo; Sanz, Ana B. et al. (2018): MAGE genes in the kidney: identification of MAGED2 as upregulated during kidney injury and in stressed tubular cells. In: *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. DOI: 10.1093/ndt/gfy367.

Watanabe, Sumiyo; Ogasawara, Toru; Tamura, Yoshifuru; Saito, Taku; Ikeda, Toshiyuki; Suzuki, Nobuchika et al. (2017): Targeting gene expression to specific cells of kidney tubules in vivo, using adenoviral promoter fragments. In: *PLoS ONE* 12 (3). DOI: 10.1371/journal.pone.0168638.

## 8.2. Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Stefanie Weber und meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Kömhoff für die Möglichkeit meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen. Es war ein spannender, herausfordernder und manchmal harter Weg als erster Doktorand in ein neues Labor zu kommen, aber ich hätte es nirgendwo anders erleben wollen.

Mein weiterer Dank gilt Dr. Aparna Renigunta für die Betreuung und das häufige Korrekturlesen jedes Abschnitts meiner Arbeit. Außerdem Dr. Elie Seaayfan, der mir die Grundlagen der Fehleranalyse in Fleisch und Blut hat übergehen lassen und seine Schritt-für-Schritt-Begleitung der vielfältigen Versuche.

Die Arbeitsgruppe besteht zu dem aus den immer unterstützenden Nadine Schallopp und Tom Herrmann, die sich unermüdlich gekümmert und aufgebaut haben, auch wenn die Lage manchmal aussichtslos war. Ebenfalls danke ich meinen Mit-Doktoranden Jana Hoffmann und Josch Richter, sowie unserer biologischen Masterkollegin Anna Zimmermann für den Zusammenhalt, das Aushelfen bei der Zellpflege oder der gemeinsamen Zeit an Wochenenden und am Abend.

Außerdem danke ich meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für all die Unterstützung, das ständige Antreiben diese Arbeit fertig zu stellen und für die Möglichkeiten mein Studium und die Dissertation durchzuführen. Es ist ein Privileg, das nur wenigen Menschen zuteilwird, weshalb ich meiner Dankbarkeit hier ausdrückverleihen möchte.

Last but not least danke ich meiner Freundin, Feline Schelhammer, für ihre Motivation im richtigen Moment und Aufmunterung an Tagen, an welchen ich bereits aufgegeben hatte.

### 8.3. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Bartsch, Becker, Becker, Cetin, Czubayko, Daut, Dettmeyer, Feuser, Fritz, Geraedts, Gress, Hertl, Hofmann, Hoyer, Kinscherf, Kircher, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Moll, Neubauer, Neumüller, Nimsky, Oberwinkler, Oliver, Opitz, Pagenstecher, Peterlein, Rastan, Renz, Richter, Ruchholz, Sahmland, Schieffer, Schneider, Schratt, Seitz, Sekundo, Stuck, Thieme, Timmermann, Timmesfeld, Vogelmeier, Wagner, Weber, Weihe, Worzfeld, Wrocklage, Wulf.

### 8.4. Tabellarischer Lebenslauf

### 8.5. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss von MAGED2 auf NHE3 in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293)“ in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin II unter Leitung von Frau Prof. Dr. Stefanie Weber mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Martin Kömhoff ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Vorliegende Arbeit wurde auf der Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Nephrologie am 29.03.2019 als Poster präsentiert und wird in folgenden Publikationsorganen „Journal of Biological Chemistry“ veröffentlicht.

---

Ort, Datum, Doktorand

Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.

---

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent