

Aus dem Biomedizinischen Centrum  
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
Institut der Universität München  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Markus Sperandio



## **Uromodulin als Modulator von Entzündungen**

### **Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Tobias Steffen  
aus  
Los Angeles, USA

2022



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Markus Sperandio

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. Sabine Steffens  
PD Dr. med. Konstantin Stark

**Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin:** Dr. rer. nat. Monika Prünster

**Dekan:** Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 23.06.2022



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	7
Abstract (English).....	9
Abbildungsverzeichnis .....	11
Tabellenverzeichnis .....	13
Abkürzungsverzeichnis .....	15
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Leukozyten und ihr Stellenwert in Entzündungsreaktionen .....</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade.....</b>	<b>20</b>
1.2.1 Capture und Rolling .....	23
1.2.2 Aktivierung und Adhäsion .....	25
1.2.3 Crawling und Transmigration .....	26
<b>1.3 Uromodulin.....</b>	<b>29</b>
<b>2 Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>35</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Genehmigung der Versuche.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Methoden und Modelle.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Versuchstiere.....	37
3.2.2 Chirurgische Verfahren.....	37
3.2.3 Intravitalmikroskopie (IVM).....	41
3.2.4 Hellfeldmikroskopie.....	42
3.2.5 Analyse der Mausemstermuskel-Versuche.....	43
3.2.6 Mausmodell für eine akute Peritonitis .....	45
3.2.7 Ermittlung der Permeabilität von Endothelzellverbänden <i>in vitro</i> .....	45
3.2.8 Durchflusszytometrie .....	48
<b>3.3 Statistik .....</b>	<b>50</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Der Einfluss von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> .....</b>	<b>51</b>
4.1.1 Die Wirkung von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> im Mausemstermuskelmodell.....	51
4.1.2 Die Wirkung von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> im Peritonitis-Modell .....	53
4.1.3 Systemische Leukozytenzahl und hämodynamische und mikrovaskuläre Parameter .....	55
<b>4.2 Der Einfluss von Uromodulin auf Adhäsions-relevante Oberflächenmoleküle von Endothelzellen und Leukozyten <i>in vitro</i>.....</b>	<b>55</b>
4.2.1 Die Wirkung von Uromodulin auf die Expression endothelialer, für die Transmigration relevanter Oberflächenmoleküle .....	56
4.2.2 $\beta$ 2-Integrin-Aktivierungsassay.....	56
<b>4.3 Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität <i>in vitro</i>.....</b>	<b>59</b>
4.3.1 Ermittlung der Permeabilität von Endothelzellverbänden <i>in vitro</i> (Transwell Migrationsassay).....	59
<b>4.4 Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität <i>in vivo</i>.....</b>	<b>60</b>
4.4.1 Ermittlung der mikrovaskulären Endothelpermeabilität <i>in vivo</i> mittels FITC-Dextran .....	60
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1 Zusammenfassung.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2 Diskussion der Methoden .....</b>	<b>64</b>

<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
5.3.1	Der Einfluss von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> .....	67
5.3.2	Der Einfluss von Uromodulin auf Adhäsions-relevante Oberflächenmoleküle von Endothelzellen und Leukozyten <i>in vitro</i> .....	69
5.3.3	Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	73
5.3.4	Erklärungsmodelle für die immunmodulatorische Wirkung von Uromodulin.....	74
5.3.5	Schlussfolgerung - Die Rolle von Uromodulin im Kontext dieser Arbeit.....	77
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Anhang A: Ergebnisse von Kooperationspartnern .....</b>	<b>87</b>
7.1	Die Wirkung von murinem Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> im Mauskremastermuskellmodell .....	87
7.2	Die Wirkung von Uromodulin auf gewebsständige Makrophagen.....	89
7.3	Die gemeinsame Wirkung von Uromodulin und TNF- $\alpha$ auf die Leukozytenrekrutierung <i>in vivo</i> im Mauskremastermuskellmodell .....	91
7.4	Die Wirkung von Uromodulin auf den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER = Transendothelial electrical resistance measurement).....	93
<b>8</b>	<b>Anhang B: Ergänzende Abbildungen .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Affidavit.....</b>	<b>99</b>
<b>11</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>101</b>

# Zusammenfassung

Uromodulin (UMOD) ist ein Glykoprotein, welches von Tubulusepithelzellen gebildet und in den Urin sezerniert wird. Im Tubuluslumen polymerisiert das Uromodulin (pUMOD), wo es dann unter anderem als protektiver Faktor gegen bakterielle Infektionen oder Nierensteinbildung wirksam wird sowie den Elektrolyttransport reguliert. Interessanterweise wird Uromodulin in geringeren Mengen zudem nach basolateral in das Nierenparenchym sezerniert. Das basolateral sezernierte Uromodulin wird in den Blutkreislauf transportiert und zirkuliert darin als Monomer (mUMOD), durch das es seine systemischen homöostatischen Funktionen ausübt. Im Rahmen pathologischer Zustände kann das pUMOD akkumulieren und aus dem Tubuluslumen in das extratubuläre Gewebe gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit von extratubulärem pUMOD untersucht als ein damage associated molecular pattern (DAMP)-Molekül zu wirken und auf diese Weise eine lokale Entzündungsreaktion anzustoßen.

Um eine mögliche Rolle von pUMOD bei der Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten *in vivo* näher zu erforschen, untersuchten wir mittels Intravitalmikroskopie und Giemsa-Färbung postkapilläre Venolen in Uromodulin-stimulierten Kremastermuskeln von C57BL/6 Wildtyp (WT)-Mäusen. Zusätzlich führten wir *in vitro*-Assays durch, um gezielt eine Wirkung von Uromodulin auf die Aktivierung von Endothelzellen und isolierten neutrophilen Granulozyten voneinander differenzieren zu können.

In unseren *in vivo*-Versuchen konnten wir zeigen, dass sowohl intraskrotal als auch intraperitoneal appliziertes pUMOD zu einer erhöhten Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe führte. Darüber hinaus fanden wir eine durch pUMOD vermittelte TNF- $\alpha$ -Sekretion durch F4/80-positive Makrophagen. Allerdings konnten wir zeigen, dass pUMOD die endotheliale Permeabilität und die Leukozytenrekrutierung auch unabhängig von den durch TNF- $\alpha$ -vermittelten Effekten direkt beeinflusste. Überraschenderweise zeigte sich in *in vitro*-Experimenten, dass Uromodulin keine direkte Hochregulierung adhäsionsrelevanter Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen zur Folge hatte und keine direkte Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten bewirkte.

Diese Ergebnisse werden von folgenden ergänzenden Daten unterstützt, welche im Rahmen dieses Projekts entstanden sind. In diesen Experimenten konnten unsere Kooperationspartner eine Akkumulation von Uromodulin im extratubulären Interstitium

in Nieren eines murinen neonatalen unilateralen Ureterobstruktionsmodells (murine neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO) model) nachweisen, begleitet von Leukozyteninfiltration und Tubulusatrophie. Passend dazu konnten sie in Nieren von Patienten mit Nephritiden eine extratubuläre Ablagerung von Uromodulin mit begleitenden Leukozyteninfiltraten beobachten.

Zusammengenommen konnten wir mit unseren Experimenten die bedeutende Rolle von extratubulärem polymerisiertem Uromodulin bei der Aktivierung der Leukozytenrekrutierung *in vivo* zeigen, indem es den Arrest und die Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe unterstützt.

Diese Erkenntnisse untermauern die Annahme, dass Uromodulin Entzündungsprozesse moduliert und dabei eine entscheidende Funktion in der Immunantwort im Rahmen zahlreicher nephrologischer Erkrankungen einnehmen könnte.

## Abstract (English)

Uromodulin (UMOD) is a glycoprotein produced by tubular epithelial cells and secreted into the tubular lumen where it polymerizes (pUMOD) and takes part in a variety of kidney functions like protection from bacterial infections and stone formation and regulation of the renal salt transport. In smaller amounts, uromodulin is also secreted basolaterally from the tubular epithelium into the renal parenchyma and transported into the bloodstream, where it circulates as a monomer (mUMOD) through which it exerts its systemic homeostatic functions. In the context of pathological conditions, pUMOD can accumulate and move from the tubular lumen into the extratubular tissue. In the present work, we investigated the ability of extratubular pUMOD to act as a damage associated molecular pattern (DAMP) molecule and thus trigger a local inflammatory response.

In order to evaluate a potential role of pUMOD on neutrophil activation and on neutrophil recruitment *in vivo*, we used intravital microscopy and Giemsa staining of Uromodulin stimulated cremaster muscle venules of C57BL/6 wild type (WT) mice. In addition, we performed *in vitro* assays to investigate any influence of uromodulin on the activation status of endothelial cells and isolated neutrophils. Our *in vivo* results showed that both intrascrotal and intraperitoneal application of pUMOD led to an elevated extravasation of leukocytes into inflamed tissue. In addition, we found a pUMOD triggered TNF- $\alpha$  secretion by F4/80 positive macrophages. Nevertheless, we could show that pUMOD directly influenced endothelial permeability and leukocyte recruitment regardless of the effects mediated by TNF- $\alpha$ . Surprisingly, *in vitro* experiments showed that pUMOD did not directly lead to an upregulation of adhesion-related endothelial surface molecules or an activation of  $\beta$ 2 integrins on neutrophils.

These results are supported by the following supplementary experiments that evolved from the initial project. Our collaboration partner found an accumulation of uromodulin in the extratubular interstitium in kidneys of a neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO) model accompanied by leukocyte infiltration and atrophic tubules. In kidneys of patients with nephritides, they observed extratubular uromodulin accumulation together with leukocyte infiltrates.

Taken together, our experiments demonstrated the important role of extratubular polymerized uromodulin in activating leukocyte recruitment *in vivo* by supporting leukocyte arrest and extravasation into inflamed tissue. Our findings support the idea that uromodulin modulates inflammatory processes and may thereby play a decisive part in the immune response in numerous nephrological diseases.



# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Leukozytenrekrutierungskaskade.....	21
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Intravitalmikroskopie (IVM) des murinen Kremastermuskels .....	42
Abbildung 3: Migrationsassay .....	47
Abbildung 4: Uromodulin-induzierte Leukozytenrekrutierung in der murinen Mikrozirkulation .....	54
Abbildung 5: Uromodulin induziert keine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen und führt nicht zur $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten. ....	58
Abbildung 6: Uromodulin erleichtert die Transmigration neutrophiler Granulozyten über einen HUVEC-Monolayer und erhöht die vaskuläre Permeabilität in vitro und in vivo .....	61
Abbildung 7: Intraskrotal appliziertes murines polymerisiertes Uromodulin (murines pUMOD) induziert eine mit humanem pUMOD vergleichbare akute Entzündungsreaktion in der murinen Mikrozirkulation in vivo .....	88
Abbildung 8: Uromodulin induziert eine TNF- $\alpha$ -Expression in F4/80-positiven Makrophagen im Kremastermuskel in vivo .....	90
Abbildung 9: Eine intraskrotale Applikation von Uromodulin verstärkt die Effekte von TNF-a im Mauskremastermuskel-Modell in vivo .....	92
Abbildung 10: Uromodulin erhöht die vaskuläre Permeabilität in vitro .....	94
Abbildung 11: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Mikrofotografien humanen und murinen Uromodulins .....	95
Abbildung 12: Uromodulin hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von $\beta$ 2-Integrinen auf humanen neutrophilen Granulozyten .....	95



# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen .....	55
Tabelle 2: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen .....	89
Tabelle 3: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen .....	93



# Abkürzungsverzeichnis

ADTKD	Autosomal-dominanten tubulointerstitielle Nierenerkrankungen
AKI	Acute kidney injury (= akute Nierenverletzung)
ANOVA	Analysis of variance (= Varianzanalyse)
BSA	Bovines Serumalbumin
CAMs	Cell adhesion molecules (Zelladhäsionsmoleküle)
CD	Cluster of differentiation
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	CXC chemokine receptors
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECIS	Electric Cell-Substrate Impedance Sensing
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (= Ethylendiamintetraessigsäure)
ESAM	Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule
ESL-1	E-selectin ligand-1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPCR	G protein-coupled receptor
GWAS	Genome-wide association study
hALB	Humanalbumin
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
hFc	human Fc fragment
HSC	Hematopoietic stem cell
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
HWI	Harnwegsinfekt
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.s.	intraskrotal
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
JAMs	Junctional adhesion molecules
KC	Keratinocyte-derived chemokine
LFA-1	Leukocyte function-associated antigen-1
LIX	Lipopolysaccharide-induced CXC chemokine
LPAM	Lymphocyte Peyer patch adhesion molecule
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
mAb	Monoclonal Antibody
Mac-1	Macrophage-1 antigen
mALB	Mausalbumin
MFI	Mean fluorescence intensity
mUMOD	monomeres Uromodulin
MW	Mittelwerte
NA	Numerische Apertur
NF-kB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NGS	normal goat serum
NKCC2	Na-K-2Cl-Cotransporter
NLRP3	„NLR family pyrin domain containing 3“, auch bekannt als “NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3“
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphonuclear leukocytes
PNAd	Peripheral node addressin
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
pUMOD	polymerisiertes Uromodulin
RFF	Rolling Flux Fraction
rh	rekombinant human
RhoA	Ras homolog family member A
rm	rekombinant murin

ROI	Region of interest
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium (K) channel
SEM	Standard error of the mean (= Standardfehler des Mittelwerts)
TAL	Thick ascending limb (= dicker aufsteigender Schenkel der Henle-Schleife)
TEER	Transepithelial/Transendothelial Electrical Resistance
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRPM	Transient receptor potential melastatin
UMOD	Uromodulin
UUO	Unilateral Ureteral Ostruction
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VLA4	Very late antigen 4
WBC	White blood cells
WT	Wildtyp



# 1 Einleitung

## 1.1 Leukozyten und ihr Stellenwert in Entzündungsreaktionen

Das weitverzweigte und den gesamten menschlichen Körper durchdringende System aus Blutgefäßen stellt Kompartiment und Interaktionsfläche mit nahezu allen menschlichen Geweben für das Blut beziehungsweise dessen Bestandteile dar [1].

Das menschliche Blut besteht bekanntermaßen aus verschiedensten Bestandteilen und hat damit einhergehend die unterschiedlichsten Funktionen inne. Unter den im Blut enthaltenen Zellen (Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten), welche alle aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) hervorgehen, besitzen die Leukozyten eine herausragende Stellung bei der körpereigenen Immunabwehr [2].

Leukozyten können anhand morphologischer und funktioneller Gesichtspunkte, aber auch über verschiedene Oberflächenmoleküle in Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten unterschieden werden. Darüber hinaus ließe sich eine noch detailliertere Differenzierung der einzelnen Leukozytenspezies vornehmen [3, 4].

Allgemein gesprochen besteht die Aufgabe der Leukozyten darin, in den Körper eingedrungenes fremdes Material abzuwehren und zu entsorgen. So nehmen Leukozyten ihre Abwehrfunktion wahr, wenn sich beispielsweise Bakterien oder körperfremdes Transplantationsgewebe im Körper befinden beziehungsweise haben eine Entsorgungsfunktion, wenn abgestorbene oder entartete Körperzellen erkannt werden [5]. Damit die Leukozyten diese Aufgaben wahrnehmen und effizient wirken können, müssen sie aus dem Blutstrom und damit aus dem Gefäßsystem in den Extravasalraum auswandern (Extravasation) [6].

Betrachtet man die Funktionsweise des Immunsystems, lässt sich eine angeborene von einer erworbenen Immunantwort unterscheiden.

Die **angeborenen Immunabwehr** umfasst unter anderem Phagozyten (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen), basophile und eosinophile Granulozyten und Mastzellen beziehungsweise die von diesen Zellen freigesetzten Entzündungsmediatoren, sowie natürliche Killerzellen. Darüber hinaus wirken das Komplementsystem, Akute-Phase-Proteine und Zytokine (z.B. Interleukine, Interferone) bei der angeborenen Immunabwehr mit.

Bei der *erworbenen Immunabwehr* führt die Bindung von B- und T-Zell-Rezeptoren an jeweils passende Antigene zu einer Bildung und Proliferation von Antigen-spezifischen B- und T-Lymphozyten. Diese Antigene werden den Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen dargeboten. Die aktivierten B-Lymphozyten bilden daraufhin Immunglobuline, die zur Eliminierung der eingedrungenen Krankheitserreger führen. T-Lymphozyten können unter anderem B-Lymphozyten bei der Immunglobulin-Produktion unterstützen, durch die Aktivierung von Makrophagen intrazelluläre Erreger bekämpfen und zudem von Viren befallene Zellen eigenständig eliminieren [3].

Die angeborene Immunabwehr ist genetisch stark konserviert und reagiert auf häufig vorkommende Bestandteile von Infektionserregern. Die erworbene Immunabwehr hingegen kann mit durch genetische Rekombination entstandenen Antikörpern Infektionserreger gezielt bekämpfen und verbessert ihre Abwehrreaktion bei wiederholter Auseinandersetzung mit einem Infektionserreger durch die Bildung langlebiger Gedächtniszellen.

Trotz der beschriebenen Einteilung in angeboren und erworben, sind die verschiedenen Komponenten der Immunabwehr eng miteinander verwoben und dürfen keineswegs als voneinander getrennte Systeme betrachtet werden [5].

## 1.2 Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade

Findet in unserem Körper eine Immunreaktion statt, so laufen unzählige Vorgänge parallel ab. Unter anderem werden Leukozyten zu dem Entzündungsherd rekrutiert, um vor Ort bei der Immunreaktion mitzuwirken [3].

Der Vorgang der Leukozytenrekrutierung wurde in der Vergangenheit bereits intensiv beforscht [7]. Daher ist die Rolle von neutrophilen Granulozyten in Entzündungsreaktionen gut untersucht [8].

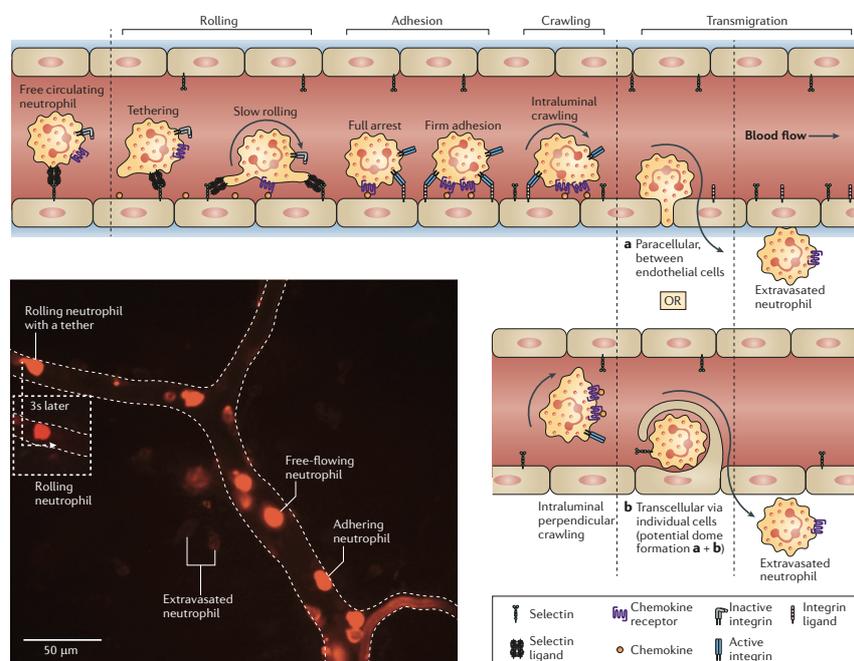
Typischerweise sind die neutrophilen Granulozyten die ersten Immunzellen, welche die Entzündungsstelle erreichen und dominieren zusammen mit ortsständigen Gewebemakrophagen das Bild von Immunzellen während der frühen Entzündungsreaktion [9, 10].

Granulozyten werden auch als polymorphonukleäre Zellen (PMN) bezeichnet, wobei diese Bezeichnung synonym für die neutrophilen Granulozyten verwendet wird. Beim Menschen stellen die neutrophilen Granulozyten mit 50-70% die prozentual größte Gruppe unter den im Blutkreislauf zirkulierenden Leukozyten dar [11, 12]. Sie sind vor

allem als Abwehrzellen in der frühen Phase vieler Infektionen elementar wichtig, darunter Mykosen, Protozoosen und bakterielle Infektionen [11]. Sie spielen aber auch bei sterilen Entzündungsvorgängen, wie zum Beispiel bei Gewebnekrosen im Zuge eines Infarkts, eine große Rolle [11].

Im Gegensatz zum Menschen, machen bei Mäusen die neutrophilen Granulozyten nur 20-30% der im Blutkreislauf zirkulierenden Leukozyten aus [13].

Die Rekrutierung der anderen Leukozyten-Subpopulationen erfolgt zumeist in ähnlicher Weise wie bei den neutrophilen Granulozyten [14].



**Abbildung 1: Leukozytenrekrutierungskaskade**

Neutrophile Granulozyten wandern kaskadenartig aus dem Gefäßlumen postkapillärer Venolen über das Endothel in das entzündete Gewebe aus. Dabei durchlaufen die Granulozyten das Selektin-abhängigen Tethering und Rollen, gefolgt von den Integrin-abhängigen Schritten der Adhäsion, dem Intraluminal Crawling und schließlich der Transmigration in das perivaskuläre Gewebe, welche auf parazellulärem (a) oder transzellulärem (b) Weg ablaufen kann. Die intravitalmikroskopische Mikrofotografie einer postkapillären Venole mit rot-markierten (Phycoerythrin-Antikörperkonjugat) neutrophilen Granulozyten (LY6G+ Zellen) veranschaulicht die einzelnen Schritte, welche die Leukozyten bei der Rekrutierungskaskade durchlaufen. Zu sehen sind hier die Stadien der freien Zirkulation, des Tetherings, des Rollens und der Adhäsion sowie bereits ausgewanderte Leukozyten (reviewed in [9]).

Dieser bei Entzündungen grundlegende Prozess der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus der Blutbahn zu der Entzündungsstelle erfolgt in einer wohl definierten Kaskade, welche mit dem Selektin-abhängigen Einfangen („capturing“ oder „tethering“)

der Leukozyten beginnt, die daraufhin entlang des entzündeten Endothels rollen („rolling“) [9, 15]. Dieses Rollen findet überwiegend entlang postkapillärer Venolen unter relativ schwachen hämodynamischen Scherkräften statt [14]. Diese initialen Ereignisse führen zu einer intermediären Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen, was eine Verlangsamung des Rollens entlang des Endothels zur Folge hat. Die feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel wird durch die Interaktion von Leukozyten-exprimierten Chemokinrezeptoren mit dem jeweiligen Chemokin, das auf der luminalen Endotheloberfläche exprimiert wird, erreicht. Dieser Schritt bewirkt, gemeinsam mit E-Selektin, die Bindung an PSGL-1 (PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand-1) und die vollständige Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen [16, 17], was schlussendlich zu der festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel führt [18]. Der festen Adhäsion folgen das sogenannte „Leukozyten-Crawling“ (= „Entlangkriechen“ am Endothel), die Extravasation beziehungsweise Transmigration („transmigration“) aus dem Gefäß in das umliegende Gewebe und schließlich die Migration in das entzündete Gewebe, wo die neutrophilen Granulozyten ihrer Abwehrfunktion nachkommen [15].

Munn et al. konnten zeigen, dass der Transmigrationsprozess von Leukozyten in postkapillären Venolen durch Erythrozyten unterstützt werden kann, indem sie sich in den zentralen Schichten der Blutströmung aufhalten und die Leukozyten so zur Gefäßwand drängen und dadurch die Wahrscheinlichkeit einer Leukozyten-Endothel-Interaktion erhöhen [19].

Entgegen früherer Annahmen geht man heute davon aus, dass neutrophile Granulozyten nach Auswandern ins Gewebe, insbesondere in entzündlichem Milieu, mehrere Tage überleben können [8, 20].

Wie Tofts et al. allerdings darlegten, ist diesbezüglich eine kritische Auseinandersetzung erforderlich [21]. Allgemein wird eine zwei- bis dreifach erhöhte Überlebenszeit von neutrophilen Granulozyten im Gewebe gegenüber im Blut befindlichen neutrophilen Granulozyten angenommen [8]. Auf diese Weise können neutrophile Granulozyten länger wirken und komplexere Aufgaben bei der Bekämpfung von Entzündungen übernehmen, gleichzeitig besteht allerdings die Gefahr, dass gesundes umliegendes Gewebe beschädigt wird [9].

Die einzelnen in diesem Abschnitt beschriebenen Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade werden in Abbildung 1 schematisch dargestellt und im Folgenden näher erläutert.

### 1.2.1 Capture und Rolling

Damit der initiale Schritt der Leukozytenrekrutierung, also das Einfangen der vorbeifließenden Leukozyten an der Gefäßwand, stattfinden kann, müssen Veränderungen auf der Endotheloberfläche stattfinden. Diese Veränderungen werden unter anderem direkt über das Erkennen von Pathogenen durch Pattern-Recognition-Rezeptoren oder über Entzündungsmediatoren (z.B. Histamin, Zytokine) hervorgerufen und resultieren in einer gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen [9]. Von besonderer Bedeutung sind in dieser frühen Phase der Rekrutierungskaskade eine bestimmte Familie von Adhäsionsmolekülen, die sogenannten Selektine [22].

Zu der Gruppe der Selektine zählen E-, P-, und L-Selektin, benannt nach den Zelltypen, auf denen die jeweiligen Selektine erstmals entdeckt wurden:

E-Selektin wird auf aktiviertem, sprich entzündetem, Endothel exprimiert, P-Selektin wurde erstmals in Speichergranula ( $\alpha$ -Granula) von Thrombozyten und später auch in Endothelzellen (Weibel-Palade-Körperchen) entdeckt und L-Selektin ist auf den meisten Leukozyten vorhanden [23].

Watson et al. konnten zeigen, dass die DNA-Sequenzen der drei genannten Selektine sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen in einem Gen-Cluster auf Chromosom 1 eng zusammenliegen [24].

**E-Selektin** ist im Gegensatz zu P-Selektinen nicht gespeichert, sondern muss in der Endothelzelle erst neu synthetisiert werden. Eine Ausnahme hiervon stellen die Mikrogefäße der Haut dar, in denen E-Selektin konstitutiv exprimiert wird [25, 26]. Etwa 2-4 Stunden nach Stimulation durch Zytokine wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1 (IL-1) wird E-Selektin auf der Endothelzelloberfläche exprimiert [25-27]. Anschließend wird E-Selektin internalisiert und in Lysosomen abgebaut [28].

**P-Selektin** kann bei Bedarf schnell aus seinen Speichergranula mobilisiert werden, da es sowohl in  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten als auch in Weibel-Palade-Körperchen in Endothelzellen gespeichert wird. So kann P-Selektin bei Fusion der Granula mit der Zellmembran – stimuliert durch Substanzen wie Histamin oder Thrombin - an die Zelloberfläche gebracht werden [26]. Die Mobilisierung von P-Selektin kann auf diese Weise innerhalb von wenigen Minuten stattfinden [9, 29]. Der schnellen Mobilisation folgt ein rascher Abfall der P-Selektin-Expression innerhalb von etwa 20-30 Minuten auf Werte nahe der Basalkonzentration [30]. Zusätzlich können Zytokine wie

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1) eine Neusynthese von P-Selektin innerhalb von etwa 2 Stunden anstoßen [25]. Die Möglichkeit der Hochregulation von P-Selektin via Transkription scheint es unter anderem in Mäusen, nicht aber beim Menschen, zu geben [31, 32]. Anders als E-Selektin, kann P-Selektin “recyclt” werden, da neben dem lysosomalen Abbau die Möglichkeit besteht, nach der Internalisierung wieder in den Speichergranula gespeichert und anschließend erneut verwendet zu werden [28].

**L-Selektin** wird konstitutiv an den Spitzen der Mikrovilli auf den meisten Leukozyten exprimiert [33]. Die Hauptaufgabe von L-Selektin scheint, neben der Rekrutierung zu Entzündungsherden, die Unterstützung des „Lymphozyten-Homing“ in sekundäre lymphatische Organe zu sein [34]. Eine weitere wichtige Funktion ist das über L-Selektin vermittelte sogenannte “secondary leukocyte tethering“ beziehungsweise „secondary leukocyte capture“ (sekundäres Anbinden bzw. Einfangen von Leukozyten), bei dem bereits an der Gefäßwand adhärente Leukozyten vorbeifließende Leukozyten einfangen („capture“) können [35, 36]. Über das sogenannte “Shedding” (“Abspaltung“) kann L-Selektin in kürzester Zeit über proteolytische Spaltung der Ektodomäne herunterreguliert werden [37]. Demzufolge kommt es bei einer Inhibition des “Shedding“ zu einer gesteigerten Adhäsion und Extravastation von Leukozyten [14].

Sowohl das Einfangen („capture“) als auch das Rollen („rolling“) wird im Rahmen von Entzündungen über die Interaktion von Selektinen mit ihren jeweiligen auf Leukozyten exprimierten Liganden vermittelt [38]. Ein wichtiger Bindungspartner für alle drei beschriebenen Selektine ist das Glycoprotein PSGL-1 (= „P-selectin glycoprotein ligand-1“) [39]. PSGL-1 wird überwiegend an den Spitzen der Mikrovilli von Leukozyten, somit an dem ersten Kontaktpunkt von Leukozyten mit dem Gefäßendothel, exprimiert [40].

P- und E-Selektin wirken bei der Leukozytenrekrutierung synergistisch und haben teilweise überlappende Funktionen [9]. Dabei vermittelt die Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 hauptsächlich das Einfangen („capture“) der Leukozyten, während E-Selektin ein deutliches Abbremsen des Rollens bewirkt [17, 41].

Während P-Selektin überwiegend an PSGL-1 bindet, besitzt E-Selektin als weitere Bindungspartner ESL-1 (= „E-selectin ligand-1“) und CD44, über welche das typische E-Selektin-vermittelte langsame Rollen („slow rolling“) vermittelt wird [17]. Dieses langsame Rollen mit Rollgeschwindigkeiten von etwa 5  $\mu\text{m/s}$  ist wichtig für den Übergang in die feste Adhäsion der Leukozyten [42].

Die Liganden für L-Selektin befinden sich – entsprechend der herausragenden Bedeutung für das „Leukozyten-Homing“ – überwiegend auf hochendothelialen Venolen. Sie werden zu einer Gruppe mit dem Namen „peripheral node addressins“ (PNAds) zusammengefasst [41].

In der Zusammenschau ist das Rollen („rolling“) also ein dynamisches Gleichgewicht aus dem raschen Eingehen einer Bindung zwischen dem vorderen Pol eines Leukozyten mit dem Endothel und der ebenso raschen Lösung dieser Bindung am hintern Pol des Leukozyten [43]. Interessanterweise können die hydrodynamischen Kräfte, die während dieses raschen Eingehens und Lösens der Selektin-Liganden-Bindungen wirken, diese Bindung entweder verstärken („catch bonds“) oder schwächen („slip bonds“) [44]. Bemerkenswert ist, dass es eines gewissen Blutflusses und damit verbundenen Scherkräften bedarf, damit stabile Selektin-Bindungen ausgebildet werden können und dass es bei einem Stillstand des Blutflusses zu einer Ablösung der am Endothel befindlichen Leukozyten kommt [45].

### **1.2.2 Aktivierung und Adhäsion**

Das Rollen entlang des aktivierten Endothels führt zu einem erhöhten Kontakt der neutrophilen Granulozyten mit den auf dem Endothel befindlichen Chemokinen, was wiederum die Aktivierung und Adhäsion erleichtert [9].

Hinsichtlich der Aktivierung und Chemotaxis von Leukozyten spielen unter anderem sogenannte ELR-CXC-Chemokine eine wichtige Rolle [46].

Zu dieser Gruppe von Chemokinen gehören unter anderem CXCL8 (= IL-8) beim Menschen respektive die murinen Chemokine CXCL1 (= KC) und CXCL2 [47]. Über den Rezeptor CXCR2 können diese Chemokine zu einer Aktivierung und Adhäsion von Leukozyten an das Endothel führen [9].

Diese Aktivierung der auf Leukozyten exprimierten G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren führt zu einer Konformitätsänderung und Aktivierung von auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Integrinen (sogenanntes „inside out signalling“), welche daraufhin eine stärkere Bindung mit ihren Liganden, zu denen unter anderem die sogenannten „immunoglobulin-like cell adhesion molecules“ (CAMs) zählen, eingehen können [9]. Dieser beschriebene Prozess der Integrin-Aktivierung vermittelt letztendlich

die Adhäsion der Leukozyten an das Endothel, was wiederum essentiell für die Transmigration der Leukozyten in das umliegende Gewebe ist [36].

Integrine gehören einer Familie von heterodimeren Zelloberflächenrezeptoren an und bestehen aus einer  $\alpha$  - und einer  $\beta$  -Untereinheit. Eine wichtige Eigenschaft dieser Rezeptoren besteht in der Fähigkeit, ihre Konformation und damit einhergehend ihre Affinität zu ihren Liganden zu verändern [14].

Bemerkenswert ist darüber hinaus die bidirektionale Signaltransduktion von Integrinen, sprich eine Signalweiterleitung von extra- nach intrazellulär und vice versa. Dabei reguliert beziehungsweise verstärkt das oben beschriebene „inside-out signalling“ die Affinität der Integrine zu ihren jeweiligen Liganden, wohingegen die Integrin-Liganden-Bindung Signalwege innerhalb des Leukozyten anstoßen (sogenanntes „outside-in signalling“), was unter anderem zu einer Festigung der Adhäsion und einer Aktivierung der Zellmotilität führt [9, 48].

Zu den auf den Leukozyten exprimierten Integrinen gehören unter anderem:

- die  $\beta$ 2-Integrine
  - o  $\alpha$ L $\beta$ 2 (LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18)
  - o  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mac-1, macrophage antigen-1, CD11b/CD18)
- die  $\alpha$ 4-Integrine (CD49d)
  - o  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 (VLA4 - very late antigen 4)
  - o  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 (LPAM)

wie im Review von Schmidt et al. dargestellt [14].

Für die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten essentiell wichtige Integrine sind v.a. die  $\beta$ 2-Integrine (z.B. LFA-1 und Mac-1) [36].

Die auf den neutrophilen Granulozyten konstitutiv exprimierten und essentiellen  $\beta$ 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 können nach ihrer Aktivierung an die jeweiligen auf dem Endothel exprimierten Liganden, wie ICAM-1 und ICAM-2 („intercellular adhesion molecule 1/2“), binden [9].

### **1.2.3 Crawling und Transmigration**

Die adhärennten Leukozyten durchlaufen zunächst einige Postarrest-Veränderungen, bevor sie in das umliegende Gewebe auswandern. Zu diesen Integrin-vermittelten

Vorgängen zählen unter anderem die Festigung der Adhäsion („adhesion strengthening“), das Ausbreiten („Spreading“) der Leukozyten und das Entlangkriechen am Endothel („Intraluminal Crawling“). Für die feste Adhäsion und das „Spreading“ ist unter anderem die Bindung von ICAM-1 an aktivierte  $\beta$ 2-Integrine sowie das Vorhandensein von Blutfluss von entscheidender Bedeutung [49].

Die feste Adhäsion der neutrophilen Granulozyten am Endothel leitet den finalen Schritt der Rekrutierungskaskade, also das Auswandern über die Gefäßwand in das umliegende Gewebe, ein. Diese Transmigration findet in der Regel nicht an der Stelle der initialen Adhäsion statt. Nach fester Adhäsion bilden Leukozyten Pseudopodien aus, um auf diese Weise ihre Umgebung „abzutasten“ und schlussendlich eine geeignete Stelle für die Transmigration zu finden. Dabei wandern beziehungsweise kriechen („crawl“) die Leukozyten entlang des Endothels zu Zell-Zell-Kontakten, an denen sie dann auswandern können [9]. Für das „Intraluminal Crawling“, welches senkrecht zum oder gegen den Blutfluss stattfinden kann, spielt unter anderem die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten mit dem Chemokin CXCL2 eine wichtige Rolle [49]. Dabei ist die Interaktion von Leukozyten-exprimiertem Mac-1 und Endothel-exprimiertem ICAM-1 von entscheidender Bedeutung [50]. Fine et al. konnten zudem zeigen, dass bei der durch Scherkräfte induzierten Migration GEF-H1, ein RhoA-spezifischer „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF), von besonderer Bedeutung ist. Dabei ist GEF-H1 über die Regulation der kleinen GTPase RhoA entscheidend für die Aufrechterhaltung der Zellpolarität sowie das „Spreading“, das „Crawling“ und die Zellmigration verantwortlich [51]. Ein weiterer wichtiger Faktor für eine erfolgreiche Rekrutierung von Leukozyten sind darüber hinaus Chemokine, wie z.B. Midkine, die vom aktivierten Endothel sezerniert werden und beispielsweise für die Adhäsion und Extravasation bedeutsam sind [49].

Beim Auswandern aus dem Gefäßlumen in das umliegende Gewebe muss der Leukozyt drei Barrieren überwinden: die Endothelzellen, die Basalmembran und die Perizyten [36]. Prinzipiell gibt es zwei Wege, auf denen ein Leukozyt auswandern kann: entweder erfolgt dies parazellulär (zwischen Zell-Zell-Kontakten) oder transzellulär (direkt durch die Endothelzellen) [9]. Neutrophile Granulozyten bevorzugen zum überwiegenden Teil die parazelluläre Route [52]. Dies erfordert das Lösen von Zell-Zell-Kontakten, welche beispielsweise über VE-Cadherin vermittelt werden und benötigt etwa 5-20 Minuten [9, 53].

Der Prozess der Transmigration wird von einer Reihe von Molekülen koordiniert. Dazu gehören unter anderem Integrine und CAMs („cell adhesion molecules“ wie zum Beispiel

ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1), verschiedene weitere Zelladhäsionsmoleküle, wie PECAM-1 („platelet endothelial cell adhesion molecule 1“ oder CD31), CD99, JAMs („junctional adhesion molecules“) und ESAM („endothelial cell-selective adhesion molecule“) [54, 55].

Dabei dienen zum Beispiel ICAM-1 und ICAM-2 als Liganden für das Integrin LFA-1 und die Interaktion von ICAM-1 mit dem transmigrierenden Leukozyten stößt beispielsweise intrazelluläre Signalwege in den Endothelzellen an [14].

Durch die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel kommt es nun unter anderem zu einer Erhöhung der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Endothelzellen, was über die Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase zu einer Zellkontraktion und damit zu einer Reduktion der Zelladhäsion und Steigerung der Endothelpermeabilität an dieser Stelle führt [56].

Wandern adhärente Leukozyten aus, so induzieren sie sogenannte „transmigratory cups“ auf dem Endothel, also becherartige Einstülpungen auf der endothelialen Oberfläche. Diese „transmigratory cups“ besitzen eine hohe Dichte an ICAM-1 und VCAM-1 und finden sich sowohl beim para- als auch beim transzellulären Weg der Extravasation [57]. Auf dem Boden der Ausbildung von „transmigratory cups“ können Endothelzellen sogenannte „endothelial domes“ ausbilden, worunter man Ausstülpungen des Endothels versteht, die den kompletten Leukozyten überragen und umhüllen und darüber sowohl die trans- als auch die parazelluläre Transmigration erleichtern können [58].

Bei der transzellulären Transmigration bilden sich Poren beziehungsweise Kanäle aus, indem die apikale und basale Endothelzellmembran miteinander fusioniert. Bei der Ausbildung dieses Kanals spielen sogenannte „vesikulo-vakuoläre Organellen“ eine Rolle – das sind Caveolae und vesikuläre Strukturen, die miteinander verschmelzen und darüber die Ausbildung eines Kanals für die Transmigration unterstützen [59].

Haben die Leukozyten die Endothelzellen passiert, müssen sie noch die Barriere aus Basalmembran und Perizyten überwinden, um in das umliegende Gewebe zu gelangen. Die Basalmembran bildet eine kontinuierliche Hülle um das Gefäßendothel und ist entscheidend für die Integrität der Gefäßwand. Gebildet wird die Basalmembran aus Proteinen der extrazellulären Matrix, darunter Kollagene und Laminine [60]. Interessanterweise befinden sich innerhalb der Basalmembran ausgedünnte Bereiche, in denen die Moleküle weniger dicht angeordnete sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden,

dass in diesen Regionen Lücken zwischen den Perizyten bestehen, was nahelegt, dass diese Formation eine geeignete Stelle für Leukozyten zum Auswandern aus dem Gefäß darstellen könnte [61].

Die Barriere der Basalmembran kann hierbei unter anderem mit Hilfe von Proteasen überwunden werden, die von transmigrierenden Leukozyten (z.B. Neutrophile Elastase) sezerniert werden, um die Basalmembran stellenweise abzubauen und dadurch passierbar zu machen [6, 62]. Dies wird jedoch kontrovers diskutiert [63]. Zusätzlich scheint beim Überwinden der Basalmembran eine über PECAM-1 vermittelte Hochregulierung von Laminin-Rezeptoren ( $\alpha 6\beta 1$ - und  $\alpha 3\beta 1$ -Integrin) auf Leukozyten eine entscheidende Rolle zu spielen [62].

Weiterhin nicht vollständig geklärt ist allerdings, wann Leukozyten den parazellulären und wann den transzellulären Weg zum Auswandern in das umliegende Gewebe wählen.

### 1.3 Uromodulin

Uromodulin, auch bekannt als Tamm-Horsfall-Protein (THP), ist ein ausschließlich in der Niere von Säugetieren von Tubulusepithelzellen des dicken aufsteigenden Asts der Henle Schleife (TAL = thick ascending limb) produziertes Glykoprotein [64-67]. Dieses Peptid wird von Tubulusepithelzellen überwiegend in das Tubuluslumen respektive den Urin sezerniert. Uromodulin ist das am meisten vorhandene Protein im menschlichen Urin, mit einer Molekülmasse von etwa 85 kDa und einer täglichen Ausscheidungsrate von 50-150 mg in 24 Stunden [68-73].

Interessanterweise wird Uromodulin zusätzlich über einen basolateralen Mechanismus in geringen Mengen in das Interstitium und in das Blut abgegeben [65, 74, 75].

Die physiologische Rolle von Uromodulin blieb über Jahrzehnte hinweg unverstanden. Nach und nach entpuppte sich dieses renale Protein als ein facettenreiches Molekül, was eine Vielzahl an Funktionen innehat.

Es wird vermutet, dass Uromodulin eine Rolle im Wasser- und Elektrolythaushalt im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife spielt. Diese Vermutung beruht auf Erkenntnissen, dass Uromodulin polymerisiert und eine hydrophobe, gel-ähnliche Struktur bildet, welche zur Wasserimpermeabilität des TAL beiträgt [76]; zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass bei hohem Salzkonsum und Langzeiteinnahme des Schleifendiuretikums Furosemid eine gesteigerte Uromodulin-Expression besteht [77]. Torffvit et al. konnten zeigen, dass hoher Salzkonsum beim Menschen zu einer gesteigerten Uromodulin-Ausscheidung im Urin führt, wohingegen niedriger

Salzkonsum den gegenteiligen Effekt hatte [78]. Über eine Bindung an den Na-K-2Cl-Cotransporter NKCC2 und den Kaliumkanal ROMK beeinflusst Uromodulin zudem den Ionentransport im renalen Tubulussystem und dadurch den Blutdruck [79-81].

Studien mit UMOD-knockout Mäusen haben gezeigt, dass Uromodulin eine protektive Rolle bei Harnwegsinfekten (HWI) mit Typ 1 Fimbrien-tragenden E.coli spielt [82, 83]. Uromodulin scheint außerdem die Bildung von Nierensteinen zu hemmen. *In vitro*-Experimente haben gezeigt, dass sialylierte, negativ-geladene Glycanstrukturen des Uromodulin die Kristallbildung von Calcium-Oxalat und Calcium-Phosphat unterdrücken [84]. Studien in UMOD-knockout Mäusen haben eine spontane Nierenkalzifizierung und die Anfälligkeit für Kalziumkristallbildung bei hohen Kalzium- und Oxalatkonzentrationen gezeigt [85]. Eine von Gudbjartsson et al. durchgeführte genomweite Assoziationsstudie (GWAS = genome-wide association study) von isländischen und niederländischen Kohorten unterstützt die Idee der Schutzfunktion von Uromodulin gegen Nierensteinbildung [86].

Eine GWAS von Köttgen et al. konnte zeigen, dass bestimmte Varianten im Uromodulin-Gen mit einer erhöhten Anfälligkeit für eine chronische Niereninsuffizienz assoziiert sind [87].

Delgado et al. konnten zeigen, dass verminderte Uromodulin-Serumspiegel mit einer erhöhten kardialen Mortalität einhergehen [88]. Zudem konnte gezeigt werden, dass verminderte Uromodulin-Spiegel mit einem erhöhten systemischen oxidativen Stress und einer Neigung zu einem gestörten Glukosestoffwechsel respektive einer erhöhten Anfälligkeit, einen Diabetes mellitus Typ 2 zu entwickeln, verbunden sind [89, 90].

Darüber hinaus scheinen niedrige Uromodulin-Serumspiegel mit einer reduzierten GFR assoziiert zu sein [91]. Bei Patienten mit autosomal-dominanten tubulointerstitiellen Nierenerkrankungen (ADTKD) zeigten sich eine abnormale Verteilung von Uromodulin mit intrazellulärer Akkumulation im endoplasmatischen Retikulum und Zytoplasma [92, 93].

ADTKD werden durch Mutationen in Genen verursacht, welche unter anderem für Renin, Mucin-1 oder Uromodulin kodieren [94, 95]. Diese Gruppe von Nierenerkrankungen ist durch eine tubulointerstitielle Fibrose, Tubulusatrophie und chronisches Nierenversagen gekennzeichnet [92].

Neben diesen Eigenschaften schreiben neueste Studien dem Protein eine große Bedeutung in der Immunabwehr zu. So sind weitere wichtige Funktionen von Uromodulin der Schutz vor akuter Niereninsuffizienz (AKI = acute kidney injury) sowie immunmodulierende Effekte während Entzündungsprozessen. *In vitro*-Studien haben

gezeigt, dass Uromodulin sowohl virale Hämagglutination als auch antigen-spezifische T-Zell-Proliferation und Monozyten hemmt [96, 97]. Darüber hinaus besitzt Uromodulin die Fähigkeit immunregulatorische Moleküle im Urin zu binden, darunter Immunglobulin G, Komplementfaktor 1q, rekombinantes Interleukin-1 und rekombinanten Tumornekrosefaktor, was Uromodulin zu einem einzigartigen renalen Liganden für Lymphokine macht [98-100]. Studien in UMOD-knockout Mäusen haben eine verzögerte Heilung nach ischämischen Nierenschäden gezeigt [75]; eine mögliche Erklärung für diese verzögerte Genesung könnte die Fähigkeit des Uromodulins sein, schädliche proinflammatorische Moleküle und chemische Lockstoffe (chemoattractants) abzufangen, die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und das TLR4-Expressionsmuster im S3-Segment zu modulieren [75, 101, 102]. El-Achkar et al. konnten zeigen, dass die basolaterale Relokalisation von Uromodulin mit erhöhten Uromodulin-Serumspiegeln assoziiert ist, welche ebenfalls die Immunantwort modulieren können [75]. Über die Bindung an TLR4 kann Uromodulin die angeborene Immunabwehr über NF- $\kappa$ B sowie das NLRP3 Inflammasom („NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 inflammasome“) aktivieren [103, 104]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Uromodulin bei humanen Monozyten [105] sowie aus dem Knochenmark stammenden Makrophagen eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung induziert [103]. Des Weiteren wurde eine Uromodulin-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion nach intravenöser Uromodulin-Applikation in C57BL/6 Mäusen beschrieben [103]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Uromodulin humane polymorphonukleäre Leukozyten über Sialinsäure-spezifische Zelloberflächenrezeptoren binden kann, Apoptose, Chemotaxis und Phagozytose moduliert und die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* erleichtert, wenn es von renalen Epithelzellen exprimiert wird [106-108].

All den genannten proinflammatorischen Eigenschaften von Uromodulin stehen jedoch auch Daten gegenüber, die besagen, dass Uromodulin eine Entzündungsreaktion eindämmen kann, indem es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen unterdrückt [65, 75, 101]. So konnte gezeigt werden, dass Uromodulin eine hemmende Wirkung auf die Granulopoese und die systemische Homöostase von neutrophilen Granulozyten ausüben kann [109].

Micanovic et al. beschreiben allerdings auch, dass durch Uromodulin die Proliferation und phagozytotische Aktivität von mononukleären Phagozyten verstärkt werden kann, während in einem renalen Ischämie-Reperfusionsschaden-Modell der Verlust von Uromodulin gleichzeitig zu einer verstärkten Immunantwort führt [110].

Für diese auf den ersten Blick teilweise scheinbar widersprüchlichen Daten liefern deren Autoren einen vielversprechenden Erklärungsansatz. Den Ergebnissen wird die Annahme zugrunde gelegt, dass Uromodulin *in vivo* in zwei unterschiedlichen Formen – nämlich einer monomeren und einer polymeren Form – vorliegt und dementsprechend unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen kann. Normalerweise befinden sich die beide unterschiedlichen Uromodulin-Formen unter homöostatischen Bedingungen in unterschiedlichen Kompartimenten [110-112]. Im Tubuluslumen sowie im Urin befindet sich hauptsächlich die polymere Uromodulin-Variante, wo diese den oben beschriebenen Aufgaben wie dem Schutz vor bakteriellen Harnwegsinfekten nachkommt [111]. In geringeren Mengen wird Uromodulin zudem vom Tubulusepithel nach basolateral in das Nierenparenchym sezerniert. Das basolateral sezernierte Uromodulin wird in den Blutkreislauf transportiert und zirkuliert darin als Monomer, durch das es seine systemischen homöostatischen Funktionen ausübt [110, 112].

Das erklärt sehr gut, weshalb sich polymerisiertes Uromodulin physiologischerweise ausschließlich in den Harnwegen befindet, also in einer mehr oder minder isolierten Nische innerhalb des Körpers, und keinen Kontakt mit extratubulärem Gewebe hat.

Das bedeutet im Umkehrschluss, dass jeglicher Kontakt von polymerisiertem Uromodulin mit dem extratubulären Nierengewebe unter pathologischen Zuständen stattfindet. Dies kann beispielsweise bei Zuständen der Fall sein, in denen die epitheliale Barriere einschließlich ihrer tubulären Basalmembran unterbrochen ist.

Es ist bekannt, dass im Rahmen eines multiplen Myeloms pathologische renale Uromodulin-Ablagerungen eine häufige Komplikation darstellen – dabei bildet Uromodulin mit freien Immunglobulin-Leichtketten sogenannte Zylinder im Urin, die zu einer sogenannten Cast-Nephropathie führen [113]. Man nimmt an, dass diese Zylinder über eine Tubulusatrophie, eine fortschreitende interstitielle Entzündung und Fibrose schließlich zu einem akuten Nierenversagen führen können [114]. In Versuchen mit einem murinen unilateralen Ureterobstruktion-Modell (murine unilateral ureteral obstruction (UUO) model) konnte zudem eine Uromodulin-Akkumulation und Uromodulin-Ablagerungen in extratubulärem Gewebe nachgewiesen werden [115]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die renalen Uromodulin-Spiegel adulter Mäuse nach einer UUO stiegen und dass ein Fehlen von Uromodulin in UMOD-knockout-Mäusen in diesem Modell zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und einem geringeren Nierenschaden führte [116].

Vor dem Hintergrund dieser Daten scheint es möglich, dass polymerisiertes Uromodulin im extratubulären Gewebe auch als eine Art DAMP-ähnliches Molekül wirken kann. Durch diese Eigenschaft könnte Uromodulin eine Entzündungsreaktion in Gang setzen, sobald es mit extratubulärem Gewebe in Kontakt kommt.



## 2 Zielsetzung dieser Arbeit

Mittlerweile besitzen wir also - wie im vorherigen Kapitel dargelegt - eine gute Vorstellung davon, welche Funktionen Uromodulin im menschlichen Körper ausübt beziehungsweise welche Vorgänge durch Uromodulin moduliert werden können. Es scheint bei einer Vielzahl an Prozessen mitzuwirken, darunter fallen vor allem einige immunologische Vorgänge. Wie diese Funktionen allerdings im Detail aussehen, ist weiterhin unklar und bedarf weiterer Forschungsarbeit.

Die bisherigen Studienergebnisse über Uromodulin untermauern die Hypothese, dass polymerisiertes Uromodulin (pUMOD) als ein proinflammatorisches Molekül wirkt und multiple immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Diese Eigenschaften könnten bei Entzündungen, insbesondere in der Niere, von Bedeutung sein. Die basolaterale Freisetzung von Uromodulin in das Interstitium und in das Blut stellt hierbei einen möglichen Weg dar, über den das Protein seine Funktion während Entzündungsprozessen ausüben könnte. Welche Rolle dem Uromodulin während Immunreaktionen *in vivo* letztendlich zuteilwird und wie es insbesondere Entzündungsreaktionen beeinflusst, ist weiterhin unklar. Die vorliegende Promotionsarbeit versucht daher Antworten bereitzustellen, welche Stellung Uromodulin im Immunsystem einnimmt und speziell ein Verständnis davon zu bekommen, welche Rolle pUMOD während Entzündungsprozessen spielt. Dabei wird der Fokus auf den Einfluss von Uromodulin auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blutkreislauf in entzündetes Gewebe gelegt - ein grundlegender und damit lebenswichtiger Prozess im Rahmen von Entzündungsreaktionen, welcher täglich in jedem menschlichen Körper abläuft.

Die zugrundeliegende Hypothese der vorliegenden Arbeit und die mit ihr verbundenen Forschung lautet folglich, dass pUMOD eine Rolle als Modulator von Entzündungsprozessen spielt und dabei im Speziellen auf die Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten wirkt. Es wurde daher als Ziel definiert, auf folgende Fragen Antworten zu finden:

- Welche Bedeutung hat polymerisiertes Uromodulin bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe?
- Wie beeinflusst polymerisiertes Uromodulin die einzelnen Teilschritte der Leukozytenrekrutierung (Leukozytenrollen, -adhäsion, -extravasation) *in vivo*?
- Sofern es Hinweise darauf gibt, dass Uromodulin einen Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung hat, können wir dann die Mechanismen ausfindig machen, über die Uromodulin die Leukozytenrekrutierung beeinflusst?



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Genehmigung der Versuche

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ 55.2-1-54-2532-76-12-2012 und ROB55.2-2532.Vet\_02-17-102) am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München und am Biomedizinischen Centrum München der LMU München durchgeführt. Die Blutspende freiwilliger gesunder Spender wurde durch die Ethikkommission der LMU München genehmigt (Az. 611-15).

### 3.2 Methoden und Modelle

#### 3.2.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden Wildtyp (WT)-Mäuse (C57BL/6) von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) und Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Gehalten wurden die Tiere in der hauseigenen Tierhaltung unter veterinärmedizinischer Aufsicht im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin und am Biomedizinischen Centrum der LMU München. Jeweils bis zu 5 Tiere wurden in Makrolonkäfigen (Typ II, 370 cm<sup>2</sup>, Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland) gehalten; auf den Zugang zu ausreichend Futter und Wasser sowie die Vermeidung von Stressfaktoren und die Einhaltung des Tag-Nacht-Rhythmus wurde streng geachtet. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass die Raumtemperatur von 22±2 °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei 54-58% konstant gehalten wurde. Für die Experimente wurden ausschließlich Tiere im Alter von 8 - 25 Wochen und einem Körpergewicht von 20 - 40 g verwendet. Unmittelbar nach Abschluss der Experimente wurden die Versuchstiere durch zervikale Dislokation getötet.

#### 3.2.2 Chirurgische Verfahren

Für die murinen *in vivo*-Experimente wurde das Mauskremastermuskel-Modell verwendet. Im Folgenden wird die dafür nötige Präparation der Maus nach Baez et al. und separat davon die Intravitalmikroskopie beschrieben [117].

### 3.2.2.1 *Das Mauskremastermuskel-Modell – Präparation des Musculus cremaster und Katheterisierung der Arteria carotis*

Der Kremastermuskel ist aufgrund seiner anatomischen Lage hervorragend für die Präparation geeignet. Die sehr geringen Gewebedicke des Muskels bietet darüber hinaus eine ausgesprochen gute Möglichkeit, die Mikrozirkulation der Maus *in vivo* mittels Durchlichtmikroskopie zu untersuchen.

Für die Anästhesie der Mäuse wurde eine Kombination aus Ketamin (Ketavet 100 mg/ml Injektionslösung, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland), Xylazin (Rompun® 2% Injektionslösung, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun Injektionslösung, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen, Deutschland) benutzt. Dafür wurden 0,1 ml Ketamin mit 0,1 ml Xylazin und 0,8 ml NaCl 0,9% gemischt und dem Versuchstier gewichtsadaptiert intraperitoneal injiziert (0,1 ml Narkoselösung pro 8 g Körpergewicht). Im Verlauf der Präparation und des gesamten Experiments wurde die Narkose durch eine stündliche Applikation von 100 µl der Narkoselösung aufrechterhalten. Etwa 20 bis 30 Minuten nach Narkoseeinleitung wurde die Wirksamkeit der Narkose durch Setzen eines Schmerzreizes mittels Pinzettendruck im Bereich der Zwischenzehnräume der Hinterbeine getestet. Zeigte die narkotisierte Maus daraufhin keine Reaktion, wurde mit der Präparation begonnen. Für das Aufrechterhalten einer konstanten Körpertemperatur wurde die Maus mit dem Rücken auf eine Heizplatte (35°C) gelagert. Zudem wurde mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) einem Austrocknen der Augen vorgebeugt. Um gute Präparationsbedingungen der Trachea und der A. carotis zu schaffen, wurden sodann die Vorderbeine mit einem Klebeband seitlich der Heizplatte fixiert und der Kopf rekliniert, indem ein Faden um die oberen Schneidezähne der Maus geschlungen und dieser mittels Klebeband an der Heizplatte fixiert wurde.

Die Präparation des Kremastermuskels erfolgte unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops. Verwendet wurden entweder das Modell „Olympus SZ61“ oder „Olympus SZX7“ (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Über einen Hautschnitt im ventralen Halsbereich, gefolgt von einer trachealen Inzision zwischen zwei Knorpelspangen, wurde die Maus im ersten Präparationsschritt mit einem etwa 2 cm langen Plastikschlauch (innerer Durchmesser 0,76 mm, äußerer Durchmesser: 1,22 mm; Scientific Commodities Inc., Lake Havasu City, USA) intubiert. Für eine suffiziente Atmung wurde der Tubus gekürzt, um das Totraumvolumen möglichst gering zu halten.

Der Tubus wurde mittels zweier Fäden fixiert, um eine Dislokation zu verhindern. Anschließend wurde eine der Aa. carotides communes freipräpariert, inzidiert und retrograd mit einem schmalen Plastikschauch (innerer Durchmesser 0,28 mm, äußerer Durchmesser: 0,61 mm; Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn, Deutschland) kanüliert. An diesen Karotiskatheter wurde eine mit NaCl-Heparin-Lösung (20 U/ml Heparin) gefüllte Spritze konnektiert und der Katheter ebenfalls mit Fäden fixiert. Der Karotiskatheter diente je nach Versuchsprotokoll unter anderem der Applikation von Antikörpern und am Ende eines Experiments der Blutentnahme zur Erstellung eines Differentialblutbildes.

Für den zweiten Teil der Präparation wurde die Maus auf eine speziell angefertigte „Präparationsbühne“ umgelagert. Die Körpertemperatur wurde weiterhin mit einer Heizplatte konstant gehalten, die Hinterbeine mit Klebeband fixiert und die Maus so gelagert, dass das Skrotum beziehungsweise der M. cremaster auf einem transparenten Podest innerhalb der Bühne präpariert und fixiert werden konnten. Über einen kleinen Hautschnitt im Skrotum wurde ein Hoden mit Pinzetten mobilisiert und von Bindegewebe freipräpariert. Das Gewebe wurde während der Präparation sowie des gesamten Versuchs fortlaufend mit einer angewärmten und begasten (95% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Pufferlösung superfundiert, um das Gewebe vor dem Austrocknen zu schützen [118, 119]. Über einen ventralen Längsschnitt durch den M. cremaster wurde dieser flächig auf das Podest aufgespannt und mit Pins fixiert. Anschließend wurden Hoden und Nebenhoden mobilisiert und mit einem Pin außen fixiert, wodurch der M. cremaster nun optimal zugänglich für die Intravitalmikroskopie war. Die Maus konnte dann mitsamt der Bühne für das eigentliche Experiment unter dem Mikroskop platziert werden.

#### 3.2.2.2 *Stimulation des M. cremaster durch intraskrotale Substanzapplikation*

Für die Versuche, in denen die Wirkung einzelner Substanzen auf die Mikrozirkulation beziehungsweise die Leukozytenrekrutierung *in vivo* erforscht werden sollte, wurde den Mäusen die entsprechenden Substanzen vor der Präparation des Kremastermuskels intraskrotal appliziert. Dafür wurde die jeweilige Substanz beispielsweise in NaCl 0,9% gelöst und ein Volumen von etwa 200 µl mit einer dünnen Kanüle in das Skrotum injiziert. Die Substanzapplikation wurde zeitlich so ausgeführt, dass die Maus etwa 3 Stunden nach Stimulation fertig präpariert unter dem Mikroskop lag und bereit für die *in vivo*-Beobachtung war.

In einer ersten Versuchsreihe wurde den Mäusen entweder polymerisiertes Uromodulin (pUMOD, BBI Solutions, Crumlin, UK), humanes Serumalbumin (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) (jeweils 10 µg/Maus in 200 µl NaCl 0,9%) oder lediglich 0,9% NaCl (Negativkontrolle) intraskrotal injiziert. Die Konzentration des Uromodulins wurde dabei entsprechend der bereits aus der Literatur bekannten Werte gewählt [103].

Diese Versuche wurden mit Unterstützung der Arbeitsgruppenmitglieder Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster, Herrn Dr. Roland Immler und Frau Susanne Bierschenk durchgeführt.

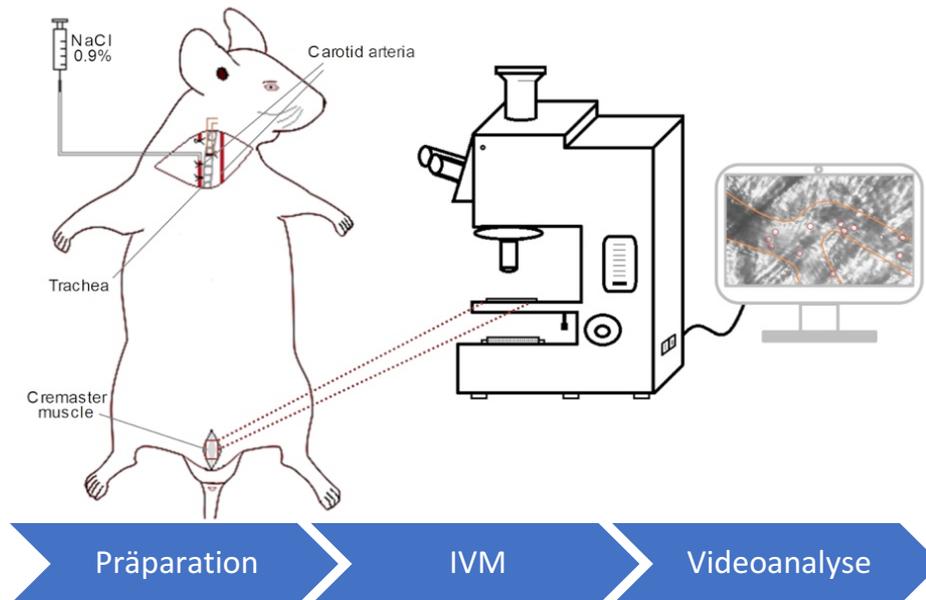
Für eine weitere Versuchsreihe, bei welcher die endotheliale Permeabilität *in vivo* untersucht werden sollte, wurde den Versuchstieren Uromodulin (10 µg/Maus) oder NaCl 0,9% (Negativkontrolle) intraskrotal injiziert. Nach der Präparation des Kramtermuskels (siehe 3.2.2.1) wurde den Mäusen über den Karotiskatheter Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran (750 µg in 150 µl NaCl 0,9%, mittleres Molekulargewicht 150 kDa; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) appliziert, wie in Praetner et al. bereits beschrieben [120]. Der Ablauf der Mikroskopie sowie die Auswertung der IVM-Versuche wird in den folgenden Abschnitten im Detail beschrieben (siehe 3.2.3 bis 3.2.5).

Im Anschluss an die Mikroskopie wurden - mit Ausnahme der FITC-Dextran-IVM-Versuche - beide Kremastermuskel entfernt und in 4% Paraformaldehyd (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in PBS über Nacht fixiert, anschließend 3x 5 Minuten in Phosphatpuffer 0,1 mol/l (pH 7,4) mit 5% Ethanol gewaschen und das gesamte Präparat dann mit einer Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 3 Minuten angefärbt. Anschließend wurde das Präparat mit destilliertem Wasser gewaschen und 20-30 Minuten mit Essigsäure 0,03% nachbearbeitet. Die Präparate wurden sodann in einer aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für je 1 Minute entwässert und im Anschluss daran 2x 5 Minuten mit Xylol geklärt. Die Präparate wurden auf Adhäsionsobjektträgern mit Eindeckmedium (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) befestigt und haltbar gemacht. Die Präparate konnten dadurch später lichtmikroskopisch hinsichtlich der Leukozytenextravasation in das perivaskuläre Gewebe quantitativ ausgewertet werden.

### 3.2.3 Intravitalmikroskopie (IVM)

#### 3.2.3.1 IVM – Durchlicht-Hellfeldmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie

Für die Durchführung der Intravitalmikroskopie wurde ein Olympus BX51 WI – Mikroskop, ausgestattet mit einem 40x-Objektiv (Olympus; 0,8 NA; Wasserimmersionsobjektiv) und einer CCD-Kamera (KAPPA CF 8 HS), verwendet. Pro Versuchstier wurden mindestens 3 geeignete postkapilläre Venolen mikroskopiert. Kriterien für geeignete Venolen waren unter anderem die Blutströmungsgeschwindigkeit, die Gefäßbreite und -länge. Geeignete Gefäße wurden mit der Software VirtualDub (Version 1.9.11) für mindestens 1 Minute pro Video digital aufgenommen und für die spätere Auswertung abgespeichert. Die Blutströmungsgeschwindigkeit innerhalb eines Blutgefäßes wurde mit zwei Photodioden, welche über einen Computer mit einem Programm zur Ermittlung der Geschwindigkeit mittels zeitlicher Kreuzkorrelation verbunden waren, gemessen (CircuSoft Instrumentation, Hockessin, USA; Methode ursprünglich entwickelt von Wayland & Johnson 1967) [121]. Da es, wie eingangs beschrieben, gewisser Blutströmungsgeschwindigkeiten bedarf, damit es zum Leukozytenrollen entlang des Endothels kommen kann, wurden ausschließlich Gefäße aufgenommen, in denen eine Blutströmungsgeschwindigkeit von über 800  $\mu\text{m/s}$  herrschte [45]. Zur Untersuchung des E-Selektin-vermittelten Rollens wurde über den Karotiskatheter ein blockierender Ratte-anti-Maus E-Selektin-Antikörper (clone 9A9, InVivo, Hennigsdorf, Deutschland; 30  $\mu\text{g/Maus}$ ) appliziert. Zur Erstellung eines Differentialblutbildes und zur Ermittlung der systemischen Leukozytenzahl, wurden am Ende eines Experiments über den Karotiskatheter etwa 50  $\mu\text{l}$  Blut in einem heparinisierten Probenröhrchen (BD Microtainer® Röhrchen; Becton, Dickinson and Company, USA) gesammelt und mit einem IDEXX ProCytex Dx® Hämatologie-Analysegerät (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, USA) analysiert.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Intravitalmikroskopie (IVM) des murinen Cremastermuskels**  
 Nach der Anästhesie wird die Maus über eine Trachealkanüle intubiert und eine Arteria carotis katheterisiert. Anschließend wird der Musculus cremaster präpariert, so dass dieser optimal zur Durchlichtmikroskopie zugänglich ist. Zur späteren Auswertung werden Videos geeigneter Venolen aufgezeichnet (modifiziert nach [122]).

### 3.2.3.2 IVM - Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde an einem Axio Scope.A1-Mikroskop durchgeführt, ausgestattet mit einer 488nm LED-Lichtquelle (Colibri.2-Beleuchtungssystem, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) und einem Langpass-Emissionsfilter (LP 515, Olympus Mikroskopie). Vergleichbar mit der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Intravitalmikroskopie wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (20x, 0,5 NA und 40x, 0,8 NA, Olympus Mikroskopie) für die Fluoreszenzaufnahmen verwendet. Bei den Versuchen mit Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff wurden im Gegensatz zu den übrigen IVM-Versuchen keine Videoaufnahmen, sondern lediglich einzelne Bilder generiert und zur späteren Auswertung abgespeichert.

### 3.2.4 Hellfeldmikroskopie

Die Hellfeldmikroskopie wurde in der “Core Facility Bioimaging” am Biomedizinischen Centrum der LMU München durchgeführt. Dazu wurde ein Leica

DM2500-Mikroskop verwendet, welches mit einer DMC2900 CMOS-Farbdigitalkamera und einem 63x- bzw. 100x-Objektiv (Leica; 63x/1.25; 100x/1.40; Ölimmersionsobjektiv; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgestattet war. Mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie wurden die fixierten und angefärbten Kremastermuskelpräparate aus den IVM-Versuchen hinsichtlich der Anzahl ausgewanderter Leukozyten ausgewertet (siehe 3.2.5.2).

### **3.2.5 Analyse der Mauskremastermuskel-Versuche**

#### *3.2.5.1 Quantifizierung der Leukozytenrekrutierung in vivo nach einer Uromodulin-induzierten akuten Entzündung im murinen Kremastermuskel*

Für die Auswertung der Videodateien wurde das Programm Fiji (ImageJ, National Institute of Health, Bethesda, USA) verwendet [123]. Zuerst wurde die Gefäßlänge und -breite ausgemessen – die Länge wurde dabei einmalig gemessen, die Breite als Mittelwert dreier repräsentativer Werte angegeben. Ausschließlich Gefäße mit einem Durchmesser von 20-40  $\mu\text{m}$  und solche, die über einen einminütigen Videoabschnitt vollständig einsehbar waren, wurden zur weiteren Auswertung herangezogen. Sodann wurden die rollenden und adhärenen Leukozyten innerhalb dieses Gefäßabschnittes bestimmt. Für die Ermittlung der rollenden Leukozyten wurde eine der Breite nach verlaufende Linie über das Gefäß gelegt und die Anzahl der über diese Linie rollenden Leukozyten innerhalb des einminütigen Videoabschnitts gezählt, was dem sogenannten „Leukocyte Rolling Flux“ entspricht [124]. Anschließend wurde die sogenannte “Rolling Flux Fraction” (RFF = rollende Leukozyten/min geteilt durch die Gesamtzahl an Leukozyten, die diesen Gefäßabschnitt passieren) berechnet [124]. Als adhärenen Leukozyten wurden diejenigen Leukozyten betrachtet, die innerhalb des einminütigen Videoabschnitts für mindestens 30 Sekunden an der Gefäßwand adhärenen waren beziehungsweise sich maximal um einen Zelldurchmesser fortbewegt haben und als adhärenen Zellen/ $\text{mm}^2$  Gefäßoberfläche angegeben. Zusätzlich wurde die sogenannte “Leukocyte Adhesion Efficiency” (Anzahl adhärenen Zellen/ $\text{mm}^2$  Gefäßoberfläche geteilt durch den WBC) berechnet. Zusätzlich wurde die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten bestimmt. Dazu wurde innerhalb des Programms Fiji das Plug-in „MTrackJ“ verwendet und, sofern möglich, die Geschwindigkeiten von mindestens 10 rollenden Leukozyten bestimmt [125]. Die gemessenen Werte eines Experiments wurden anschließend in Prozenträngen und Summenhäufigkeitsverteilungen abgebildet.

### 3.2.5.2 *Auswertung der angefärbten Kremasterpräparate - Quantifizierung der Leukozytenextravasation*

Die angefärbten Kremasterpräparate (siehe 3.2.2.2) aus den IVM-Versuchen wurden mit einem Leica DM2500-Mikroskop, ausgestattet mit einem 100x-Objektiv (siehe 3.2.4), hinsichtlich der in das perivaskuläre Gewebe ausgewanderten Leukozyten ausgewertet. Pro Kremastermuskel wurde das perivaskuläre Gewebe von mindestens 10 verschiedenen Gefäßen ausgewertet. Voraussetzung war hierbei, dass die gemessenen Ausmaße des Gefäßes den unter 3.2.5.1 genannten Vorgaben entsprachen und nur ein Gefäß im Blickfeld zu sehen war. Alle perivaskulären Zellen eines Gesichtsfeldes wurden gezählt und den verschiedenen Zellarten (hier: neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie mononukleäre Zellen, also Monozyten und Lymphozyten) zugeteilt. Die Auswertung der Präparate erfolgte zudem verblindet, damit der Auswerter keiner Verzerrung durch die Behandlungsart unterlag.

### 3.2.5.3 *Ermittlung der mikrovaskulären Endothelpermeabilität in vivo*

Zur Ermittlung der durch verschiedene Stimuli hervorgerufenen Permeabilitätsänderung hochendothelialer Venolen *in vivo* wurde im Mauskremastermuskel-Modell (siehe 3.2.2 und 3.2.3) die Permeabilitätsänderung mittels intravasaler Applikation von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Dextran (750 µg in 150 µl NaCl 0,9%, Sigma-Aldrich, mittleres Molekulargewicht von FITC-Dextran 150 kDa) visualisiert.

Um den Effekt von Uromodulin auf die Endothelpermeabilität zu erforschen, wurde der M. cremaster wie in 3.2.2 beschrieben mit Uromodulin (10 µg/Maus) bzw. NaCl 0,9% (Negativkontrolle) stimuliert. Unmittelbar vor dem Mikroskopiebeginn wurde das FITC-Dextran über den Karotiskatheter appliziert. Es wurden dann 3 geeignete Venolen (siehe 3.2.3.1 und 3.2.5.1) mitsamt des perivaskulären Gewebes über einen Zeitraum von 45 Minuten beobachtet und fotodokumentiert. Dazu wurden die Gefäße und das umliegende Gewebe mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission > 515 nm mit einer AxioCam Hsm Digitalkamera (Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland) und einem geeigneten Emissionsfilter (LP 515) detektiert.

Um die Permeabilitätsänderung über die Zeit zu visualisieren, wurde der Übertritt von intravasalem FITC-Dextran in das umliegende Gewebe in Form von Intensitätsänderungen ermittelt. Die Fluoreszenzintensitäten wurden mit dem Programm

Fiji (ImageJ) bestimmt, indem die mittleren Grauwerte in 6 zufällig gewählten Quadraten (ROI = „region of interest“ der Fläche  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$ ), die jeweils  $50 \mu\text{m}$  Abstand zum Gefäß hatten, ermittelt wurden. Die Berechnung des Mittelwerts der Grauwerte im perivaskulären Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt diente somit der Quantifizierung der Extravasation von FITC-Dextran und letztlich als Maß für die Permeabilität des Endothels von postkapillären Venolen *in vivo*.

### **3.2.6 Mausmodell für eine akute Peritonitis**

Um eine mögliche Beteiligung von Uromodulin bei der Rekrutierung von Monozyten *in vivo* zu untersuchen, wurde WT-Mäusen entweder Uromodulin ( $10 \mu\text{g}/\text{Maus}$  in  $800 \mu\text{l}$   $0,9\%$  NaCl) oder  $0,9\%$  NaCl (Negativkontrolle) intraperitoneal (i.p.) appliziert.

Nach 6 Stunden wurde mit  $7 \text{ ml}$  eiskalter PBS eine Peritoneallavage durchgeführt. Die in der Lavageflüssigkeit enthaltenen Zellen wurden angefärbt, fluoreszierende Mikrosphären (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) hinzugegeben und anschließend durchflusszytometrisch (CytoFLEX, Beckman Coulter) die Anzahl neutrophiler Granulozyten und inflammatorischer Monozyten ermittelt, die innerhalb der 6 Stunden in den Peritonealraum ausgewandert sind. Die Auswertung erfolgte mit der FlowJo Analysesoftware (Version 10.4, FlowJo LLC, Becton Dickinson, Ashland, USA). Neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten wurden entsprechend als  $\text{CD45}^+/\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^+/\text{CD115}^-$  bzw.  $\text{CD45}^+/\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^+/\text{CD115}^+$  Zellen definiert. Diese Versuche wurden mit Unterstützung der Arbeitsgruppenkollegin Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster durchgeführt.

### **3.2.7 Ermittlung der Permeabilität von Endothelzellverbänden *in vitro***

#### *3.2.7.1 Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen*

Für die *in vitro*-Experimente mit humanen Endothelzellen wurden HUVECs (= Human Umbilical Vein Endothelial Cells) entweder von PromoCell (HUVEC cryopreserved, pooled; PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) erworben oder eigenständig aus frischen Nabelschnurvenen mittels Kollagenase A ( $1 \text{ mg}/\text{ml}$ ; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) isoliert, wie in der Literatur bereits beschrieben [126]. Die Endothelzellen wurden anschließend in Standard-Zellkulturschalen in einem

Wachstumsmedium für Endothelzellen bis zur Konfluenz kultiviert. Dem Zellkulturmedium wurde ein SupplementMix (Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix C-39215, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland) sowie DMEM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), versetzt mit 20 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), in einem 1:1-Verhältnis beigefügt. Die konfluenten Zellen wurden anschließend mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) abgelöst. Für die Experimente wurden Zellen der Passage II und III verwendet.

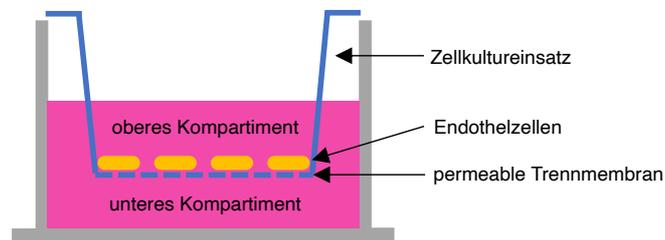
### 3.2.7.2 *Isolation humaner neutrophiler Granulozyten*

Neutrophile Granulozyten wurden unter Verwendung von Polymorphprep™ (Alere Technologies AS, Oslo, Norwegen) aus humanem Vollblut gesunder Blutspender isoliert. Dabei wird das Vollblut auf eine in Zentrifugenröhrchen vorgelegte Schicht aus Polymorphprep™ hinzugegeben und mittels Dichtegradientenzentrifugation bei 500g für 30 Minuten unter Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wird die deutlich sichtbare Schicht, welche die neutrophilen Granulozyten enthält, abpipettiert und in HBSS-Puffer resuspendiert.

### 3.2.7.3 *Transwell™ Migrationsassay*

Um die Permeabilität von Endothelzellverbänden *in vitro* zu erforschen wurde der Transwell™ Migrationsassay (Corning™ Costar™ Transwell™, Corning, USA) verwendet [127]. Dazu wurden permeable Zellkultureinsätze in Mikrotiterplatten (engl.: microwell plate; engl.: well = Senke, Schacht) eingesetzt, wodurch die einzelnen Wells in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt wurden. Auf der permeablen Trennmembran wurde ein Monolayer (= einzelne Zellschicht) aus humanen Endothelzellen kultiviert. Diese endotheliale Barriere musste bei dem Migrationsassay überwunden werden. Die Endothelzellen wurden vorab unterschiedlich stimuliert und im Anschluss auf eine Permeabilitätsänderung untersucht. In das untere Kompartiment wurde CXCL8 (= Interleukin-8) als Chemoattraktant (Lockstoff) gegeben und in das obere Kompartiment isolierte neutrophile Granulozyten. Nach einer Stunde wurde mittels FACS ermittelt, wie viele Leukozyten über die endotheliale Barriere in das untere Kompartiment transmigriert sind. In Zusammenschau der Anzahl transmigrierter Zellen

in Verbindung mit dem Stimulus der Endothelzellen konnte man Rückschlüsse auf die Wirkung des Stimulus auf die Endothelpermeabilität ziehen.



**Abbildung 3: Migrationsassay**

*Permeable Zellkultureinsätze mit einer Porengröße von 8 µm unterteilen die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte in ein oberes und ein unteres Kompartiment. Auf der permeablen Membran, welche sich in Endothelzellmedium befindet, wird eine Endothelzellschicht bis zur Konfluenz kultiviert.*

In dem vorliegenden Versuch wurden humane Endothelzellen (HUVECs; HUVEC-c pooled, PromoCell, Lot: 405Z020) ( $1 \times 10^5$  Zellen/Well) in Endothelzellmedium (siehe 3.2.7.1) auf Corning™ Falcon™ Zellkultureinlagen mit 8 µm Porengröße (Corning, USA) bis zur Konfluenz kultiviert. Die HUVEC-Monolayer wurden mit Uromodulin ( $c = 3 \mu\text{g/ml}$ ) bzw. PBS (Negativkontrolle) stimuliert und 5 Stunden im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) inkubiert. In der Zwischenzeit wurden humane neutrophile Granulozyten isoliert (siehe 3.2.7.2). Nach der fünfstündigen HUVEC-Stimulation wurden die neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^5$  / Well) in das obere Kompartiment des Transwell-Systems auf die Endothelzellschicht gegeben und für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  in den Brutschrank gestellt. Die neutrophilen Granulozyten waren dabei in einem HBSS-Puffer suspendiert, welcher 0,1% Glukose, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,25% BSA und 10mM HEPES (Sigma-Aldrich) enthielt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt war. In den unteren Kompartimenten des Transwell-Systems befanden sich entweder rekombinantes humanes CXCL8 (100 ng/ml; PeproTech Inc., Rocky Hill, USA) in HBSS-Puffer als Chemoattraktant bzw. ausschließlich HBSS-Puffer (Negativkontrolle).

Nach einer Stunde wurden die Zellkultureinsätze entfernt und die Anzahl transmigrierter neutrophiler Granulozyten im unteren Kompartiment ermittelt. Dazu wurden die Granulozyten mit einem anti-CD66b-Antikörper (Pacific Blue™ Maus-anti-Human CD66b (clone: G10F5),  $5 \mu\text{g/ml}$ ; BioLegend, San Diego, USA) und einem anti-CD15-Antikörper (APC Maus-anti-Human CD15 (SSEA-1) (clone: W6D3), BioLegend,  $5 \mu\text{g/ml}$ ) markiert sowie fluoreszierende Mikrosphären (Coulter™ Flow-Count™ Fluorospheres, Beckman Coulter) hinzugegeben und anschließend mittels FACS (Gallios, Beckman Coulter) ermittelt, wie viele neutrophile Granulozyten innerhalb einer

Stunde über die Endothelzellschicht in das untere Kompartiment transmigriert sind. Die Auswertung erfolgte mit der Kaluza Analysesoftware (Beckman Coulter). Um die Intaktheit des Endothel-Monolayers nach dem Experiment zu überprüfen, wurde der HUVEC-Monolayer unter dem Mikroskop sorgfältig begutachtet und zusätzlich mit einer Schnellfärbung (Hemacolor® Schnellfärbung von Blutaussstrichen; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angefärbt und inspiziert.

### **3.2.8 Durchflusszytometrie**

#### *3.2.8.1 Einfluss von Uromodulin auf die endotheliale Expression der Oberflächenmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1*

Um die Expressionslevel der Oberflächenmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf stimulierten HUVECs zu ermitteln, wurden humane Endothelzellen (HUVEC, Passage II oder III) bis zur Konfluenz kultiviert und mit Uromodulin (3 µg/ml), PBS (Negativkontrolle) oder rekombinantem humanen TNF-α (rhTNF-α, 10ng/ml, PeproTech; Positivkontrolle) für 6 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und 20 Minuten mit einem Maus-anti-Human-CD62E (E-Selektin)-Antikörper (clone HAE-1f, BioLegend, 5µg/ml), Maus-anti-Human-CD54 (ICAM-1)-Antikörper (clone HA58, BioLegend, 5µg/ml) und einem Maus-anti-Human-CD106 (VCAM-1)-Antikörper (clone 4B2, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) angefärbt, gefolgt von einem sekundären Ziege-anti-Maus PE-Antikörper (BD Pharmingen™, Franklin Lakes, USA; 5 µg/ml). Nach 20 Minuten wurden die Zellen mit 1,9 ml eisgekühlter FACS-Lyselösung (BD FACST™ Lysing Solution, BD Biosciences) fixiert und unmittelbar daran anschließend abzentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in HBSS-Puffer resuspendiert und die Menge der exprimierten Oberflächenmoleküle wurde mittels Durchflusszytometrie (Gallios, Beckman Coulter) ermittelt und mithilfe der Kaluza Analysesoftware (Beckman Coulter) ausgewertet.

#### *3.2.8.2 β2-Integrin-Aktivierungsassay*

Neutrophile Granulozyten wurden aus humanem Vollblut gesunder Blutspender isoliert (siehe 3.2.7.2). Anschließend wurde Uromodulin (3µg/ml), PMA (Sigma-Aldrich, 1 nM; Positivkontrolle) oder HBSS (Negativkontrolle) in Mikroreaktionsgefäße hinzugegeben, welche Maus-anti-Human β2-Integrinaktivierungs-Antikörper KIM127 (10 µg/ml;

InVivo, Hennigsdorf, Deutschland) oder mAB 24 (10 µg/ml; Hycult Biotech, Hycultec GmbH, Beutelsbach, Deutschland) oder IgG1-Isotypkontroll-Antikörper (clone: 11711, R&D Systems, 10 µg/ml) enthielten, und für 5 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Das vorgewärmte Substanz-Antikörper-Gemisch und die angereicherten neutrophilen Granulozyten ( $5 \times 10^5$  / Probe) wurden sodann zusammengeführt. Anschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 40 µl für weitere 5 Minuten bei 37 °C stimuliert. Die Reaktion wurde durch das Hinzugeben von 900 µl eisgekühlter FACS-Lyselösung (BD FACS™ Lysing Solution, BD Biosciences) gestoppt und die Mikroreaktionsgefäße umgehend auf Eis gelagert. Nach 10-minütiger Fixierung wurden die Zellen gewaschen und mit dem sekundären Ziege-anti-Maus PE-Antikörper (BD Pharmingen™, 5 µg/ml) angefärbt.

Um humane neutrophile Granulozyten zu identifizieren, wurden die Zellen schließlich mit den Antikörpern Maus-anti-Human CD15 (clone W6D3, BioLegend oder clone VIMC6, 5 µg/ml; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und Maus-anti-Human CD66abce (clone TET2, Miltenyi Biotec, 5 µg/ml) angefärbt. Der Aktivierungsstatus der β2-Integrine wurde mittels Durchflusszytometrie (Gallios, Beckman Coulter) bestimmt. Des Weiteren wurden die Gesamtmengen der Oberflächenproteine Mac-1 und LFA-1 auf aktivierten neutrophilen Granulozyten ermittelt. Hierfür wurden die Antikörper Maus anti-Human CD11b (clone ICRF44, BioLegend, 10 µg/ml) oder Maus anti-Human CD11a (clone HI111, BioLegend, 10 µg/ml) verwendet, gefolgt von einem sekundären Ziege-anti-Maus PE-Antikörper (BD Pharmingen™, 5 µg/ml).

### 3.2.8.3 Bindungsassay von löslichem ICAM-1

Der Bindungsassay von löslichem ICAM-1 wurde wie von Kurz et al. beschrieben durchgeführt [128]. Hierbei wurden neutrophile Granulozyten verwendet, welche aus dem Knochenmark von WT-Mäusen mit Hilfe eines Percoll-Gradienten gemäß des Herstellerprotokolls (Sigma-Aldrich) isoliert und in HBSS-Puffer suspendiert angereichert wurden. Die angereicherten neutrophilen Granulozyten wurden sodann mit Uromodulin (3 µg/ml), HBSS-Puffer (Negativkontrolle) oder rekombinanten murinen CXCL1 (rmCXCL1 100ng/ml, PeproTech; Positivkontrolle) in Gegenwart von rekombinanten murinen ICAM-1 (rmICAM-1, hFc chimera, 20µg/ml, R&D Systems), Ziege-anti-Human Fcγ-Biotin (eBioscience Inc., San Diego, USA) und Streptavidin-

PerCP-Cy5.5 (BioLegend) für 3 Minuten bei 37 °C in HBSS-Puffer stimuliert. Das verwendete Biotin-Streptavidin-System diente dabei der späteren durchflusszytometrischen Detektion des ICAM-1. Die Reaktion wurde durch das Hinzufügen von eisgekühlter FACS-Lyselösung (BD FACS™ Lysing Solution, BD Biosciences) gestoppt. Anschließend wurden die Granulozyten mit einem Pacific Blue™ Ratte-anti-Maus-Ly6G-Antikörper (1A8, BioLegend, 5µg/ml) angefärbt. Mittels FACS-Analyse wurde die Menge an löslichem ICAM-1 ermittelt, die an Ly6G+ Zellen gebunden hat.

### 3.3 Statistik

Alle Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM), als kumulierte Häufigkeiten oder repräsentative Bilder angegeben. Die gewählten Gruppengrößen orientierten sich an Protokollen vorheriger Experimente. Abhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen wurden unterschiedliche statistische Tests verwendet. Für den Vergleich zweier unabhängiger Versuchsgruppen wurde ein ungepaarter t-Test angewandt. Für den Vergleich von drei oder mehreren Versuchsgruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (engl.: one-way analysis of variance = one-way ANOVA) oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (engl.: two-way ANOVA) mit entweder einem Sidak- oder Tukey-Test als Post-hoc-Mehrfachvergleich verwendet. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert < 0,05 angenommen und wie folgt angegeben: \*: <0,05; \*\*: <0,01; \*\*\*: <0,005.

## 4 Ergebnisse

Um die Wirkung von Uromodulin auf den Prozess der Leukozytenrekrutierung zu untersuchen, wurden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Modelle herangezogen. Dabei handelte es sich sowohl um murine als auch um humane Modelle.

In einer ersten Versuchsreihe an *in vivo*-Experimenten wurde Uromodulin lokal in den Mausemtermuskel injiziert. Nachfolgend wurde in der Emtermuskelmikrozirkulation die Entzündungsreaktion beobachtet. Der Fokus wurde hierbei allgemein auf die Interaktion von neutrophilen Granulozyten innerhalb des Blutkreislaufes mit dem Endothel postkapillärer Venolen gelegt.

Nachdem in diesen ersten *in vivo*-Experimenten eine Wirkung von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung festgestellt werden konnte, war das nächste Ziel, weitere Details dieses Prozesses zu ergründen und eine potentielle Zielstruktur von Uromodulin ausfindig zu machen. Dafür war es entscheidend, die beiden Interaktionspartner bei der Leukozytenrekrutierung – sprich die Leukozyten und das Endothel – getrennt voneinander zu betrachten. Dafür boten sich wiederum verschiedene *in vitro*- als auch *in vivo*-Modelle an, die jeweils eine der beiden Komponenten in den Mittelpunkt rückten.

### 4.1 Der Einfluss von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*

#### 4.1.1 Die Wirkung von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo* im Mausemtermuskelmodell

In den ersten Experimenten dieser Forschungsarbeit wurde die Leukozytenrekrutierung *in vivo* untersucht. Um zu ermitteln welche Rolle Uromodulin (siehe Abb. 11, Kapitel 8 für die polymerisierte Struktur) bei diesem grundlegenden Vorgang im Rahmen von Entzündungsprozessen spielt und mögliche proinflammatorische Eigenschaften dieses Proteins zu ermitteln, wurde das Mausemtermuskel-Modell herangezogen. Dabei kann mittels Intravitalmikroskopie die akute Entzündungsreaktion in der Mikrozirkulation *in vivo* beobachtet werden.

Hierbei wurde Uromodulin, welches aus humanem Urin gewonnen wurde, WT-Mäusen intraskrotal (i.s.) appliziert. Zwei Stunden später wurde der Musculus cremaster wie oben beschrieben präpariert und pro Versuchstier mindestens 3 geeignete postkapilläre Venolen mikroskopiert. Diese wurden sodann hinsichtlich der Leukozyten-Rolling Flux

Fraction (RFF), Anzahl adhärenter Leukozyten und der Leukozyten-Rollgeschwindigkeiten ausgewertet.

#### *4.1.1.1 Die Wirkung von Uromodulin auf das Capturing und Rolling*

Um zu untersuchen, ob Uromodulin den initialen Schritt der Leukozytenrekrutierungskaskade beeinflusst, wurden die in der Intravitalmikroskopie aufgezeichneten und zuvor mit Uromodulin stimulierten Venolen hinsichtlich der Anzahl am Endothel entlangrollender Leukozyten ausgewertet und die Rolling Flux Fraction ermittelt. Die i.s.-Injektion von Uromodulin führte zu einer signifikant verminderten RFF sowohl im Vergleich zur Negativkontrolle (NaCl 0,9%) als auch im Vergleich zu einer i.s.-Applikation von Humanalbuminlösung (hALB) (Abb. 4A). Dies deutet auf einen proinflammatorischen Effekt von Uromodulin hin.

#### *4.1.1.2 Die Wirkung von Uromodulin auf die Rollgeschwindigkeit*

Ein weiterer wichtiger Parameter, der den Grad einer Entzündung und die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel widerspiegelt, ist die Rollgeschwindigkeit des Leukozyten entlang des Gefäßendothels. Um zu untersuchen, ob Uromodulin die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten beeinflusst, wurde in Venolen die Rollgeschwindigkeiten rollender Leukozyten ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Applikation von Uromodulin zu einer signifikant reduzierten Rollgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe führte, was die Annahme der Uromodulin-vermittelten Entzündungsreaktion untermauert. Da eine starke Entzündung mit einer Integrinaktivierung auf den Leukozyten sowie einer Hochregulierung von endotheliale E-Selektin einhergeht, ermöglicht die Applikation eines blockierenden anti-E-Selektin-Antikörpers, das E-Selektin-vermittelte Rollen zu untersuchen [42]. Wie Abbildung 4C zu entnehmen ist, führte die intravasale Applikation dieses anti-E-Selektin-Antikörpers zu einer signifikanten Steigerung der Leukozytenrollgeschwindigkeit in Uromodulin-behandelten Mäusen mit einer Verschiebung der Geschwindigkeitsverteilung in Richtung höherer Geschwindigkeiten. Diese Daten sprechen für eine Expression von E-Selektin auf dem entzündeten Endothel.

#### *4.1.1.3 Die Wirkung von Uromodulin auf die Aktivierung und Adhäsion*

Um zu untersuchen, ob Uromodulin die Leukozytenadhäsion am Endothel während der Leukozytenrekrutierungskaskade beeinflusst, wurden die aufgezeichneten Venolen

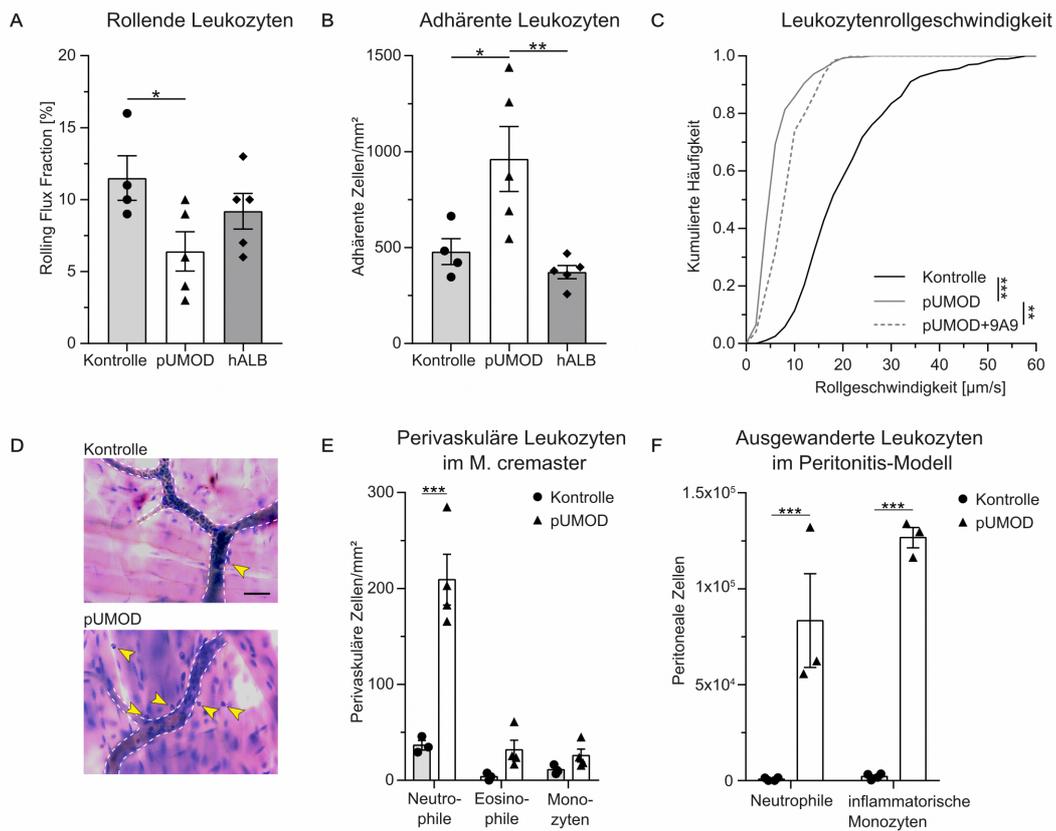
hinsichtlich der Anzahl am Endothel adhärenter Leukozyten ausgewertet. Die i.s.-Injektion von Uromodulin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl adhärenter Leukozyten/mm<sup>2</sup> Gefäßfläche im Vergleich zur Negativkontrolle (NaCl 0,9%) oder einer Humanalbuminlösung (hALB) (Abb. 4B). Auch dies deutet – wie das verminderte Rollen – auf einen proinflammatorischen Effekt von Uromodulin hin.

#### 4.1.1.4 Die Wirkung von Uromodulin auf das Crawling und die Transmigration

Um zu untersuchen, ob Uromodulin den letzten Schritt der Leukozytenrekrutierungskaskade, also die Auswanderung in das extravasale Gewebe, beeinflusst, wurden die im Anschluss an die IVM-Versuche entnommenen und fixierten Kremastermuskeln mit einer Giemsa-Lösung angefärbt (Abb. 4D). In diesen Präparaten wurde die Anzahl der in das perivaskuläre Gewebe ausgewanderten neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie mononukleären Zellen ermittelt. Im extravasalen Gewebe der Uromodulin-stimulierten Kremastermuskeln zeigten sich deutlich erhöhte Zahlen von *in vivo* transmigrierten Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl 0,9% - Injektion) (Abb. 4E). Dieser Unterschied wird zudem in den unten stehenden Mikrofotografien veranschaulicht (Abb. 4D).

#### 4.1.2 Die Wirkung von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo* im Peritonitis-Modell

Wie eingangs beschrieben, sind neutrophilen Granulozyten typischerweise die ersten Immunzellen, welche die Entzündungsstelle erreichen und dominieren zusammen mit ortsständigen Gewebsmakrophagen das Bild von Immunzellen während der frühen Entzündungsreaktion [9, 10]. Aus dem Blut rekrutierte Monozyten hingegen treten erst im Verlauf hinzu, verbleiben aber längere Zeit im entzündeten Gewebe [10]. Nachdem zuerst primär die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten untersucht worden ist, wurde in weiteren Experimenten untersucht, inwieweit Uromodulin zusätzlich die Rekrutierung von Monozyten beeinflussen kann. Dazu wurde 6 Stunden nach einer i.p.-Applikation von Uromodulin in WT-Mäusen untersucht, wie viele neutrophile Granulozyten und Monozyten in den Peritonealraum ausgewandert sind (Abb. 4F). Eine Uromodulin-Stimulation führte dabei zu einer erheblichen Extravasation von neutrophilen Granulozyten und Monozyten in den Peritonealraum, wohingegen eine NaCl 0,9%-Applikation (Negativkontrolle) keinen Effekt zeigte (Abb. 4F).



#### Abbildung 4: Uromodulin-induzierte Leukozytenrekrutierung in der murinen Mikrozirkulation

Polymerisiertes Uromodulin (pUMOD), NaCl 0,9% (Kontrolle) oder Humanalbumin (hALB) wurden 2 Stunden vor Intravitalmikroskopie von postkapillären Venolen des M. cremaster i.s. injiziert. (A) Die Leukozyten-Rolling Flux Fraction und (B) die Anzahl adhärenente Leukozyten wurden in 17 (Kontrolle), 23 (pUMOD) und 18 (hALB) Venolen von n=4-5 Mäusen pro Gruppe in postkapillären Venolen des M. cremaster beurteilt. (C) Die Leukozyten-Rollgeschwindigkeiten von n=392 (Kontrolle), 274 (pUMOD) und 123 (pUMOD+9A9) Zellen in 4-5 Mäusen pro Gruppe wurden ausgewertet. Die Uromodulin-Applikation reduzierte die Rolling Flux Fraction und die Rollgeschwindigkeit von Leukozyten und erhöhte die Anzahl adhärenente Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe (einfaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). (D) Giemsa-Färbung (repräsentative Mikrofotografien von n=3-4 Mäusen pro Gruppe) von Cremastermuskulatur. Die Pfeilspitzen zeigen auf perivaskuläre Leukozyten (Maßstabskalen=30µm). (E) Ermittelte Anzahl an perivaskulären neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und mononukleären Zellen in 37 (Kontrolle) und 54 (pUMOD) perivaskulären Regionen von n=3-4 Mäusen pro Gruppe (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, Sidak Post-hoc-Mehrfachvergleich). (F) Ermittelte Anzahl an in den Peritonealraum rekrutierter neutrophiler Granulozyten und inflammatorischer Monozyten 6 Stunden nach i.p. Injektion von Uromodulin und NaCl 0,9% (Kontrolle). Neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten wurden entsprechend als CD45+/CD11b+/Gr1+/CD115- bzw. CD45+/CD11b+/Gr1+/CD115+ Zellen definiert (n=3-4 Mäuse pro Gruppe, zweifaktorielle ANOVA, Sidak Post-hoc-Mehrfachvergleich). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,005$ ; die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM), als kumulierte Häufigkeiten oder repräsentative Bilder angegeben.

Durch diese Reihe an Experimenten konnte gezeigt werden, dass polymerisiertes Uromodulin eine Leukozytenrekrutierung *in vivo* in der Mikrozirkulation der Maus induziert. Zusammengenommen weisen diese Daten deutlich auf eine proinflammatorische Rolle von Uromodulin *in vivo* hin, wobei das Rollen, die Rollgeschwindigkeit, die Adhäsion sowie die Extravasation von Leukozyten beeinflusst

wird. Uromodulin reduziert dabei die Leukozytenrollgeschwindigkeit sowie die Anzahl rollender Leukozyten entlang des entzündeten Endothels und verstärkt die Leukozytenadhäsion und -extravasation *in vivo*.

#### 4.1.3 Systemische Leukozytenzahl und hämodynamische und mikrovaskuläre Parameter

Um zu gewährleisten, dass die einzelnen Versuchsgruppen hinsichtlich der hämodynamischen Parameter untereinander vergleichbar sind, wurden jeweils der Gefäßdurchmesser, die Flussgeschwindigkeit des Blutes und die Wandscherrate bestimmt. Zusätzlich wurde von jedem Versuchstier ein Differentialblutbild mit systemischer Leukozytenzahl angefertigt. Zwischen den unterschiedlichen Versuchsgruppen fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der genannten Parameter (Tab. 1).

**Tabelle 1: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen**

*Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit, Wandscherrate und systemische Leukozytenzahl von WT-Mäusen, welche zwei Stunden vor Intravitalmikroskopie mit NaCl 0,9% (Kontrolle), polymerisiertem Uromodulin (pUMOD) oder humanem Serumalbumin (hALB) stimuliert wurden (MW±SEM; einfaktorische ANOVA, Tukey-Test als Post-hoc-Mehrfachvergleich).*

Stimulus	Mäuse n	Venolen n	Gefäßdurchmesser [µm]	Blutflussgeschwindigkeit [µm s <sup>-1</sup> ]	Wandscherrate [s <sup>-1</sup> ]	Systemische Leukozytenzahl [µl <sup>-1</sup> ]
<b>Kontrolle</b>	4	17	31 ± 1	1682 ± 139	1297 ± 86	4190 ± 643
<b>pUMOD</b>	5	23	31 ± 1	1926 ± 159	1554 ± 116	5858 ± 1081
<b>hALB</b>	5	18	31 ± 1	1917 ± 148	1549 ± 136	6342 ± 490
			n.s. (p=0,8081)	n.s. (p=0,4686)	n.s. (p=0,2349)	n.s. (p=0,8386)

#### 4.2 Der Einfluss von Uromodulin auf Adhäsions-relevante Oberflächenmoleküle von Endothelzellen und Leukozyten *in vitro*

Wie in den initialen *in vivo*-Versuchen gezeigt werden konnte, ruft das intraskrotal applizierte Uromodulin eine starke Entzündungsreaktion mit einer funktionellen Hochregulierung von E-Selektin auf dem Endothel hervor. Mit dem zusätzlichen Wissen,

dass Uromodulin in der Literatur als ein TLR4-Ligand beschrieben worden ist und eine Stimulation von TLR4 durch den Liganden LPS eine Hochregulierung von E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 auf HUVECs und eine  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten hervorruft, wurde in den nachfolgenden *in vitro*-Versuchen untersucht, ob Uromodulin dazu in der Lage ist, eine Expression bzw. Aktivierung dieser Oberflächenmoleküle zu bewirken [18, 103, 129, 130].

#### **4.2.1 Die Wirkung von Uromodulin auf die Expression endothelialer, für die Transmigration relevanter Oberflächenmoleküle**

Um die Wirkung von Uromodulin auf die Expression der proinflammatorischen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Modell mit primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) verwendet. Hierfür wurde ein HUVEC-Monolayer mit Uromodulin (3  $\mu$ g/ml), PBS (Negativkontrolle) oder rekombinantem humanen TNF- $\alpha$  (rhTNF- $\alpha$ , 10ng/ml, PeproTech; Positivkontrolle) für 6 Stunden stimuliert und anschließend mittels FACS-Analyse ermittelt, ob Uromodulin eine Expression dieser Oberflächenmoleküle auf den Endothelzellen direkt induzieren konnte.

Auf HUVECs der Negativkontrolle war VCAM-1 nicht konstitutiv exprimiert und lediglich geringe Mengen von E-Selektin und ICAM-1 (Abb. 5A-C). Im Vergleich dazu induzierte TNF- $\alpha$  (Positivkontrolle) erwartungsgemäß eine starke Expression von VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1 auf der Endotheloberfläche. Überraschenderweise wurde durch Uromodulin keines dieser proinflammatorischen Moleküle signifikant hochreguliert (Abb. 5A-C).

#### **4.2.2 $\beta$ 2-Integrin-Aktivierungsassay**

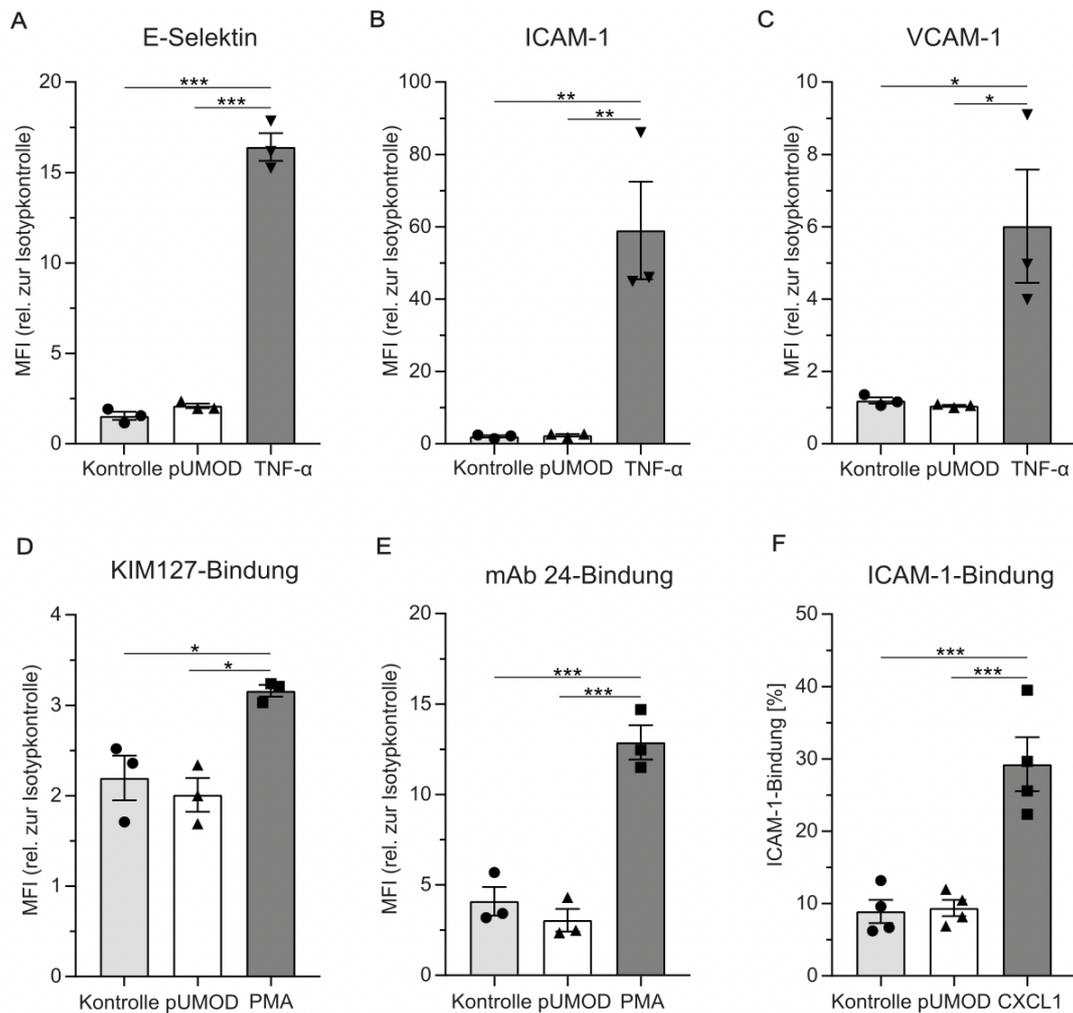
Bei den Experimenten zur Wirkung von Uromodulin auf den Aktivierungsstatus von  $\beta$ 2-Integrinen auf Leukozyten wurden sowohl der Effekt auf humane als auch murine neutrophile Granulozyten betrachtet.

In einer ersten Versuchsreihe wurden dafür isolierte humane neutrophile Granulozyten (siehe 3.2.7.2) mit Uromodulin, HBSS (Negativkontrolle) oder PMA (Positivkontrolle) stimuliert. Unter Verwendung der für die Integrinaktivierung spezifischen Antikörper KIM127 (bindet an „intermediate affinity“- und „high affinity“- Konformation von LFA-1) und mAB24 (bindet nur die „high affinity“- Konformation von LFA-1) wurde der

Aktivierungsstatus der  $\beta$ 2-Integrine mittels Durchflusszytometrie analysiert [131]. Zusätzlich wurde der Expressionsgrad der Oberflächenmoleküle LFA-1 (Leukocyte function-associated antigen 1) und Mac-1 (Macrophage-1 antigen) nach Uromodulin-Stimulation untersucht. Wie den Abbildungen 5D und 5E zu entnehmen ist, führte lediglich die Stimulation mit PMA zu aktivierten Formen von  $\beta$ 2-Integrinen, wohingegen die Stimulation mit Uromodulin keinen Effekt zeigte. Zudem hatte Uromodulin keinen Einfluss auf die Expression von LFA-1 und Mac-1 (Abb. 12, Kapitel 8). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Uromodulin nicht direkt dazu in der Lage ist,  $\beta$ 2-Integrine in ihre aktivierte Form zu überführen.

Da aktivierungsspezifische Antikörper für  $\beta$ 2-Integrine nur im humanen System bekannt sind, verwendeten wir zur Untersuchung der murinen  $\beta$ 2-Integrine einen Bindungsassay mit rekombinantem ICAM-1. Die Bindung von löslichem ICAM-1 spiegelt eine CD11a (LFA-1)-Konformation mit hoher Affinität (high affinity conformation state) wider, was eine Grundvoraussetzung für die feste Leukozytenadhäsion *in vivo* darstellt. Für diesen Ansatz wurden neutrophile Granulozyten verwendet, welche aus murinem Knochenmark mit Hilfe eines Percoll-Gradienten gemäß des Herstellerprotokolls (Sigma-Aldrich) isoliert wurden. Die isolierten Zellen wurden sodann mit Uromodulin, HBSS (Negativkontrolle) oder rekombinantem murinen CXCL1 (Positivkontrolle) stimuliert, um eine GPCR-vermittelte Integrinaktivierung hervorzurufen. Mittels FACS-Analyse wurde die Menge an löslichem ICAM-1 ermittelt, die an Ly6G<sup>+</sup> Zellen gebunden hat. Die Bindung von ICAM-1 an neutrophile Granulozyten der Negativkontrollgruppe wurde als Referenz auf den Wert 1 gesetzt. Eine Stimulation der Zellen mit CXCL-1 führte zu einer signifikant erhöhten ICAM-1-Bindung im Vergleich zu der Negativkontrolle (Abb. 5F). Im Gegensatz dazu induzierte eine Uromodulin-Stimulation keine erhöhte ICAM-1-Bindung verglichen mit der Kontrollgruppe, führte also zu keiner  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung (Abb. 5F).

Diese Ergebnisse passen zu den Daten aus den Versuchen mit den humanen neutrophilen Granulozyten, bei denen durch Uromodulin ebenfalls keine Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen hervorgerufen wurde.



**Abbildung 5: Uromodulin induziert keine Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen und führt nicht zur  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten.**

HUVEC-Monolayer wurden mit Uromodulin, TNF- $\alpha$  oder der Negativkontrolle stimuliert und anschließend die Oberflächenexpression von (A) E-Selektin, (B) ICAM-1 und (C) VCAM-1 ermittelt (n=3 unabhängige Experimente, einfaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich, mittlere Fluoreszenzintensität MFI=Mean fluorescence intensity). Isolierte humane neutrophile Granulozyten wurden mit Uromodulin, PMA oder der Negativkontrolle stimuliert und die (D) LFA-1 „intermediate affinity“-Konformation und (E) LFA-1 „intermediate affinity“- und „high affinity“-Konformation wurden ermittelt (n=3 unabhängige Experimente, einfaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). (F) Neutrophile Granulozyten aus murinem Knochenmark wurden mit Uromodulin, CXCL1 oder der Negativkontrolle stimuliert und anschließend die Fähigkeit der Zellen analysiert lösliches ICAM-1 zu binden (n=4 Mäuse/Gruppe, einfaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,005$ ; die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

## 4.3 Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität *in vitro*

### 4.3.1 Ermittlung der Permeabilität von Endothelzellverbänden *in vitro* (Transwell Migrationsassay)

In Versuchen von Kooperationspartnern konnte gezeigt werden, dass Uromodulin gewebständige Makrophagen zu einer TNF- $\alpha$ -Produktion anregen kann (Abb. 8, Kapitel 7). Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass Uromodulin isoliert auf das Endothel im Sinne einer Impedanzminderung wirken kann (Abb. 10, Kapitel 7).

In den folgenden Versuchen sollte nun mithilfe eines Transwell-Migrationsassays dieser Effekt auf das Endothel genauer beleuchtet werden. Unabhängig von Makrophagenvermittelten Effekten sollte hierbei der Einfluss von Uromodulin auf die Leukozytentransmigration untersucht werden.

Für den Migrationsassay wurden permeable Zellkultureinsätze in Mikrotiterplatten eingesetzt, wodurch die einzelnen Wells in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt wurden. Auf der permeablen Trennmembran wurde ein konfluenter Monolayer aus humanen Endothelzellen (HUVECs) kultiviert, wobei diese endotheliale Barriere bei dem Migrationsassay überwunden werden muss. Anschließend wurde die endotheliale Zellschicht für 5 Stunden mit Uromodulin oder PBS (Negativkontrolle) stimuliert. In das untere Kompartiment wurde entweder CXCL8 (Interleukin-8) als Chemoattraktant (Lockstoff) oder lediglich HBSS-Puffer gegeben. Nach 5-stündiger Uromodulin-Stimulation wurden in das obere Kompartiment isolierte humane neutrophile Granulozyten gegeben und für eine Stunde dort belassen. Im Anschluss wurde mittels FACS-Analyse ermittelt, wie viele Granulozyten innerhalb dieser Stunde durch die Endothelzellschicht in das untere Kompartiment transmigriert sind.

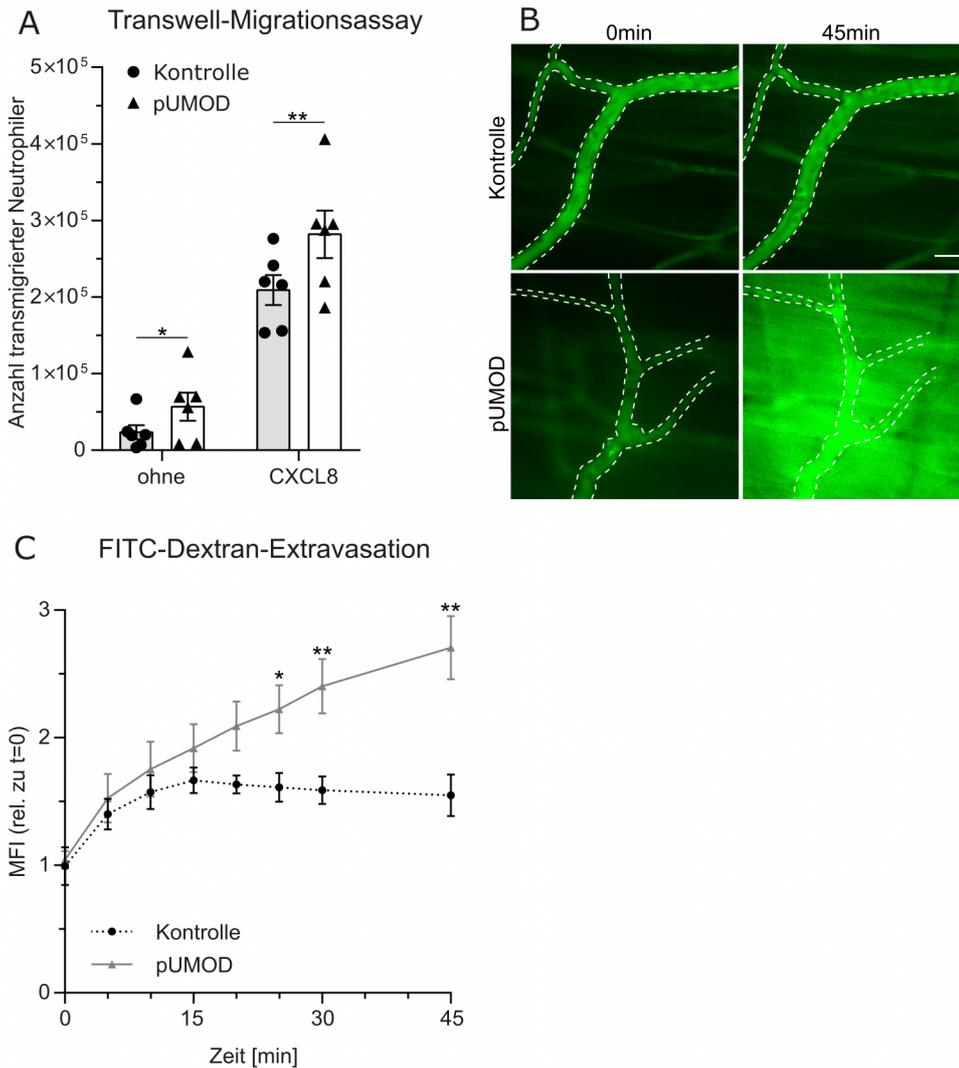
Wie der Abbildung 6A zu entnehmen ist, wurde durch den Lockstoff CXCL8 erwartungsgemäß eine verstärkte Transmigration im Vergleich zur Kontrolle ohne Lockstoff hervorgerufen. Die aufgeführten Daten des hier durchgeführten Migrationsassays zeigen zudem eine signifikant erhöhte Anzahl transmigrierter neutrophiler Granulozyten nach vorheriger Uromodulin-Stimulation der Endothelzellschicht im Vergleich zur Negativkontrolle. Interessanterweise trifft dies unabhängig von dem verwendeten Lockstoff zu, Uromodulin erhöht also sowohl ohne als auch mit Lockstoff die Anzahl transmigrierter Leukozyten im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Daten deuten darauf hin, dass Uromodulin über eine direkte

Wirkung auf das Endothel die Leukozytentransmigration in das entzündete Gewebe erleichtern kann.

#### 4.4 Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität *in vivo*

##### 4.4.1 Ermittlung der mikrovaskulären Endothelpermeabilität *in vivo* mittels FITC-Dextran

Um die Wirkung von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz wiederum das Mausemtermuskel-Modell verwendet. Diesmal wurde nach der Emasterpräparation und dreistündiger Uromodulin-Stimulation über den Karotiskatheter FITC-Dextran 150 kDa appliziert. Mittels IVM-Fluoreszenzmikroskopie wurde über 45 Minuten die extravasale Anreicherung von FITC-Dextran im Bereich von postkapillären Venolen ermittelt. In diesen *in vivo*-Experimenten konnte nach Stimulation mit Uromodulin eine im Vergleich zur Negativkontrolle (NaCl 0,9%) signifikant erhöhte extravasale FITC-Dextran-Anreicherung im Zeitverlauf von 45 Minuten festgestellt werden (Abb. 6C). Die gemessene extravasale Intensitätssteigerung des fluoreszierenden FITC-Dextran-Signals ist dabei Korrelat der beobachteten Permeabilitätssteigerung (Abb. 6B). Diese Ergebnisse sind mit einem direkten Effekt von Uromodulin auf die Endothelpermeabilität vereinbar und untermauern die bereits *in vitro* beobachtete erhöhte Endothelpermeabilität nach einer Uromodulin-Stimulation.



**Abbildung 6: Uromodulin erleichtert die Transmigration neutrophiler Granulozyten über einen HUVEC-Monolayer und erhöht die vaskuläre Permeabilität in vitro und in vivo**

(A) Anzahl neutrophiler Granulozyten, die entlang eines CXCL8- oder HBSS (ohne) (Negativkontrolle)-Gradienten über einen HUVEC-Monolayer transmigrieren. Die HUVECs wurden zuvor mit Uromodulin (pUMOD) oder der Negativkontrolle (Kontrolle) stimuliert ( $n=6$  unabhängige Experimente, zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, Sidak Post-hoc-Mehrfachvergleich). (B) Intravitalmikroskopie von postkapillären Venolen in Uromodulin (pUMOD)- und NaCl 0,9% (Kontrolle)-stimulierten Kremastermuskeln in WT-Mäusen. Erfassung der vaskulären Permeabilitätsänderung über die Zeit nach intravasaler FITC-Dextran-Injektion (repräsentative Mikrofotografien von  $n=6$  Mäusen pro Gruppe, gestrichelte Linien markieren Blutgefäße, Maßstabsbalken=30µm) und (C) Quantifizierung mittels Erfassen der Änderung der mittleren Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity = MFI) im perivaskulären Gewebe ( $n=6$  Mäuse pro Gruppe, ungepaarter t-Test). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) oder repräsentative Bilder angegeben.



# 5 Diskussion

## 5.1 Zusammenfassung

Uromodulin (UMOD) ist ein Glykoprotein, welches von Tubulusepithelzellen gebildet und in den Urin sezerniert wird. Im Tubuluslumen polymerisiert das Uromodulin (pUMOD), wo es dann unter anderem als protektiver Faktor gegen bakterielle Infektionen oder Nierensteinbildung wirksam wird sowie den Elektrolyttransport reguliert. Interessanterweise wird Uromodulin in geringeren Mengen zudem nach basolateral in das Nierenparenchym sezerniert. Das basolateral sezernierte Uromodulin wird in den Blutkreislauf transportiert und zirkuliert darin als Monomer (mUMOD), durch das es seine systemischen homöostatischen Funktionen ausübt. Im Rahmen pathologischer Zustände kann das pUMOD akkumulieren und aus dem Tubuluslumen in das extratubuläre Gewebe gelangen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Fähigkeit von extratubulärem polymerisiertem Uromodulin untersucht als ein damage associated molecular pattern (DAMP)-Molekül zu wirken und auf diese Weise eine lokale Entzündungsreaktion anzustoßen.

Um eine mögliche Rolle von pUMOD auf die Aktivierung und Rekrutierung neutrophiler Granulozyten *in vivo* näher zu erforschen, untersuchten wir mittels Intravitalmikroskopie und Giemsa-Färbung postkapilläre Venolen in Uromodulin-stimulierten Kremastermuskeln von C57BL/6 Wildtyp (WT)-Mäusen. Zudem wurde in einem Peritonitis-Modell die Wirkung von Uromodulin auf die Rekrutierung von Monozyten untersucht. Zusätzlich führten wir *in vitro*-Assays durch, um gezielt eine Wirkung von Uromodulin auf die Aktivierung von Endothelzelle und isolierten neutrophilen Granulozyten voneinander differenzieren zu können.

In unseren *in vivo*-Versuche konnten wir zeigen, dass sowohl intraskrotal als auch intraperitoneal appliziertes pUMOD zu einer erhöhten Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe führte. Uromodulin-behandelte Mäuse zeigten ein reduziertes Rollen von Leukozyten, reduzierte Rollgeschwindigkeiten und eine erhöhte Zahl adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen des Mausekremastermuskels *in vivo*. Zusätzlich erhöhte Uromodulin die Anzahl ausgewanderter Leukozyten in das umliegende Gewebe *in vivo*. Die Daten aus diesen *in vivo*-Modellen zeigen, dass eine Stimulation von extrarenalem Gewebe mit Uromodulin zu einer ausgeprägten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten führt, was eine starke Entzündungsantwort widerspiegelt.

Überraschenderweise zeigte sich in *in vitro*-Experimenten, dass Uromodulin keine direkte Hochregulierung adhäsionsrelevanter Oberflächenmoleküle auf Endothelzellen zur Folge hatte und keine direkte Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten bewirkte.

Ein möglicher Weg, über den Uromodulin seine immunmodulatorische Wirkung *in vivo* ausüben könnte, stellt die Uromodulin-vermittelte TNF- $\alpha$ -Freisetzung aus gewebständigen Makrophagen dar.

In Kooperationsprojekten konnten wir zeigen, dass F4/80-positive murine Makrophagen durch pUMOD zur TNF- $\alpha$ -Produktion angeregt werden, was diese Theorie untermauert. Dennoch könnte Uromodulin als ein pleiotropes multifunktionelles Molekül auch direkte Effekte auf die Endothelpermeabilität und die Anzahl transmigrierter Leukozyten aufweisen. Gestützt wird diese Annahme durch *in vitro*-Versuche, in denen wir zeigen konnten, dass pUMOD die endotheliale Permeabilität und die Leukozytenrekrutierung auch unabhängig von den durch TNF- $\alpha$ -vermittelten Effekten direkt beeinflusst.

Passend zu den gezeigten proinflammatorischen Eigenschaften sind folgende Daten, welche im Rahmen dieses Projekts entstanden sind. In diesen Experimenten konnten unsere Kooperationspartner eine Akkumulation von Uromodulin im extratubulären Interstitium in Nieren eines murinen neonatalen unilateralen Ureterobstruktionsmodells (murine neonatal unilateral ureteral obstruction (UUO) model) nachweisen, begleitet von Leukozyteninfiltration und Tubulusatrophie. Zudem konnten sie in Nieren von Patienten mit Nephritiden eine extratubuläre Ablagerung von Uromodulin mit begleitenden Leukozyteninfiltraten beobachten.

Zusammengenommen konnten wir mit unseren Experimenten die bedeutende Rolle von extratubulärem polymerisiertem Uromodulin bei der Aktivierung der Leukozytenrekrutierung *in vivo* zeigen, indem es den Arrest und die Extravasation von Leukozyten in entzündetes Gewebe unterstützt.

Diese Erkenntnisse untermauern die Annahme, dass Uromodulin Entzündungsprozesse moduliert und dabei eine entscheidende Funktion in der Immunantwort im Rahmen zahlreicher nephrologischer Erkrankungen einnehmen könnte.

## 5.2 Diskussion der Methoden

Wie eingangs erörtert, wird Uromodulin in der Literatur als ein sehr facettenreiches Protein beschrieben, welches unter anderem immunmodulatorische Eigenschaften zu

besitzen scheint. Daher wurden für die vorliegende Arbeit Methoden gewählt, mit welchen sich hervorragend die Wirkung von Uromodulin auf verschiedene Aspekte der Leukozytenrekrutierung untersuchen lassen. All diese Methoden sind überdies seit vielen Jahren gut in unserem Labor etabliert beziehungsweise wurden mit unseren Kooperationspartnern durchgeführt.

Die Wahl der Reihenfolge der Methoden folgte einer gewissen Struktur. Initial sollte im Mauskreastermuskel-Modell, also einem murinen *in vivo*-Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation während Entzündungsreaktionen, untersucht werden, welche Reaktion eine intraskrotale Injektion von Uromodulin hervorruft. Nachdem sich hierbei ein proinflammatorischer Effekt von Uromodulin zeigte, konnte in den nachfolgenden *in vitro*- und *in vivo*-Methoden detaillierter und vor allem isoliert die Wirkung von Uromodulin auf die einzelnen Schritte und Komponenten der Leukozytenrekrutierungskaskade untersucht werden.

Während viele der Experimente mittels FACS-Analyse ausgewertet worden sind, wurden die Videos und Präparate aus den Versuchen der Intravitalmikroskopie manuell ausgewertet. Auch wenn die Auswertung stets streng nach standardisierten Schemata erfolgte, besteht dabei immer die Gefahr eines subjektiven Einflusses. Um diese Verzerrung zu verhindern, wurden die Versuche verblindet durchgeführt und die Videos und Präparate jeweils von derselben Person ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Augenmerk auf humanes Uromodulin gelegt. Auch wenn in Säugetieren das UMOD-Gen evolutionär stark konserviert ist, stellte sich zu Beginn der Versuche die Frage, ob zusätzlich zu humanem auch murines Uromodulin verwendet werden sollte [112, 132]. Da für die initialen Versuche im Mausmodell humanes Uromodulin verwendet worden ist, sollte gezeigt werden, dass die intraskrotale Applikation von rekombinantem murinen Uromodulin eine vergleichbare Entzündungsreaktion hervorrufen kann. Dazu wurde eine verkürzte Form des murinen Uromodulins (aa25-588) verwendet, welche alle wichtigen Domänen des Uromodulin-Proteins besitzt und ebenfalls Polymere formt (Abb. 11, Kapitel 8) [112]. Diese Versuche wurden in Kooperation mit den Arbeitsgruppenmitgliedern Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster und Herrn Dr. Roland Immler durchgeführt. Im Vergleich zu den Versuchen mit humanem Uromodulin ergaben sich in den Versuchen mit dem murinen Uromodulin hinsichtlich der Leukozytenrekrutierung vergleichbare Ergebnisse. So zeigte sich auch nach einer Stimulation mit murinem Uromodulin eine reduzierte Leukozyten-RFF und ein Anstieg adhärenter Leukozyten im Vergleich zur Applikation von Mausalbumin (mALB). Es zeigten sich vergleichbare Rollgeschwindigkeiten von Leukozyten nach

einer Stimulation mit humanem bzw. murinem Uromodulin. Vergleichbar mit humanem Uromodulin zeigte sich auch nach der Stimulation mit murinem Uromodulin eine deutliche Extravasation von überwiegend neutrophilen Granulozyten. Diese Daten bestätigen nochmals die Erkenntnis, dass Uromodulin ein Protein ist, das über viele Spezies hinweg genetisch konserviert ist und alle wichtigen Domänen besitzt und Versuche mit murinem und humanem Uromodulin daher vergleichbare Ergebnisse erbringen.

Bei einigen *in vitro*-Experimenten ist zudem zu beachten, dass diese unter statischen Bedingungen durchgeführt wurden. So fanden beispielsweise die  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierungsassays unter statischen Bedingungen, also ohne strömungsbedingte Scherkräfte, statt. Bei der Aktivierung von LFA-1 zur „high affinity“-Form ist allerdings ein schneller Aktivierungsmechanismus unter Scherkräften und eine etwas langsamere Aktivierung unter statischen Bedingungen beschrieben, was bei der Auswertung der Daten berücksichtigt werden sollte [131].

Wie in der Einleitung erläutert, wird Uromodulin hauptsächlich in den Urin bzw. das renale Tubulussystem sezerniert. Zudem gibt es hinsichtlich der immunologischen Wirkung von Uromodulin teilweise widersprüchliche Daten. Auf den ersten Blick ist es daher nicht einleuchtend, dass in unseren Experimenten Uromodulin in das Gewebe injiziert wurde oder Kontakt mit Endothel- und Immunzellen hatte, wo sich Uromodulin doch physiologischerweise im Urin innerhalb des Tubulussystems befindet. Der entscheidende Punkt dabei ist, dass dies eben nur unter physiologischen Bedingungen der Fall ist und wir in unseren Experimenten Entzündungsreaktionen, sprich pathologische Zustände, untersucht haben. Mit Verweis auf die Literatur lösen sich diese scheinbaren Widersprüche schnell auf. Physiologischerweise scheint Uromodulin *in vivo* in zwei unterschiedlichen Formen – nämlich einer monomeren und einer polymeren Form – vorzuliegen und dementsprechend unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen zu können. Normalerweise befinden sich die beiden unterschiedlichen Uromodulin-Formen unter homöostatischen Bedingungen in unterschiedlichen Kompartimenten [110-112]. Im Tubuluslumen bzw. im Urin befindet sich hauptsächlich die polymere Uromodulin-Variante, wo diese den oben beschriebenen Aufgaben, wie dem Schutz vor bakteriellen Harnwegsinfekten, nachkommt [111]. In geringeren Mengen wird Uromodulin zudem vom Tubulusepithel nach basolateral in das Nierenparenchym sezerniert. Das basolateral sezernierte Uromodulin wird in den Blutkreislauf transportiert und zirkuliert darin als Monomer, durch das es seine systemischen homöostatischen Funktionen ausübt [110, 112]. Das erklärt sehr gut, weshalb sich polymerisiertes Uromodulin

physiologischerweise ausschließlich in den Harnwegen befindet, also einer mehr oder minder isolierten Nische innerhalb des Körpers, und keinen Kontakt mit extratubulärem Gewebe hat. Das bedeutet im Umkehrschluss, dass jeglicher Kontakt von polymerisiertem Uromodulin mit dem extratubulären Nierengewebe unter pathologischen Zuständen stattfindet. Dies kann beispielsweise bei Zuständen der Fall sein, in denen die epitheliale Barriere einschließlich ihrer tubulären Basalmembran unterbrochen ist. Ähnliche Überlegungen wurden bereits Ende der 1970er-Jahre von Resinck et al. oder Zager et al. geäußert, als im Rahmen von tubulointerstitiellen Erkrankungen interstitielle Uromodulin-Ablagerungen nachgewiesen werden konnten [133, 134]. Vor diesem Hintergrund war es demnach naheliegend, für die vorliegenden Versuche polymerisiertes Uromodulin zu verwenden und dieses mit extratubulären Strukturen in Verbindung zu bringen, denn erst dadurch ließen sich pathologische Zustände in diesem System abbilden.

## 5.3 Diskussion der Ergebnisse

### 5.3.1 Der Einfluss von Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo*

In den ersten Experimenten dieser Forschungsarbeit wurde im Allgemeinen die Leukozytenrekrutierung *in vivo* betrachtet. Um zu untersuchen, welche Rolle polymerisiertes Uromodulin bei diesem grundlegenden Vorgang im Rahmen von Entzündungsprozessen spielt und mögliche proinflammatorische Eigenschaften dieses Proteins zu ermitteln, wurde das Mauskremastermuskel-Modell verwendet.

Die i.s.-Injektion von Uromodulin führte zu einer signifikanten Verminderung der rollenden Leukozyten, signifikant reduzierten Rollgeschwindigkeiten sowie zu einer signifikant gesteigerten Anzahl adhärenter Leukozyten im Vergleich zu einer i.s.-Applikation von NaCl 0,9% (Negativkontrolle) oder einer Humanalbuminlösung (hALB).

Vereinbar mit den hier gezeigten Daten konnten Schmid et al. in Versuchen mit einer stabil transfizierten Uromodulin-exprimierenden epithelialen Zelllinie zeigen, dass Uromodulin die Adhäsion neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen *in vitro* erleichtert [108]. Zu bedenken ist bei diesen Versuchen allerdings, dass die Adhäsion in Mikrotiterplatten unter statischen Bedingungen, ohne flussbedingte Scherkräfte, ermittelt worden ist. Wie in der Einleitung erläutert, bedarf es unter anderem beim Leukozytenrollen eines gewissen Blutflusses und den damit verbundenen Scherkräften,

damit stabile Selektin-Bindungen ausgebildet werden können [45]. Damit ist für das Rollen, also dem der Adhäsion vorgeschalteten Schritt in der Rekrutierungskaskade, ein Blutfluss essentiell. Durch unsere *in vivo*-Experimente wird dieser Umstand berücksichtigt und somit die Bestätigung der von Schmid et al. postulierten Rolle von Uromodulin während der Leukozytenadhäsion geliefert [108].

Die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten entlang des Gefäßendothels ist darüber hinaus ein wichtiger Parameter, der den Grad einer Entzündung und die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel widerspiegelt. Die in unseren IVM-Versuchen gemessenen Rollgeschwindigkeiten sind gut vereinbar mit aus der Literatur bekannten Werten. So führte die intraskrotale Injektion von Uromodulin zu einer deutlichen Verminderung der Leukozytenrollgeschwindigkeit. Dies ist das Korrelat eines starken Entzündungszustandes und ist gut vereinbar mit der starken Reduktion der Rollgeschwindigkeit nach einer TNF- $\alpha$ - Stimulation von Venolen im Kremastermuskel von WT-Mäusen [42]. Da eine starke Entzündung zudem mit einer Integrinaktivierung auf den Leukozyten sowie einer Hochregulierung von endotheliale E-Selektin einhergeht, ermöglicht die Applikation eines blockierenden anti-E-Selektin-Antikörpers das E-Selektin-vermittelte Rollen zu untersuchen [15, 42]. Die intravasale Applikation eines blockierenden anti-E-Selektin-Antikörpers führte in unseren IVM-Versuchen zu einer signifikanten Steigerung der Leukozytenrollgeschwindigkeit in Uromodulin-behandelten Mäusen mit einer Verschiebung der Geschwindigkeitsverteilung in Richtung höherer Geschwindigkeiten. Diese Daten sprechen für ein E-Selektin vermitteltes langsames Leukozytenrollen entlang des Endothels nach der Uromodulin-Stimulation. Diese Ergebnisse passen zu Daten, die zeigen, dass das langsame Leukozytenrollen in TNF- $\alpha$ -stimulierten Venolen über E-Selektin vermittelt wird und die Applikation eines anti-E-Selektin-Antikörpers nach einer TNF- $\alpha$ -induzierten Entzündungsreaktion im Mausekremastermuskel zu einer Steigerung der mittleren Rollgeschwindigkeit führt [42]. Die im Anschluss an die IVM-Versuche entnommenen und fixierten Kremastermuskeln wurden zur mikroskopischen Auswertung der ausgewanderten Leukozyten in das perivaskuläre Gewebe mit einer Giemsa-Lösung angefärbt. Es wurde die Zahl ausgewandelter neutrophiler und eosinophiler Granulozyten sowie mononukleärer Zellen ausgewertet. Im extravasalen Gewebe der Uromodulin-stimulierten Kremastermuskeln zeigten sich deutlich erhöhte Zahlen *in vivo* transmigrierter Leukozyten im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Ergebnisse weisen auf eine Uromodulin-vermittelte gesteigerte Transmigration von neutrophilen Granulozyten über das Gefäßendothel in das umliegende entzündete Gewebe hin.

Die hier präsentierten *in vivo*-Ergebnisse bestätigen und ergänzen bereits veröffentlichte *in vitro*-Daten, die zeigen, dass Uromodulin die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* erleichtert [108]. Die hier besprochenen Daten heben eine ausgeprägte proinflammatorische Rolle von interstitiellem Uromodulin mit Auswirkung auf das Leukozytenrollen, die feste Adhäsion am Endothel und die Transmigration in das entzündete Gewebe hervor.

### **5.3.2 Der Einfluss von Uromodulin auf Adhäsions-relevante Oberflächenmoleküle von Endothelzellen und Leukozyten *in vitro***

Wie in den initialen *in vivo*-Versuchen gezeigt werden konnte, ruft das intraskrotal applizierte Uromodulin eine starke Entzündungsreaktion mit einer funktionellen Hochregulierung von E-Selektin auf dem Endothel hervor. Mit dem zusätzlichen Wissen, dass Uromodulin in der Literatur als ein TLR4-Ligand beschrieben worden ist und eine Stimulation von TLR4 durch den Liganden LPS eine Hochregulierung von E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 auf der Oberfläche von HUVECs und eine  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten hervorruft, wurde in den nachfolgenden *in vitro*-Versuchen untersucht, ob Uromodulin eine Expression bzw. Aktivierung dieser Oberflächenmoleküle bewirkt [18, 103, 129, 130].

Es wurde in *in vitro*-Versuchen betrachtet, ob Uromodulin dazu in der Lage ist, die Expression proinflammatorischer Adhäsionsmoleküle auf HUVECs direkt zu induzieren. Sodann wurden in weiteren Versuchen mögliche Effekte von Uromodulin auf die Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen auf humanen und murinen neutrophilen Granulozyten untersucht.

#### *5.3.2.1 Die Wirkung von Uromodulin auf die Expression endothelialer, für die Transmigration relevanter Oberflächenmoleküle*

Um die Wirkung von Uromodulin auf die Expression der proinflammatorischen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Modell mit primären humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) verwendet.

TNF- $\alpha$  induzierte erwartungsgemäß eine starke Expression von VCAM-1, E-Selektin und ICAM-1 auf der Endotheloberfläche. Überraschenderweise wurde durch Uromodulin – vergleichbar mit der Negativkontrolle – keines dieser proinflammatorischen Moleküle signifikant hochreguliert. Durch eine lediglich leichte, nicht signifikante

Molekülexpression waren die zuvor *in vivo* beobachteten Uromodulin-Effekte keinesfalls erklärbar.

Da – wie weiter oben bereits erwähnt – Uromodulin als ein TLR4-Ligand beschrieben wird und LPS über TLR4 eine Hochregulierung von E-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 auf HUVECs und eine  $\beta$ 2-Integrin-Aktivierung auf neutrophilen Granulozyten hervorruft, waren die Ergebnisse der hier beschriebenen Versuche unerwartet und warfen Fragen nach anderen Bindungspartnern für Uromodulin auf. Mit dem Vorwissen aus der Literatur war zu erwarten, dass Uromodulin zu einer Hochregulierung dieser für das Rollen und die Adhäsion relevanten Oberflächenmoleküle führt. Die ausgewerteten Daten deuteten allerdings darauf hin, dass Uromodulin die Expression dieser Moleküle auf dem Endothel nicht direkt beeinflusst. Wie im folgenden Kapitel im Detail diskutiert, könnte Uromodulin seine Wirkung jedoch über andere Rezeptoren, wie z.B. TRPM2, ausüben (siehe 5.3.2.2).

#### 5.3.2.2 $\beta$ 2-Integrin-Aktivierungsassay

Bei den Experimenten zur Wirkung von Uromodulin auf die Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen auf Leukozyten wurden sowohl der Effekt auf humane als auch auf murine neutrophile Granulozyten betrachtet.

Das große Interesse am Aktivierungsgrad von LFA-1 besteht deswegen, weil LFA-1 ein essentielles  $\beta$ 2-Integrin für die feste Adhäsion von Leukozyten darstellt [135]. Zusätzlich wurde der Expressionsgrad der Oberflächenmoleküle LFA-1 (Leukocyte function-associated antigen 1) und Mac-1 (Macrophage-1 antigen) nach Uromodulin-Stimulation untersucht.

Interessanterweise führte lediglich die Stimulation mit PMA zu aktivierten Formen von  $\beta$ 2-Integrinen, wohingegen die Stimulation mit Uromodulin keinen Effekt zeigte. Zudem hatte Uromodulin keinen Einfluss auf die Expression von LFA-1 und Mac-1.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Uromodulin nicht direkt in der Lage ist,  $\beta$ 2-Integrine in ihre aktivierte Form zu überführen. Diese Ergebnisse passen zu den zuvor gezeigten Daten, dass Uromodulin nicht direkt zu einer Hochregulierung proinflammatorischer Adhäsionsmoleküle auf humanen Endothelzellen *in vitro* führt.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde die Wirkung von Uromodulin auf Integrine auf murinen Leukozyten untersucht und die Ergebnisse aus den Versuchen mit humanen neutrophilen Granulozyten bestätigt.

Diese *in vitro*-Daten zeigen, dass die Expression essentieller Adhäsionsmoleküle weder auf Endothelzellen noch auf Leukozyten durch Uromodulin direkt über TLR4-Bindung beeinflusst wird. Es lässt sich daher vermuten, dass Uromodulin seine proinflammatorische Wirkung vielmehr über andere Mechanismen ausübt. Hierbei ist die Frage, über welche Rezeptoren Uromodulin seine Wirkung auf das Endothel und die Immunzellen ausübt, bis dato unbeantwortet. In der Literatur wurden bisher mehrere Uromodulin-Rezeptoren beschrieben, darunter TLR4, TRPM2- und TRPM6-Kanäle (TRPM = Transient receptor potential melastatin) [89, 103, 136].

Da TRPM6 weder auf neutrophilen Granulozyten noch auf dem Gefäßendothel exprimiert wird, führt das zu der Annahme, dass Uromodulin über TRPM2 und TLR4 seine proinflammatorische Wirkung ausüben könnte [137]. Aus vorherigen Studien ist bekannt, dass die Bindung von LPS an TLR4 eine Hochregulierung von E-Selektin und ICAM-1 auf humanen Endothelzellen zur Folge hat [129, 130].

Die *in vitro*-Daten der vorliegenden Arbeit sprechen gegen einen direkten Einfluss von Uromodulin auf adhäsionsrelevante Moleküle auf dem Endothel bzw. Leukozyten. Mit dem Wissen, dass die Bindung von LPS und S100A8/A9 an TLR4 eine Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen auf neutrophilen Granulozyten hervorrufen kann, scheint Uromodulin zumindest in den vorliegenden Versuchen seine Wirkung nicht direkt über TLR4 zu vermitteln [18]. Dazu widersprüchlich sind allerdings Daten von Säemann et al., die zeigen, dass Uromodulin über TLR4 myeloide dendritische Zellen aktivieren kann und Uromodulin somit als einen möglichen TLR4-Liganden präsentieren [103].

Nachdem sich für die Erklärung unserer Daten weder TLR4 noch TRPM6 als aussichtsreiche Uromodulin-Rezeptoren herausgestellt haben, ist über den anderen in der Literatur beschriebenen Uromodulin-Rezeptor TRPM2 bekannt, dass er die Barrierefunktion des Endothels regulieren soll und auf neutrophilen Granulozyten sowie auf Makrophagen exprimiert wird [138-140]. Da wir in den Versuchen der vorliegenden Arbeit in der Tat einen Effekt von Uromodulin auf das Endothel sowie auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen festgestellt haben, verleitet das Hintergrundwissen zu TRPM2 zu der Annahme, dass die gesehenen proinflammatorischen Effekte über ebendiesen Rezeptor vermittelt worden sein könnten. Gleichwohl bedarf es weiterer Forschungsanstrengungen, um die detaillierten Mechanismen und beteiligten Rezeptoren zu ergründen, die den Effekten von Uromodulin auf das Endothel und Immunzellen zugrunde liegen und damit den Wirkmechanismus von Uromodulin in immunologischen Prozessen ein Stück weiter aufzudecken.

Nachdem keine direkte Wirkung von Uromodulin auf endotheliale und leukozytäre Oberflächenmoleküle festgestellt werden konnte, wurde nun mithilfe von Kooperationsprojekten versucht, mögliche Erklärungsmodelle für die bisher *in vivo* gezeigten Uromodulin-Effekte zu finden.

Eine Möglichkeit, die proinflammatorische Wirkung von Uromodulin aus den *in vivo*-Versuchen zu erklären, ist die, dass Uromodulin gewebständige Makrophagen zur TNF- $\alpha$ -Produktion anregen könnte. Somit könnte auf indirektem Weg die proinflammatorische Wirkung von Uromodulin zur Geltung kommen. Dies wurde in Versuchen unserer Kooperationspartnerin Frau PD Dr. Heike Beck (Biomedizinisches Centrum München, LMU München) detaillierter untersucht (Kapitel 7).

Wie frühere Arbeiten zeigen konnten, kann Uromodulin eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung in humanen Monozyten, dendritischen Zellen und in murinen Monozyten aus dem Knochenmark hervorrufen [103, 105]. Außerdem konnten nach einer i.v.-Applikation von Uromodulin in WT-Mäusen erhöhte TNF- $\alpha$ -Serumspiegel festgestellt werden [103]. Um nun herauszufinden, ob Uromodulin die TNF- $\alpha$ -Sekretion in gewebständigen Makrophagen *in vivo* induzieren kann, wurden Kremastermuskeln mit Uromodulin bzw. LPS stimuliert. Im Vergleich zu der Negativkontrolle (NaCl 0,9%) führte sowohl die Uromodulin- als auch die LPS-Stimulation zu einer starken TNF- $\alpha$ -Freisetzung (Kapitel 7).

Diese Ergebnisse geben eine mögliche Erklärung für die proinflammatorischen Effekte von Uromodulin, indem hier gezeigt werden konnte, dass Uromodulin eine TNF- $\alpha$ -Freisetzung in gewebständigen Makrophagen im murinen Kremastermuskel *in vivo* induzieren kann. Hierüber kann Uromodulin zu einer Entzündungsreaktion einschließlich der Rekrutierung von Leukozyten führen. Diese *in vivo*-Daten liefern eine Ergänzung beziehungsweise Erklärung der vorherigen Versuchsergebnisse und geben einen klaren Hinweis darauf, dass Uromodulin die gesteigerte Leukozytenadhäsion nicht direkt über eine  $\beta$ 2-Integrinaktivierung und eine Hochregulierung proinflammatorischer Moleküle auf dem Endothel hervorruft, sondern dass dies vielmehr über einen indirekten Weg geschehen könnte – in diesem Fall die Uromodulin-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion gewebständiger Makrophagen.

### 5.3.3 Der Einfluss von Uromodulin auf die vaskuläre Permeabilität *in vitro* und *in vivo*

Mit einer Reihe an *in vitro*-Versuchen sollte die zuvor *in vivo* beobachtete Uromodulin-induzierte Leukozytenextravasation im Detail betrachtet werden. Es sollte untersucht werden, ob Uromodulin direkt auf das Endothel wirken kann, um dessen Permeabilität zu erhöhen respektive die Leukozytentransmigration anderweitig zu erleichtern. Hierfür wurde ein Transwell-Migrationsassay verwendet [127].

In dem Migrationsassay zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl transmigrierter neutrophiler Granulozyten nach vorheriger Uromodulin-Stimulation der Endothelzellschicht im Vergleich zur Negativkontrolle. Interessanterweise traf dies unabhängig von dem verwendeten Lockstoff CXCL8 zu, Uromodulin erhöht also sowohl ohne als auch mit Lockstoff die Anzahl transmigrierter Leukozyten im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Daten deuten darauf hin, dass Uromodulin einen direkten Effekt auf die transendotheliale Migration von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe ausüben kann, indem es direkt auf die Endothelpermeabilität wirkt.

Schmid et al. konnten in Versuchen mit einer stabil transfizierten Uromodulin-exprimierenden epithelialen Zelllinie zeigen, dass Uromodulin die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* erleichtert [108]. In derselben Studie wurde gezeigt, dass Uromodulin sowohl an die leichte als auch die schwere IgG-Kette binden kann und dass die Bindung von Uromodulin an IgG die Anzahl transmigrierter neutrophiler Granulozyten *in vitro* erhöht. Bereits im Jahr 1993 wurde die Fähigkeit von Uromodulin beschrieben, an IgG zu binden [98]. Huang et al. konnten zeigen, dass Uromodulin an Immunglobulin-Leichtketten binden kann [141]. Die Fähigkeit von Uromodulin an Immunglobuline binden zu können, könnte beispielsweise bei Krankheiten von klinischer Bedeutung sein, bei denen bekanntermaßen durch eine nicht selektive Proteinurie die IgG-Spiegel im Urin erhöht sind, wie zum Beispiel bei einer Glomerulonephritis oder einer diabetischen Nephropathie [142, 143]. Im Rahmen dieser Krankheitsgeschehen könnte die Bindung von Uromodulin an IgG die Rekrutierung von Leukozyten verstärken und somit zu einer ausgeprägteren renalen Entzündungsreaktion beitragen.

Durch die Transwell-Versuche konnten gezielt Effekte auf das Endothel nachgewiesen werden, welche Uromodulin unabhängig von TNF- $\alpha$  vermittelt. Ergänzend zu diesen Ergebnissen passen die folgenden Daten unserer Kooperationspartnerin Frau PD Dr. Hanna Mannell (Biomedizinisches Centrum, LMU München) zur Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (Transendothelial electrical resistance

measurement = TEER) (Kapitel 7). Um die vaskuläre Permeabilität von Endothelzellen zu untersuchen, wurde eine Herangehensweise mittels der Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Technologie gewählt, mit deren Hilfe die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* gemessen werden kann [144].

Nach 8-stündiger Versuchszeit wurde im Vergleich zur Negativkontrolle sowohl durch Uromodulin als auch durch TNF- $\alpha$  die elektrische Impedanz des Endothels signifikant reduziert. Uromodulin und TNF- $\alpha$  gemeinsam führten interessanterweise zu keiner signifikanten zusätzlichen Impedanzminderung (Abb. 10, Kapitel 7). In Einklang mit den Transwell-Versuchen veranschaulichen die hier gezeigten ECIS-Daten, dass Uromodulin auch in Abwesenheit von Makrophagen einen direkten Effekt auf das Endothel zu haben scheint.

Um die nachgewiesene Uromodulin-vermittelte vaskuläre Permeabilitätsänderung *in vivo* zu bestätigen, wurde in einem weiteren Versuchsansatz ein weiteres Mal das Mauskreastermuskel-Modell verwendet und über den Karotiskatheter FITC-Dextran 150 kDa appliziert.

Diese Ergebnisse sind mit einem direkten Effekt von Uromodulin auf die Endothelpermeabilität vereinbar und untermauern die bereits *in vitro* beobachtete erhöhte Endothelpermeabilität nach einer Uromodulin-Stimulation.

Betrachtet man nun die Daten des Migrationsassays, der elektrischen Impedanzmessung und der FITC-Dextran-Extravasation in der Zusammenschau, zeigt sich deutlich eine direkte proinflammatorische Wirkung von Uromodulin auf das Gefäßendothel, insbesondere indem es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Gefäßpermeabilität erhöht und dadurch die Transmigration von neutrophilen Granulozyten erleichtert.

#### **5.3.4 Erklärungsmodelle für die immunmodulatorische Wirkung von Uromodulin**

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Uromodulin in umfassender Weise auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten *in vivo* und *in vitro* Auswirkungen hat. Die genaue Wirkungsweise von Uromodulin ist dabei noch nicht im Detail verstanden. Da Uromodulin keinen direkten Einfluss auf adhäsionsrelevante Moleküle auf Endothelzellen und Leukozyten zu haben scheint, muss es andere Mechanismen geben,

durch welche die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten vom Gefäß in das entzündete Gewebe *in vivo* moduliert wird.

Der Erklärungsansatz über die Uromodulin-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion durch Makrophagen wurde bereits diskutiert. Und wie weiter oben ausgeführt, konnte diese Arbeit bereits gute Hinweise für diesen Mechanismus liefern. Ein weiterer möglicher Mechanismus, über den Uromodulin seine proinflammatorische Wirkung ausüben könnte, ist, dass polymerisiertes Uromodulin im extratubulären Gewebe als eine Art DAMP-Molekül (DAMP = „damage-associated molecular pattern“) wirken und als Gefahrensignal eine Entzündungsreaktion auslösen könnte. Wie weiter oben dargelegt wurde, konnten Schmid et al. demonstrieren, dass eine Präinkubation eines endothelialen Monolayers mit IgG zu einer verstärkten Leukozytentransmigration nach einer Uromodulin-Stimulation führt [108]. Huang et al. konnten zeigen, dass Uromodulin an Immunglobulin-Leichtketten binden kann und führten weiter aus, dass dies einen entscheidenden Vorgang bei der Entstehung einer Cast-Nephropathie im Rahmen eines Multiplen Myeloms darstellt [141]. Es ist bekannt, dass im Rahmen eines multiplen Myeloms pathologische renale Uromodulin-Ablagerungen eine häufige Komplikation darstellen – dabei bildet Uromodulin mit freien Immunglobulin-Leichtketten sogenannte Zylinder im Urin und führen zu einer sogenannten Cast-Nephropathie [113]. Man nimmt an, dass diese Zylinder über eine Tubulusatrophie, eine fortschreitende interstitielle Entzündung und Fibrose schließlich zu einem akuten Nierenversagen führen können [114]. In Versuchen mit einem murinen unilateralen Ureterobstruktion-Modell (murine unilateral ureteral obstruction (UUO) model) konnte zudem eine Uromodulin-Akkumulation und Uromodulin-Ablagerungen in extratubulärem Gewebe nachgewiesen werden [115]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die renalen Uromodulin-Spiegel adulter Mäuse nach einer UUO stiegen und dass ein Fehlen von Uromodulin in UMOD-knockout-Mäusen in diesem Modell zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion und einem geringeren Nierenschaden führte [116]. Im Rahmen des Projekts, zu welchem auch die vorliegende Arbeit zählt, wurden in Kooperation mit Frau PD Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio (Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München) von neutrophilen Granulozyten umgebene Uromodulin-Zylinder - neben dem Vorkommen beim Multiplen Myelom - auch bei Patienten nachgewiesen, die an einer interstitiellen Nephritis, einer IgA-Nephropathie oder einer monoklonalen Gammopathie renaler Signifikanz litten [145]. Vor dem Hintergrund dieser Daten und aufgrund der weiter oben erläuterten Tatsache, dass polymerisiertes Uromodulin nur unter pathologischen Verhältnissen mit extratubulärem Gewebe in Kontakt kommt, wurde von uns untersucht, ob polymerisiertes

Uromodulin im extratubulären Gewebe als eine Art DAMP-Molekül wirken und darüber eine Entzündungsreaktion in Gang setzen kann. Diese Überlegung wäre vereinbar mit den Daten dieser Arbeit, nach denen Uromodulin die endotheliale Permeabilität erhöhen, die Extravasation von neutrophilen Granulozyten unterstützen und Makrophagen zur Freisetzung proinflammatorischer Faktoren anregen kann.

Uromodulin wird stark während der Entwicklung der Niere exprimiert und korreliert dabei insbesondere mit der Reifung des TAL [111]. Während der Entwicklung der neonatalen Niere führt eine Obstruktion der Harnwege zu einer Leukozytenrekrutierung, Entzündung und einer interstitiellen Fibrose [146]. Aufgrund dieses Sachverhaltes wurde in Kooperation mit Frau PD Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio (Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München) an einem neonatalen murinen UUU-Modell die Expression und Lokalisation von Uromodulin sowie die Immunzellinfiltration untersucht. Dadurch konnten wir zeigen, dass eine unilaterale Ureterobstruktion sowohl intra- als auch extratubulär die Expression von Uromodulin steigert [145]. Bei der UUU kommt es durch eine Tubulusatrophie und einen tubulären Zelltod zu einer gestörten Integrität der tubulären Basalmembran [145]. Auf diesem Weg könnte wiederum polymerisiertes Uromodulin mit extratubulärem Nierengewebe in Kontakt kommen und die oben beschriebenen proinflammatorischen Vorgänge in der neonatalen Niere anstoßen. Zu dieser Überlegung passen Studienergebnisse, die sich mit der Rolle von Uromodulin im Rahmen tubulointerstitieller Nephritiden auseinandersetzen. Dabei wird beschrieben, dass nach einer vorherigen autoimmunen Reaktion die Bindung neutrophiler Granulozyten an Uromodulin auf humanen Epithelzellen zu einer verstärkten Freisetzung und interstitiellen Akkumulation von Uromodulin sowie der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führt und darüber die Zellintegrität verloren geht [147]. Die Daten der vorliegenden Arbeit passen zu der bereits erwähnten Beobachtung, dass nach einer UUU die renalen Uromodulin-Spiegel in adulten Mäusen steigen und dass ein Fehlen von Uromodulin in diesem Modell zu einer verminderten Entzündungsreaktion und geringerem Nierenschaden führt [116].

Hinsichtlich der Wirkung von polymerisiertem Uromodulin im extratubulären Gewebe passen Daten von Darisipudi et al., die zeigen, dass aus menschlichem Urin isoliertes Uromodulin zu großen, irregulären Konglomeraten mit kristall-ähnlicher Ultrastruktur aggregiert, welche isolierte humane Monozyten aktivieren können, die daraufhin kostimulatorische Moleküle exprimieren und proinflammatorische Zytokine abgeben, darunter zum Beispiel IL-1 $\beta$  [104]. Genauer beschreiben die Autoren, dass die IL-1 $\beta$ -Freisetzung durch Uromodulin über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in

humanen Monozyten geschieht und dies eine Phagozytose von Uromodulin voraussetzt. Zudem wird beschrieben, dass typischerweise Kristalle und Nanopartikel dieser Größe eine immunstimulatorische Wirkung haben, indem sie über diesen Weg eine IL-1 $\beta$ -Freisetzung hervorrufen können [104].

### **5.3.5 Schlussfolgerung - Die Rolle von Uromodulin im Kontext dieser Arbeit**

Die Funktion von Uromodulin im menschlichen Körper blieb über viele Jahre unvollständig aufgeklärt. Durch unsere Forschung haben wir extratubuläres polymerisiertes Uromodulin als einen wichtigen proinflammatorischen Modulator von Entzündungen *in vivo* identifiziert. Die Überlegung, dass Uromodulin in essentiellen Abwehrmechanismen eine Rolle spielen könnte, fußt auf einer Vielzahl richtungsweisender Daten aus der Fachliteratur, wie in der Einleitung ausführlich dargelegt wurde. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten helfen uns dabei, dieses facettenreiche Protein besser zu verstehen und geben uns neue Erkenntnisse darüber, welche Rolle Uromodulin während Entzündungsprozessen einnimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass Uromodulin in umfassender Weise auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten *in vivo* und *in vitro* Auswirkungen hat. Dies ist unseres Wissens nach die erste wissenschaftliche Studie, die dies *in vivo* zeigen konnte. Wie bereits dargelegt, stehen diese Ergebnisse im Einklang mit Daten bisher veröffentlichter Studien, die beispielsweise zeigen, dass Uromodulin neutrophile Granulozyten binden und aktivieren kann sowie die transepitheliale Migration von neutrophilen Granulozyten *in vitro* erleichtert [106, 108, 147, 148].

Die genaue Wirkungsweise von Uromodulin bei der Leukozytenrekrutierung ist nicht abschließend geklärt. Mögliche Erklärungsansätze werden in dieser Arbeit besprochen. Uromodulin scheint mit Blick auf unsere Daten auf unterschiedlichen Wegen zu wirken, unter anderem indem es direkt die Permeabilität des Endothels verändert und indem es gewebständige Makrophagen zur TNF- $\alpha$ -Freisetzung anregt und auf diesem Wege die Anzahl transmigrierender Leukozyten steigert und eine Entzündungsreaktion fördert. Diese Mechanismen könnten beispielsweise bei akuten oder chronischen Nierenerkrankungen zum Tragen kommen. Dabei könnte im Tubulussystem akkumuliertes Uromodulin über ein defektes Tubulusepithel in das extratubuläre Nierengewebe gelangen und dort eine Entzündungsreaktion anstoßen. Möglich wäre, dass Uromodulin dabei als eine Art DAMP-Signal eine Immunantwort anstößt, um Heilungsprozesse einzuleiten und homöostatische Bedingungen im geschädigten

Nierenparenchym wiederherzustellen. Es bedarf allerdings noch weiterer Forschungsarbeit, um im Detail zu entschlüsseln, welche direkten und indirekten Mechanismen diesen Effekten *in vivo* schlussendlich zugrunde liegen und dadurch ein Gesamtbild davon zu bekommen, wie Uromodulin seine Rolle als Modulator von Entzündungsreaktionen erfüllt.

Abschließend lohnt es sich daher zu überlegen, wozu ein genaueres Verständnis dieses renalen Glykoproteins von Nutzen sein könnte. Durch die vorliegende Arbeit wird die Wichtigkeit von extratubulärem polymerisiertem Uromodulin während Entzündungsvorgängen in der Niere verdeutlicht und diesem Protein eine starke proinflammatorische Funktion zugeschrieben. Nun könnte man sich zum einen die immunmodulatorischen Eigenschaften dieses Proteins bei Entzündungsprozessen, insbesondere in der Niere, zunutze machen. Da es ein körpereigener Stoff ist, könnte eine Hemmung der Wirkung von Uromodulin im Falle einer Entzündung therapeutische Anwendung finden und dabei weniger Nebenwirkungen als herkömmliche Medikamente haben. Zum andern kann man sich vorstellen, dass sich Uromodulin - da es ausschließlich in der Niere gebildet wird - als Biomarker in der medizinischen Diagnostik etabliert. So könnte Uromodulin bei der Beurteilung akuten und chronischen Nierenversagens sowie von Abstoßungsreaktionen nach einer Nierentransplantation mit herangezogen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Chappell, J.C., D.M. Wiley, and V.L. Bautch, *How blood vessel networks are made and measured*. Cells Tissues Organs, 2012. **195**(1-2): p. 94-107.
2. Rieger, M.A. and T. Schroeder, *Hematopoiesis*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(12).
3. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
4. Riley, L.K. and J. Rupert, *Evaluation of Patients with Leukocytosis*. Am Fam Physician, 2015. **92**(11): p. 1004-11.
5. Yatim, K.M. and F.G. Lakkis, *A brief journey through the immune system*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(7): p. 1274-81.
6. Masgrau-Alsina, S., M. Sperandio, and I. Rohwedder, *Neutrophil recruitment and intracellular vesicle transport: A short overview*. Eur J Clin Invest, 2020. **50**(6): p. e13237.
7. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6439-46.
8. Ley, K., et al., *Neutrophils: New insights and open questions*. Sci Immunol, 2018. **3**(30).
9. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
10. Liddiard, K., et al., *Macrophage heterogeneity and acute inflammation*. Eur J Immunol, 2011. **41**(9): p. 2503-8.
11. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
12. Rosales, C., *Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?* Front Physiol, 2018. **9**: p. 113.
13. O'Connell, K.E., et al., *Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research*. Comp Med, 2015. **65**(2): p. 96-113.
14. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. Mol Immunol, 2013. **55**(1): p. 49-58.
15. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
16. Zarbock, A., C.A. Lowell, and K. Ley, *Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 773-83.
17. Zarbock, A., et al., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
18. Pruenster, M., et al., *Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6915.
19. Munn, L.L., R.J. Melder, and R.K. Jain, *Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation*. Biophys J, 1996. **71**(1): p. 466-78.
20. Pillay, J., et al., *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. **116**(4): p. 625-7.
21. Tofts, P.S., et al., *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2011. **117**(22): p. 6050-2; author reply 6053-4.
22. Patel, K.D., S.L. Cuvelier, and S. Wiehler, *Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment*. Semin Immunol, 2002. **14**(2): p. 73-81.

23. Vestweber, D. and J.E. Blanks, *Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands*. *Physiol Rev*, 1999. **79**(1): p. 181-213.
24. Watson, M.L., et al., *Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1*. *J Exp Med*, 1990. **172**(1): p. 263-72.
25. Jung, U. and K. Ley, *Regulation of E-selectin, P-selectin, and intercellular adhesion molecule 1 expression in mouse cremaster muscle vasculature*. *Microcirculation*, 1997. **4**(2): p. 311-9.
26. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease*. *Trends Mol Med*, 2003. **9**(6): p. 263-8.
27. Bevilacqua, M.P., et al., *Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(24): p. 9238-42.
28. Subramaniam, M., J.A. Koedam, and D.D. Wagner, *Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane*. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(8): p. 791-801.
29. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(1): p. 92-9.
30. Hattori, R., et al., *Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(14): p. 7768-71.
31. Liu, Z., et al., *Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo*. *J Exp Med*, 2010. **207**(13): p. 2975-87.
32. Pan, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel kappaB sites and a variant activating transcription factor/cAMP response element*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 10068-77.
33. von Andrian, U.H., et al., *A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow*. *Cell*, 1995. **82**(6): p. 989-99.
34. Ivetic, A. and A.J. Ridley, *The telling tail of L-selectin*. *Biochem Soc Trans*, 2004. **32**(Pt 6): p. 1118-21.
35. Bargatze, R.F., et al., *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. *J Exp Med*, 1994. **180**(5): p. 1785-92.
36. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
37. Condon, T.P., et al., *ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes*. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2001. **11**(2): p. 107-16.
38. Sperandio, M., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules*. *J Exp Med*, 2003. **197**(10): p. 1355-63.
39. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(3): p. 485-91.
40. Pospieszalska, M.K. and K. Ley, *Dynamics of Microvillus Extension and Tether Formation in Rolling Leukocytes*. *Cell Mol Bioeng*, 2009. **2**(2): p. 207-217.
41. Sperandio, M., C.A. Gleissner, and K. Ley, *Glycosylation in immune cell trafficking*. *Immunol Rev*, 2009. **230**(1): p. 97-113.
42. Kunkel, E.J. and K. Ley, *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. *Circ Res*, 1996. **79**(6): p. 1196-204.

43. Sperandio, M., *Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo*. *Febs j*, 2006. **273**(19): p. 4377-89.
44. Marshall, B.T., et al., *Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules*. *Nature*, 2003. **423**(6936): p. 190-3.
45. Lawrence, M.B., et al., *Threshold levels of fluid shear promote leukocyte adhesion through selectins (CD62L,P,E)*. *J Cell Biol*, 1997. **136**(3): p. 717-27.
46. Sanz, M.J. and P. Kubes, *Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking*. *Eur J Immunol*, 2012. **42**(2): p. 278-83.
47. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. *Trends Immunol*, 2011. **32**(10): p. 452-60.
48. Ginsberg, M.H., A. Partridge, and S.J. Shattil, *Integrin regulation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. **17**(5): p. 509-16.
49. Begandt, D., et al., *How neutrophils resist shear stress at blood vessel walls: molecular mechanisms, subcellular structures, and cell-cell interactions*. *J Leukoc Biol*, 2017. **102**(3): p. 699-709.
50. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. *J Exp Med*, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
51. Fine, N., et al., *GEF-H1 is necessary for neutrophil shear stress-induced migration during inflammation*. *J Cell Biol*, 2016. **215**(1): p. 107-119.
52. Woodfin, A., et al., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(8): p. 761-9.
53. Shaw, S.K., et al., *Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium*. *J Immunol*, 2001. **167**(4): p. 2323-30.
54. Vestweber, D., *How leukocytes cross the vascular endothelium*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(11): p. 692-704.
55. Wegmann, F., et al., *ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability*. *J Exp Med*, 2006. **203**(7): p. 1671-7.
56. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response*. *Trends Immunol*, 2003. **24**(6): p. 327-34.
57. Carman, C.V. and T.A. Springer, *A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them*. *J Cell Biol*, 2004. **167**(2): p. 377-88.
58. Phillipson, M., et al., *Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration*. *PLoS One*, 2008. **3**(2): p. e1649.
59. Feng, D., et al., *Ultrastructural studies define soluble macromolecular, particulate, and cellular transendothelial cell pathways in venules, lymphatic vessels, and tumor-associated microvessels in man and animals*. *Microsc Res Tech*, 2002. **57**(5): p. 289-326.
60. Hallmann, R., et al., *Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 979-1000.
61. Wang, S., et al., *Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils*. *J Exp Med*, 2006. **203**(6): p. 1519-32.
62. Rohwedder, I., et al., *Src family kinase-mediated vesicle trafficking is critical for neutrophil basement membrane penetration*. *Haematologica*, 2020. **105**(7): p. 1845-1856.

63. Hallmann, R., et al., *The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix*. *Curr Opin Cell Biol*, 2015. **36**: p. 54-61.
64. Bachmann, S., R. Metzger, and B. Bunnemann, *Tamm-Horsfall protein-mRNA synthesis is localized to the thick ascending limb of Henle's loop in rat kidney*. *Histochemistry*, 1990. **94**(5): p. 517-23.
65. El-Achkar, T.M. and X.R. Wu, *Uromodulin in kidney injury: an instigator, bystander, or protector?* *Am J Kidney Dis*, 2012. **59**(3): p. 452-61.
66. Rampoldi, L., et al., *The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease*. *Kidney Int*, 2011. **80**(4): p. 338-47.
67. Zhu, X., et al., *Isolation of mouse THP gene promoter and demonstration of its kidney-specific activity in transgenic mice*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002. **282**(4): p. F608-17.
68. McKenzie, J.K. and E.G. McQueen, *Immunofluorescent localization of Tamm-Horsfall mucoprotein in human kidney*. *J Clin Pathol*, 1969. **22**(3): p. 334-9.
69. Wenk, R.E., B.S. Bhagavan, and J. Rudert, *Tamm-Horsfall uromucoprotein and the pathogenesis of casts, reflux nephropathy, and nephritides*. *Pathobiol Annu*, 1981. **11**: p. 229-57.
70. Bachmann, S., et al., *Tamm-Horsfall protein excretion during chronic alterations in urinary concentration and protein intake in the rat*. *Ren Physiol Biochem*, 1991. **14**(6): p. 236-45.
71. Goodall, A.A. and R.D. Marshall, *Effects of freezing on the estimated amounts of Tamm-Horsfall glycoprotein in urine, as determined by radioimmunoassay*. *Biochem J*, 1980. **189**(3): p. 533-9.
72. Maxfield, M., *Molecular forms of human urinary mucoprotein present under physiological conditions*. *Biochim Biophys Acta*, 1961. **49**: p. 548-58.
73. Porter, K.R. and I. Tamm, *Direct visualization of a mucoprotein component of urine*. *J Biol Chem*, 1955. **212**(1): p. 135-40.
74. Bachmann, S., I. Koeppen-Hagemann, and W. Kriz, *Ultrastructural localization of Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) in rat kidney as revealed by protein A-gold immunocytochemistry*. *Histochemistry*, 1985. **83**(6): p. 531-8.
75. El-Achkar, T.M., et al., *Tamm-Horsfall protein translocates to the basolateral domain of thick ascending limbs, interstitium, and circulation during recovery from acute kidney injury*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(8): p. F1066-75.
76. Wiggins, R.C., *Uromucoid (Tamm-Horsfall glycoprotein) forms different polymeric arrangements on a filter surface under different physicochemical conditions*. *Clin Chim Acta*, 1987. **162**(3): p. 329-40.
77. Ying, W.Z. and P.W. Sanders, *Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats*. *Kidney Int*, 1998. **54**(4): p. 1150-6.
78. Torffvit, O., O. Melander, and U.L. Hulten, *Urinary excretion rate of Tamm-Horsfall protein is related to salt intake in humans*. *Nephron Physiol*, 2004. **97**(1): p. p31-6.
79. Mutig, K., et al., *Activation of the bumetanide-sensitive Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(34): p. 30200-10.
80. Renigunta, A., et al., *Tamm-Horsfall glycoprotein interacts with renal outer medullary potassium channel ROMK2 and regulates its function*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(3): p. 2224-35.
81. Trudu, M., et al., *Common noncoding UMOD gene variants induce salt-sensitive hypertension and kidney damage by increasing uromodulin expression*. *Nat Med*, 2013. **19**(12): p. 1655-60.

82. Bates, J.M., et al., *Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication*. *Kidney Int*, 2004. **65**(3): p. 791-7.
83. Mo, L., et al., *Ablation of the Tamm-Horsfall protein gene increases susceptibility of mice to bladder colonization by type 1-fimbriated Escherichia coli*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **286**(4): p. F795-802.
84. Serafini-Cessi, F., A. Monti, and D. Cavallone, *N-Glycans carried by Tamm-Horsfall glycoprotein have a crucial role in the defense against urinary tract diseases*. *Glycoconj J*, 2005. **22**(7-9): p. 383-94.
85. Liu, Y., et al., *Progressive renal papillary calcification and ureteral stone formation in mice deficient for Tamm-Horsfall protein*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **299**(3): p. F469-78.
86. Gudbjartsson, D.F., et al., *Association of variants at UMOD with chronic kidney disease and kidney stones-role of age and comorbid diseases*. *PLoS Genet*, 2010. **6**(7): p. e1001039.
87. Köttgen, A., et al., *Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease*. *Nat Genet*, 2009. **41**(6): p. 712-7.
88. Delgado, G.E., et al., *Serum Uromodulin and Mortality Risk in Patients Undergoing Coronary Angiography*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(7): p. 2201-2210.
89. LaFavers, K.A., et al., *Circulating uromodulin inhibits systemic oxidative stress by inactivating the TRPM2 channel*. *Sci Transl Med*, 2019. **11**(512).
90. Leisher, A., et al., *Serum uromodulin is associated with impaired glucose metabolism*. *Medicine (Baltimore)*, 2017. **96**(5): p. e5798.
91. Kraus, D. and C. Wanner, *Uromodulin in the Bloodstream: Old Wine in a New Wineskin*. *J Am Soc Nephrol*, 2017. **28**(7): p. 1955-1957.
92. Eckardt, K.U., et al., *Autosomal dominant tubulointerstitial kidney disease: diagnosis, classification, and management--A KDIGO consensus report*. *Kidney Int*, 2015. **88**(4): p. 676-83.
93. Rampoldi, L., et al., *Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(24): p. 3369-84.
94. Bleyer, A.J., et al., *Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease*. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2017. **24**(2): p. 86-93.
95. Ekici, A.B., et al., *Renal fibrosis is the common feature of autosomal dominant tubulointerstitial kidney diseases caused by mutations in mucin 1 or uromodulin*. *Kidney Int*, 2014. **86**(3): p. 589-99.
96. Tamm, I. and F.L. Horsfall, Jr., *Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1950. **74**(1): p. 106-8.
97. Muchmore, A.V. and J.M. Decker, *Uromodulin: a unique 85-kilodalton immunosuppressive glycoprotein isolated from urine of pregnant women*. *Science*, 1985. **229**(4712): p. 479-81.
98. Rhodes, D.C., E.J. Hinsman, and J.A. Rhodes, *Tamm-Horsfall glycoprotein binds IgG with high affinity*. *Kidney Int*, 1993. **44**(5): p. 1014-21.
99. Rhodes, D.C., *Binding of Tamm-Horsfall protein to complement 1q measured by ELISA and resonant mirror biosensor techniques under various ionic-strength conditions*. *Immunol Cell Biol*, 2000. **78**(5): p. 474-82.
100. Hession, C., et al., *Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein): a renal ligand for lymphokines*. *Science*, 1987. **237**(4821): p. 1479-84.
101. El-Achkar, T.M., et al., *Tamm-Horsfall protein-deficient thick ascending limbs promote injury to neighboring S3 segments in an MIP-2-dependent mechanism*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. **300**(4): p. F999-1007.

102. El-Achkar, T.M., et al., *Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(2): p. F534-44.
103. Saemann, M.D., et al., *Tamm-Horsfall glycoprotein links innate immune cell activation with adaptive immunity via a Toll-like receptor-4-dependent mechanism*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(2): p. 468-75.
104. Darisipudi, M.N., et al., *Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(11): p. 1783-9.
105. Su, S.J., et al., *Uromodulin and Tamm-Horsfall protein induce human monocytes to secrete TNF and express tissue factor*. *J Immunol*, 1997. **158**(7): p. 3449-56.
106. Thomas, D.B., et al., *Tamm Horsfall protein binds to a single class of carbohydrate specific receptors on human neutrophils*. *Kidney Int*, 1993. **44**(2): p. 423-9.
107. Wimmer, T., et al., *Effects of Tamm-Horsfall protein on polymorphonuclear leukocyte function*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(9): p. 2192-7.
108. Schmid, M., et al., *Uromodulin facilitates neutrophil migration across renal epithelial monolayers*. *Cell Physiol Biochem*, 2010. **26**(3): p. 311-8.
109. Micanovic, R., et al., *Tamm-Horsfall Protein Regulates Granulopoiesis and Systemic Neutrophil Homeostasis*. *J Am Soc Nephrol*, 2015. **26**(9): p. 2172-82.
110. Micanovic, R., et al., *Tamm-Horsfall Protein Regulates Mononuclear Phagocytes in the Kidney*. *J Am Soc Nephrol*, 2018. **29**(3): p. 841-856.
111. Devuyst, O., E. Olinger, and L. Rampoldi, *Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders*. *Nat Rev Nephrol*, 2017. **13**(9): p. 525-544.
112. Micanovic, R., et al., *Uromodulin (Tamm-Horsfall protein): guardian of urinary and systemic homeostasis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2020. **35**(1): p. 33-43.
113. Huang, Z.Q., et al., *Bence Jones proteins bind to a common peptide segment of Tamm-Horsfall glycoprotein to promote heterotypic aggregation*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(6): p. 2975-83.
114. Hutchison, C.A., et al., *The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **8**(1): p. 43-51.
115. Fasth, A.L., J.R. Hoyer, and M.W. Seiler, *Extratubular Tamm-Horsfall protein deposits induced by ureteral obstruction in mice*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1988. **47**(1): p. 47-61.
116. Maydan, O., et al., *Uromodulin deficiency alters tubular injury and interstitial inflammation but not fibrosis in experimental obstructive nephropathy*. *Physiol Rep*, 2018. **6**(6): p. e13654.
117. Baez, S., *An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy*. *Microvasc Res*, 1973. **5**(3): p. 384-94.
118. Gorczynski, R.J., B. Klitzman, and B.R. Duling, *Interrelations between contracting striated muscle and precapillary microvessels*. *Am J Physiol*, 1978. **235**(5): p. H494-504.
119. Ley, K. and P. Gaetgens, *Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules*. *Circ Res*, 1991. **69**(4): p. 1034-41.
120. Praetner, M., et al., *Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Neutrophil Infiltration and Tissue Injury on Ischemia-Reperfusion*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. **38**(4): p. 829-842.
121. Wayland, H. and P.C. Johnson, *Erythrocyte velocity measurement in microvessels by a two-slit photometric method*. *J Appl Physiol*, 1967. **22**(2): p. 333-7.

122. Kranig, S.A., et al., *Leukocyte Infiltration of Cremaster Muscle in Mice Assessed by Intravital Microscopy*. J Vis Exp, 2020(158).
123. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
124. Sperandio, M., et al., *Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro*. Methods Enzymol, 2006. **416**: p. 346-71.
125. Meijering, E., O. Dzyubachyk, and I. Smal, *Methods for cell and particle tracking*. Methods Enzymol, 2012. **504**: p. 183-200.
126. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
127. Justus, C.R., et al., *In vitro cell migration and invasion assays*. J Vis Exp, 2014(88).
128. Kurz, A.R., et al., *MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane*. J Clin Invest, 2016. **126**(11): p. 4125-4139.
129. Dayang, E.Z., et al., *Identification of LPS-Activated Endothelial Subpopulations With Distinct Inflammatory Phenotypes and Regulatory Signaling Mechanisms*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1169.
130. Nussbaum, C., et al., *Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny*. J Leukoc Biol, 2013. **93**(2): p. 175-84.
131. Hogg, N., I. Patzak, and F. Willenbrock, *The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(6): p. 416-26.
132. Garimella, P.S. and M.J. Sarnak, *Uromodulin in kidney health and disease*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2017. **26**(2): p. 136-142.
133. Resnick, J.S., S. Sisson, and R.L. Vernier, *Tamm-Horsfall protein. Abnormal localization in renal disease*. Lab Invest, 1978. **38**(5): p. 550-5.
134. Zager, R.A., R.S. Cotran, and J.R. Hoyer, *Pathologic localization of Tamm-Horsfall protein in interstitial deposits in renal disease*. Lab Invest, 1978. **38**(1): p. 52-7.
135. Dunne, J.L., et al., *Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1*. Blood, 2002. **99**(1): p. 336-41.
136. Nie, M., et al., *Uromodulin regulates renal magnesium homeostasis through the ion channel transient receptor potential melastatin 6 (TRPM6)*. J Biol Chem, 2018. **293**(42): p. 16488-16502.
137. Chubanov, V. and T. Gudermann, *TRPM6*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **222**: p. 503-20.
138. Di, A., et al., *Role of the phagosomal redox-sensitive TRP channel TRPM2 in regulating bactericidal activity of macrophages*. J Cell Sci, 2017. **130**(4): p. 735-744.
139. Hecquet, C.M., G.U. Ahmmed, and A.B. Malik, *TRPM2 channel regulates endothelial barrier function*. Adv Exp Med Biol, 2010. **661**: p. 155-67.
140. Immler, R., S.I. Simon, and M. Sperandio, *Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function*. Eur J Clin Invest, 2018. **48 Suppl 2**(Suppl 2): p. e12964.
141. Huang, Z.Q. and P.W. Sanders, *Localization of a single binding site for immunoglobulin light chains on human Tamm-Horsfall glycoprotein*. J Clin Invest, 1997. **99**(4): p. 732-6.
142. McQuarrie, E.P., et al., *Fractional excretions of albumin and IgG are the best predictors of progression in primary glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2011. **26**(5): p. 1563-9.

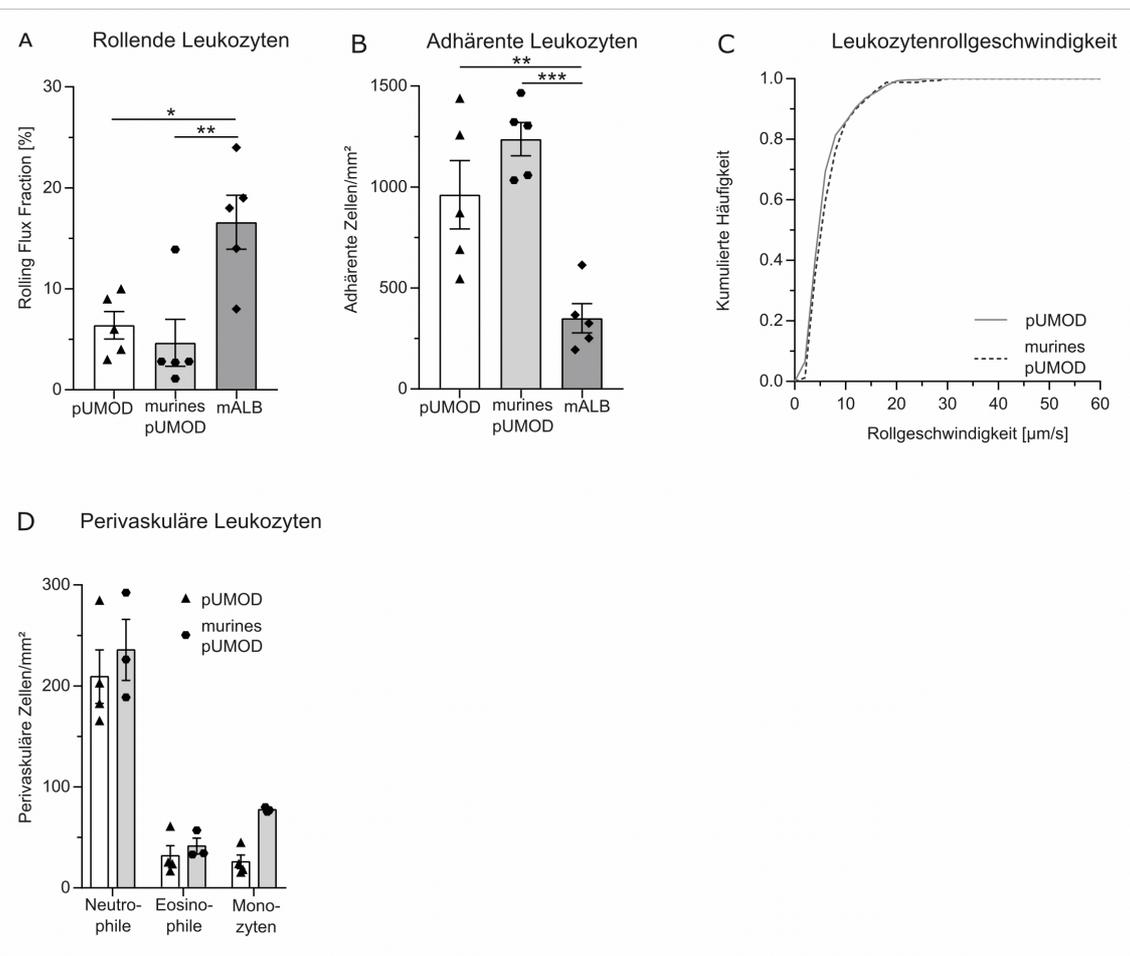
143. Żyłka, A., et al., *Markers of Glomerular and Tubular Damage in the Early Stage of Kidney Disease in Type 2 Diabetic Patients*. *Mediators Inflamm*, 2018. **2018**: p. 7659243.
144. Giaever, I. and C.R. Keese, *A morphological biosensor for mammalian cells*. *Nature*, 1993. **366**(6455): p. 591-2.
145. Immler, R., et al., *Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 588245.
146. Gasparitsch, M., et al., *Tyrphostin AG490 reduces inflammation and fibrosis in neonatal obstructive nephropathy*. *PLoS One*, 2019. **14**(12): p. e0226675.
147. Cavallone, D., N. Malagolini, and F. Serafini-Cessi, *Binding of human neutrophils to cell-surface anchored Tamm-Horsfall glycoprotein in tubulointerstitial nephritis*. *Kidney Int*, 1999. **55**(5): p. 1787-99.
148. Kreft, B., et al., *Polarized expression of Tamm-Horsfall protein by renal tubular epithelial cells activates human granulocytes*. *Infect Immun*, 2002. **70**(5): p. 2650-6.

## 7 Anhang A: Ergebnisse von Kooperationspartnern

### 7.1 Die Wirkung von murinem Uromodulin auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo* im Mauskremastermuskellmodell

Da für die beschriebenen Versuche humanes Uromodulin verwendet wurde, sollte gezeigt werden, dass murines polymerisiertes Uromodulin zu vergleichbaren Ergebnissen führt und ebenfalls dazu in der Lage ist, eine Entzündungsreaktion im Mauskremastermuskell hervorzurufen. Dazu wurde eine verkürzte Form des murinen Uromodulins (aa25-588) verwendet, welche alle wichtigen Domänen des Uromodulin-Proteins besitzt und ebenfalls Polymere formt (Abb. 11, Kapitel 8) [112]. Diese rekombinante murine Form des Proteins wurde WT-Mäusen ebenfalls intraskrotal appliziert. Für diese Versuche, die in Kooperation mit den Arbeitsgruppenmitgliedern Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster und Herrn Dr. Roland Immler entstanden sind, wurde murines rekombinantes polymerisiertes Uromodulin (LSBio, Seattle, USA) und murines Serumalbumin (Sigma-Aldrich) verwendet.

Im Vergleich zu den Versuchen mit humanem Uromodulin ergaben sich in den Versuchen mit dem murinen Uromodulin hinsichtlich der Leukozytenrekrutierung vergleichbare Ergebnisse. So zeigte sich auch nach einer Stimulation mit murinem Uromodulin eine reduzierte Leukozyten-RFF und ein Anstieg adhärenter Leukozyten (Abb. 7A und 7B) im Vergleich zur Injektion von Mausalbumin (mALB). Hinsichtlich der Rollgeschwindigkeiten von Leukozyten zeigten sich keine Unterschiede nach einer Stimulation mit humanem bzw. murinem Uromodulin (Abb. 7C). Hinsichtlich der Extravasation von Leukozyten in das entzündete Gewebe nach der Stimulation mit murinem Uromodulin, zeigte sich auch hier eine deutlich Extravasation von überwiegend neutrophilen Granulozyten (Abb. 7D). Die hämodynamischen Parameter waren zwischen den Versuchsgruppen stets vergleichbar (Tab. 2).



**Abbildung 7: Intraskrotal appliziertes murines polymerisiertes Uromodulin (murines pUMOD) induziert eine mit humanem pUMOD vergleichbare akute Entzündungsreaktion in der murinen Mikrozirkulation in vivo**

Polymerisiertes Uromodulin (pUMOD), murines pUMOD oder Mausalbumin (mALB) wurden 2 Stunden vor Intravitalmikroskopie von postkapillären Venolen des *M. cremaster* i.s. injiziert. (A) Die Leukozyten-Rolling Flux Fraction und (B) die Anzahl adhärenente Leukozyten wurden in 23 (pUMOD, gleiche Werte wie in Abb. 4A-B), 19 (murines pUMOD) und 29 (mALB) postkapillären Venolen des *M. cremaster* von  $n=5$  Mäusen pro Gruppe beurteilt (einfaktorielle ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). (C) Die Leukozyten-Rollgeschwindigkeiten von  $n=274$  (pUMOD, gleiche Werte wie in Abb. 4C) und 161 (murines pUMOD) Zellen in 5 Mäusen pro Gruppe wurden ausgewertet (ungepaarter t-Test). (D) Ermittelte Anzahl an perivaskulären neutrophilen Granulozyten (Neutrophile), eosinophilen Granulozyten (Eosinophile) und Monozyten in 17 (murines pUMOD) und 54 (pUMOD, gleiche Werte wie in Abb. 4E) perivaskulären Regionen von  $n=3-4$  Mäusen pro Gruppe (zweifaktorielle ANOVA, Sidak Post-hoc-Mehrfachvergleich). Durch murines pUMOD wurde die Leukozytenrekrutierungskaskade gleichermaßen wie durch humanes pUMOD beeinflusst. \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,005$ ; die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und als kumulierte Häufigkeiten angegeben (modifiziert nach [145]).

**Tabelle 2: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen**

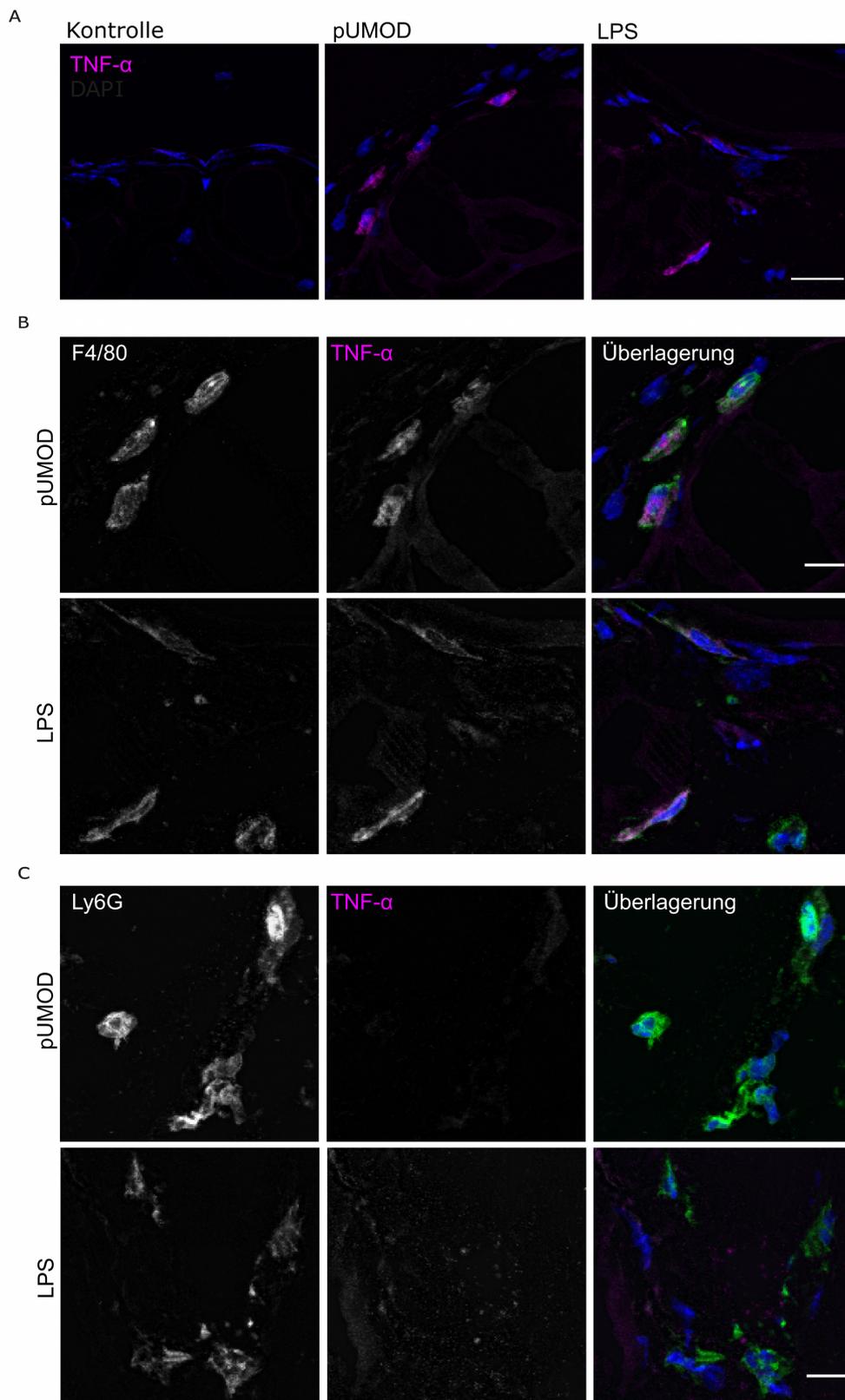
Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit, Wandscherrate und systemische Leukozytenzahl von WT-Mäusen, welche zwei Stunden vor Intravitalmikroskopie mit polymerisiertem Uromodulin (pUMOD), murinem polymerisiertem Uromodulin (murines pUMOD) oder murinem Serumalbumin (murines ALB) stimuliert wurden (MW±SEM; einfaktorielle ANOVA, Tukey-Test als Post-hoc-Mehrfachvergleich). Die Werte der pUMOD-Gruppe entsprechen denen der Tabelle 1 (modifiziert nach [145]).

Stimulus	Mäuse n	Venolen n	Gefäßdurchmesser [μm]	Blutflussgeschwindigkeit [μm s <sup>-1</sup> ]	Wandscherrate [s <sup>-1</sup> ]	Systemische Leukozytenzahl [μl <sup>-1</sup> ]
pUMOD	5	23	31 ± 1	1926 ± 159	1554 ± 116	5858 ± 1081
Murines pUMOD	5	19	32 ± 1	1974 ± 168	1533 ± 135	6788 ± 572
Murines ALB	5	29	31 ± 1	1855 ± 129	1466 ± 106	3943 ± 626
			n.s. (p=0,6631)	n.s. (p=0,8512)	n.s. (p=0,8458)	n.s. (p=0,0690)

## 7.2 Die Wirkung von Uromodulin auf gewebständige Makrophagen

In einer weiteren Versuchsreihe, in welcher eine durch Uromodulin-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung mittels Immunfluoreszenz des Kremastermuskels untersucht werden sollte, wurde der 2 Stunden zuvor mit Uromodulin bzw. LPS stimulierte Kremastermuskel von WT-Mäusen entnommen und anschließend kryokonserviert. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Antikörper gegen murines TNF- $\alpha$  angefärbt. Anti-F4/80 beziehungsweise anti-Ly6G-Antikörper wurden genutzt, um den ursprünglichen Zelltyp der TNF- $\alpha$ -Produktion zu ermitteln. Diese Versuche wurden durch unsere Kooperationspartnerin Frau PD Dr. Heike Beck (Biomedizinisches Centrum der LMU München) durchgeführt.

Im Vergleich zu der Negativkontrolle (NaCl 0,9%-Injektion) führte sowohl die Uromodulin- als auch die LPS-Stimulation zu einer starken TNF- $\alpha$ -Freisetzung wie mittels Konfokalmikroskopie ermittelt wurde (Abb. 8A). Anti-F4/80 beziehungsweise anti-Ly6G-Antikörper wurden genutzt, um den ursprünglichen Zelltyp der TNF- $\alpha$ -Produktion zu ermitteln. Dabei zeigte sich eine starke TNF- $\alpha$ -Freisetzung in F4/80-positiven Makrophagen nach einer Stimulation mit Uromodulin (Abb. 8B). Dieser Effekt ließ sich bei Ly6G-positiven neutrophilen Granulozyten hingegen nicht nachweisen (Abb. 8C).



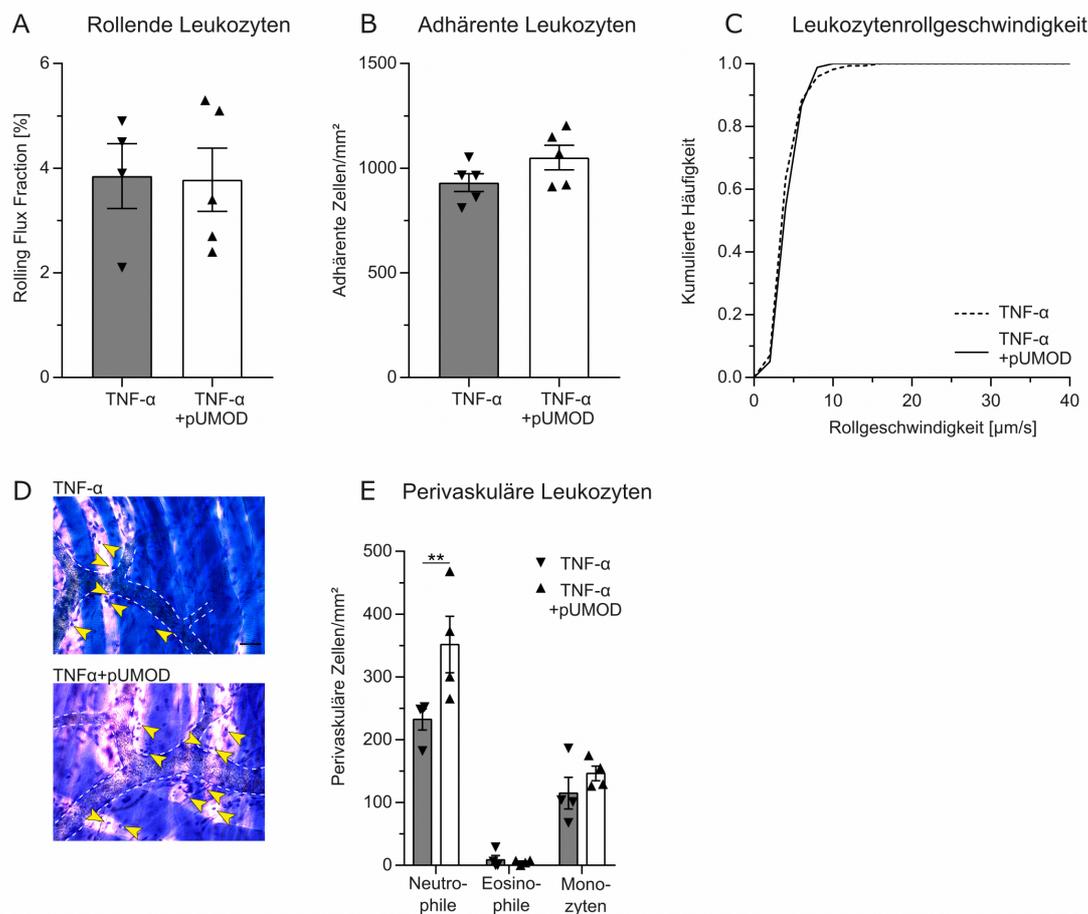
**Abbildung 8: Uromodulin induziert eine TNF- $\alpha$ -Expression in F4/80-positiven Makrophagen im Kremastermuskel *in vivo***

Kryoschnitte von zuvor mit Uromodulin (pUMOD), LPS oder NaCl 0,9% (Kontrolle) stimulierten Kremastermuskeln von WT-Mäusen wurden hinsichtlich der (A) TNF- $\alpha$ -Expression (repräsentative Mikrofotografien von n=3 Mäuse/Gruppe, Maßstabsbalken =20 $\mu$ m; rot: TNF- $\alpha$ , blau: DAPI), (B) Makrophagen (F4/80) (repräsentative Mikrofotografien von n=3 Mäuse/Gruppe, Maßstabsbalken =10 $\mu$ m, grün: F4/80, rot: TNF- $\alpha$ , blau: DAPI) und (C) neutrophilen Granulozyten (Ly6G) (repräsentative Mikrofotografien von n=3 Mäuse/Gruppe, Maßstabsbalken =10 $\mu$ m, grün: Ly6G, rot: TNF- $\alpha$ , blau: DAPI) angefärbt. Die Daten sind als repräsentative Bilder dargestellt (modifiziert nach [145]).

### 7.3 Die gemeinsame Wirkung von Uromodulin und TNF- $\alpha$ auf die Leukozytenrekrutierung *in vivo* im Mauskremastermuskellmodell

Um genauer zu erforschen, ob Uromodulin die Leukozytenrekrutierung einzig über die oben beschriebene TNF- $\alpha$ -Produktion durch Makrophagen beeinflusst oder ob es zusätzlich TNF- $\alpha$ -unabhängige Effekte auf die Leukozytenrekrutierung hat, wurde ein weiteres Mal das Mauskremastermuskell-Modell verwendet. Dabei wurde WT-Mäusen rekombinantes murines (rm) TNF- $\alpha$  (R&D Systems, 500 ng/Maus) oder eine Kombination aus rmTNF- $\alpha$  und Uromodulin (10  $\mu$ g/Maus) intraskrotal appliziert. Wie Abbildung 9A-C zu entnehmen ist, zeigte Uromodulin dabei keinen Effekt auf das TNF- $\alpha$ -induzierte Leukozytenrollen, die -adhäsion oder die Rollgeschwindigkeit in postkapillären Venolen. Interessanterweise wurde jedoch die TNF- $\alpha$ -induzierte Leukozytenextravasation durch Uromodulin verstärkt. In den ausgewerteten Kremastermuskellpräparaten zeigten sich signifikant erhöhte Zahlen ausgewanderter Leukozyten nach einer kombinierten Stimulation mit TNF- $\alpha$  + Uromodulin im Vergleich zu einer alleinigen TNF- $\alpha$ -Stimulation (Abb. 9D und 9E). Die hämodynamischen Parameter waren zwischen den Versuchsgruppen stets vergleichbar (Tab. 3). Diese Ergebnisse deuten auf einen Effekt von Uromodulin auf die Leukozytenextravasation *in vivo* hin, der unabhängig von der TNF- $\alpha$ -vermittelten Wirkung zum Tragen kommt. Die Daten dieser Versuche zeigen, dass eine intraskrotale Uromodulin-Applikation die Effekte von TNF- $\alpha$  im Mauskremastermuskellmodell *in vivo* verstärkt.

Diese Ergebnisse sind in Kooperation mit den Arbeitsgruppenmitgliedern Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster und Herrn Dr. Roland Immler entstanden.



**Abbildung 9: Eine intraskrotale Applikation von Uromodulin verstärkt die Effekte von TNF- $\alpha$  im Maus cremastermuskel-Modell in vivo**

TNF- $\alpha$  oder eine Kombination aus TNF- $\alpha$  + Uromodulin (pUMOD) wurde WT-Mäusen i.s. appliziert. Zwei Stunden später wurden postkapilläre Venolen des stimulierten Cremastermuskels mittels Intravitalmikroskopie untersucht und die (A) Rolling Flux Fraction und (B) die Anzahl adhärenter Leukozyten in 34 (TNF- $\alpha$ ) und 35 (TNF- $\alpha$  + Uromodulin) Venolen von n=5 Mäusen/Gruppe analysiert. (C) Die Rollgeschwindigkeit wurde in n=170 (TNF- $\alpha$ ) und 180 (TNF- $\alpha$ +Uromodulin) Zellen von 5 Mäusen/Gruppe bestimmt. Die gemeinsame Gabe von TNF- $\alpha$  und Uromodulin hatte im Vergleich zu einer alleinigen TNF- $\alpha$ -Gabe keinen zusätzlichen Effekt auf die Rolling Flux Fraction, die Leukozytenadhäsion oder die Rollgeschwindigkeiten (ungepaarter t-Test). (D) Giemsa-Färbung (repräsentative Mikrofotografien von n=4 Mäusen pro Gruppe) von Cremastermuskeltissue. Pfeilspitzen zeigen auf perivaskuläre Leukozyten (Maßstabsbalken=30µm). (E) Die Anzahl perivaskulärer neutrophiler Granulozyten (Neutrophile), eosinophiler Granulozyten (Eosinophile) und Monozyten wurden in 28 perivaskulären Regionen von n=4 Mäusen pro Gruppe analysiert. Die gemeinsame Gabe von TNF- $\alpha$  + Uromodulin erhöhte die Anzahl perivaskulärer neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu einer alleinigen TNF- $\alpha$ -Gabe (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, Sidak Post-hoc-Mehrfachvergleich). \*\*:  $p \leq 0,01$ , die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM), kumulierte Häufigkeiten oder repräsentative Bilder angegeben (modifiziert nach [145]).

**Tabelle 3: Mikrohämodynamische Parameter und systemische Leukozytenzahlen**

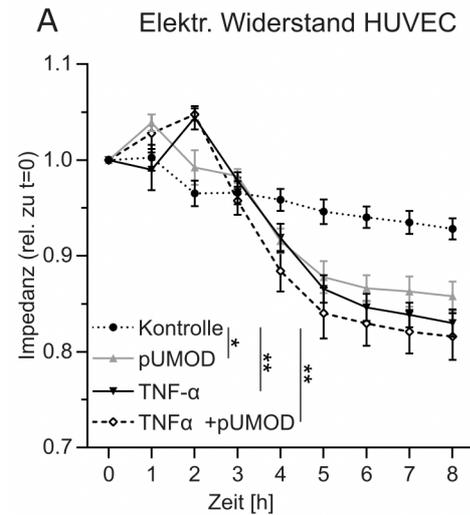
Gefäßdurchmesser, Blutflussgeschwindigkeit, Wandscherrate und systemische Leukozytenzahl von WT-Mäusen, welche zwei Stunden vor Intravitalmikroskopie mit TNF- $\alpha$  oder einer Kombination aus TNF- $\alpha$  und Uromodulin (pUMOD) stimuliert wurden (MW $\pm$ SEM; einfaktorische ANOVA, Tukey-Test als Post-hoc-Mehrfachvergleich (modifiziert nach [145])).

Stimulus	Mäuse n	Venolen n	Gefäßdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Blutflussgeschwindigkeit [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]	Wandscherrate [ $\text{s}^{-1}$ ]	Systemische Leukozytenzahl [ $\mu\text{l}^{-1}$ ]
TNF- $\alpha$	5	34	26 $\pm$ 1	1415 $\pm$ 87	1353 $\pm$ 9	4120 $\pm$ 392
TNF- $\alpha$ + pUMOD	5	35	28 $\pm$ 1	1446 $\pm$ 75	1293 $\pm$ 52	4900 $\pm$ 694
			n.s. (p=0,4181)	n.s. (p=0,7882)	n.s. (p=0,5682)	n.s. (p=0,3563)

## 7.4 Die Wirkung von Uromodulin auf den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER = Transendothelial electrical resistance measurement)

In diesen Experimenten unserer Kooperationspartnerin Frau PD Dr. Hanna Mannell (Biomedizinisches Centrum, LMU München) sollte untersucht werden, ob Uromodulin direkt auf das Endothel wirken kann, um dessen Permeabilität zu erhöhen respektive die Leukozytentransmigration anderweitig zu erleichtern. Um die vaskuläre Permeabilität von Endothelzellen (HUVEC) zu untersuchen wurde eine Herangehensweise mittels der Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)-Technologie gewählt, mit deren Hilfe die endotheliale Barrierefunktion *in vitro* gemessen werden kann.

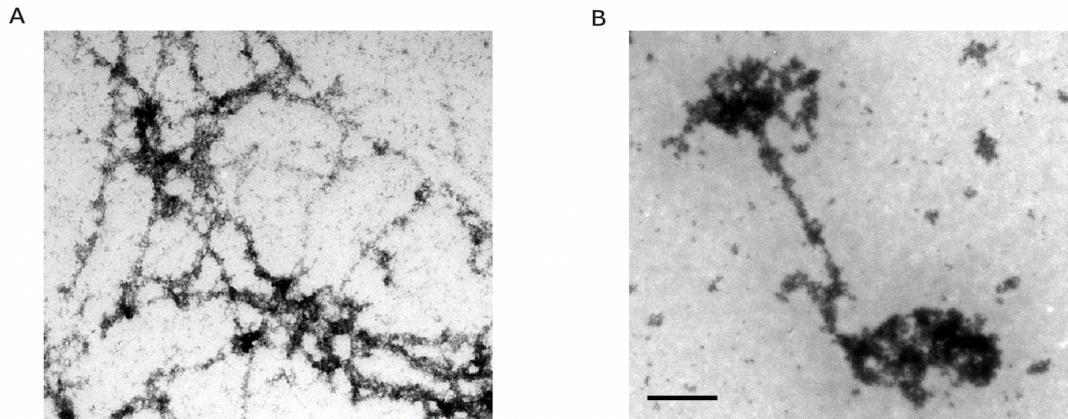
Nach 8-stündiger Versuchszeit wurde im Vergleich zur Negativkontrolle sowohl durch Uromodulin als auch durch TNF- $\alpha$  die elektrische Impedanz des Endothels signifikant reduziert. Wurden Uromodulin und TNF- $\alpha$  gemeinsam angewendet, führte dies interessanterweise zu keiner signifikant zusätzlichen Impedanzminderung (Abb. 10). Diese Impedanzänderung ist als Ausdruck einer Änderung des Stromflusses aufgrund einer Zellformänderung durch den externen Stimulus zu werten und gibt Hinweise auf eine Steigerung der vaskulären Permeabilität. Im vorliegenden Versuch zeigt das, dass Uromodulin gleichermaßen wie TNF- $\alpha$  die endotheliale Permeabilität erhöhen kann.



**Abbildung 10: Uromodulin erhöht die vaskuläre Permeabilität in vitro**

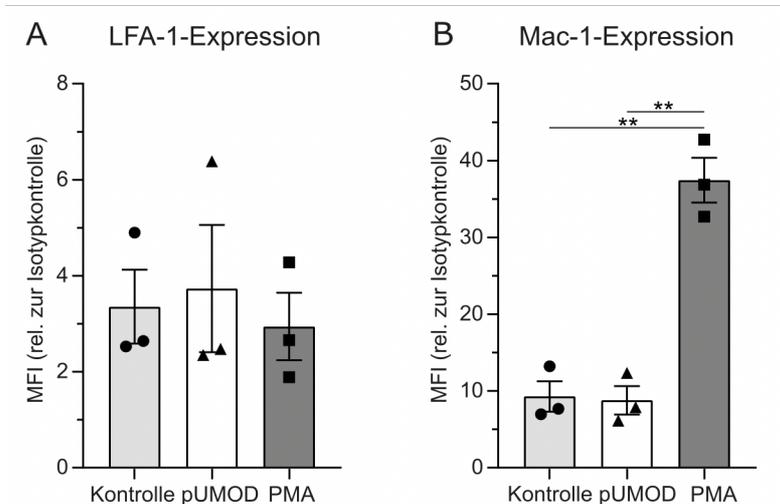
(A) Messung der elektrischen Impedanz von mit Uromodulin (pUMOD), TNF- $\alpha$ , einer Kombination aus TNF- $\alpha$  + pUMOD oder der Negativkontrolle (Kontrolle) stimulierten HUVEC-Monolayern im Verlauf der Zeit ( $n=5$  unabhängige Experimente, einfaktorische ANOVA mit Messwiederholung, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$ ; die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben (modifiziert nach [145]).

## 8 Anhang B: Ergänzende Abbildungen



**Abbildung 11: Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Mikrofotografien humanen und murinen Uromodulins**

(A) Filamentöses Netzwerk von humanem polymerisiertem Uromodulin. (B) Aggregiertes rekombinantes murines Uromodulin (Maßstabsbalken=1µm) (modifiziert nach [145]).



**Abbildung 12: Uromodulin hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression von  $\beta$ 2-Integrinen auf humanen neutrophilen Granulozyten**

Der Grad der Oberflächenexpression von (A) LFA-1 und (B) Mac-1 auf isolierten humanen neutrophilen Granulozyten wurde nach der Stimulation mit Uromodulin (pUMOD), PMA und der Negativkontrolle (Kontrolle) ermittelt (n=3 unabhängige Experimente, einfaktorische ANOVA, Tukey Post-hoc-Mehrfachvergleich). \*\*:  $p \leq 0,01$ , die Daten sind als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben (modifiziert nach [145]).



## 9 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio, der mir dieses hochspannende Thema überlassen und mir damit ermöglicht hat, Doktorand am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin zu werden und meinen Wunsch einer experimentellen Doktorarbeit zu verwirklichen. Das Arbeiten unter seiner Leitung war für mich sehr gewinnbringend. Er hat mein wissenschaftliches Arbeiten mit viel Einfühlungsvermögen und Geduld begleitet und stand mir stets mit Rat zur Seite. In unzähligen Gesprächen bekam ich neue Anregungen für das Projekt und konnte meine Arbeitsweise verfeinern. Seine warmherzige Art, seine Kreativität und Enthusiasmus erleichterte die Arbeit enorm und ließ dieses Projekt erst zu dem heranwachsen, was es heute ist. Ein ebenso ausdrücklicher Dank gebührt Frau Dr. rer. nat. Monika Prünster für die Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Zeit als Doktorand. Sie hat mir geduldig jeden einzelnen Schritt vom Planen über das Durchführen bis hin zum Auswerten von Experimenten erklärt und gezeigt. Sie war für mich stets eine kompetente Ansprechpartnerin, um die Ergebnisse meiner Arbeit kritisch zu diskutieren und den weiteren Weg des Projekts zu planen. Ihre hervorragende Betreuung, ihr Fachwissen und ihr rücksichtsvoller Umgang haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Dr. Roland Immler, den ich aufgrund seiner Kompetenz und Gewissenhaftigkeit, aber auch als geduligen und hilfsbereiten Laborkollegen schätzen gelernt habe. Er stand stets als Ansprechpartner zur Verfügung und brachte konstruktive Ideen ein. Ob beim Mikroskopieren, Erstellen von Grafiken oder bei statistischen Fragen, konnte ich mir bei ihm jederzeit Rat einholen. Darüber hinaus richtet sich mein Dank auch an alle - aktuellen wie ehemaligen - Mitglieder unserer Arbeitsgruppe. Für die Assistenz in labortechnischen Belangen als auch beim Erlernen etablierter Modelle möchte ich mich bei Frau Susanne Bierschenk und Frau Nadine Schmidt bedanken. Zudem haben alle medizinisch-technischen Assistentinnen und Assistenten sowie die Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Tierhaltung dafür gesorgt, dass der tägliche Forschungsbetrieb so reibungslos ablaufen konnte, wie ich es glücklicherweise jeden Tag erfahren habe. Bedanken möchte ich mich zudem bei allen Mitarbeitern der „Core Facility Bioimaging“ (Biomedizinisches Centrum, LMU München) sowie bei Herrn Dr. med. Bernd Uhl für die hervorragende Betreuung bei der Hellfeld- und Fluoreszenz-Mikroskopie. Dankbar bin ich auch für die erfolgreiche Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio und den Mitgliedern

ihrer Arbeitsgruppe. Durch den wissenschaftlichen Austausch und die gemeinsame Arbeit konnte das Projekt in neue Bahnen gelenkt werden und wurde dadurch noch facettenreicher. Ebenso dankbar bin ich für die weiteren erfolgreichen Kooperationen mit Frau PD Dr. rer. nat. Hanna Mannell und Frau PD Dr. Heike Beck.

Diese Arbeit wurde durch das FöFoLe-Programm der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) mit Fördermitteln aus dem Sonderforschungsbereich 914 (SFB 914) gefördert. Ich bedanke mich daher für die Möglichkeit der Teilnahme am FöFoLe-Programm als auch für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg der Integrated Research Training Group des Sonderforschungsbereiches (SFB) 914 „Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease“ der DFG. Durch diese Förderung, die wöchentliche Seminare und die interessanten Mitglieder wurde man dazu motiviert über den Tellerrand hinauszuschauen und hat wiederum neue Anregungen für seine eigene Arbeit bekommen. Danke auch an Frau Dr. Verena Kochan für die ausgezeichnete Koordination und Hilfsbereitschaft bei vielen organisatorischen Fragen. Mein Dank richtet sich auch an die Mitglieder meiner Betreuungskommission (Thesis Advisory Committee, TAC) Prof. Dr. med. Markus Sperandio, Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Oliver Söhnlein und Prof. Dr. med. Christoph Reichel. Als fachkundige Ansprechpartner standen sie immer zur Verfügung, sofern ich Anregungen für meine Arbeit brauchte oder den Zwischenstand meiner Arbeit präsentieren und besprechen wollte.

Auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die dazu beigetragen haben, dass ich jeden Tag aufs Neue mit Freude zur Arbeit gegangen bin, möchte ich danken. Das kollegiale Miteinander im Haus hat zu einer guten Arbeitsdynamik geführt und letztlich auch zum erfolgreichen Abschluss von Projekten beigetragen. Ich bedanke mich für den wissenschaftlichen Austausch, die netten Gespräche und die neu gewonnenen Freundschaften. Die gemeinsamen Erlebnisse und geteilten Erinnerungen tragen dazu bei, diesen Abschnitt meines Lebens als einen besonderen in Erinnerung zu behalten.

Ganz besonders dankbar bin ich allem, was einen während dieses langen Weges begleitet und unterstützt, auch wenn man sich dessen nicht immer bewusst ist. Allen voran sind das die Familie und Freunde. Ohne sie wäre ich heute nicht da, wo ich jetzt bin. Danke für das Interesse und die Unterstützung während dieser Zeit und darüber hinaus.

# 10 Affidavit



## Eidesstattliche Versicherung

Steffen, Tobias

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

### Uromodulin als Modulator von Entzündungen

.....

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, den 27.06.2022

Ort, Datum

Tobias Steffen

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand



# 11 Publikationen

## **Aus der Dissertation hervorgegangene Publikationen**

- Roland Immler, Bärbel Lange-Sperandio, **Tobias Steffen**, Heike Beck, Ina Rohwedder, Jonas Roth, Matteo Napoli, Georg Hupel, Frederik Pfister, Bastian Popper, Bernd Uhl, Hanna Mannell, Christoph A. Reichel, Volker Vielhauer, Jürgen Scherberich, Markus Sperandio and Monika Pruenster, Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation *In Vivo*. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 588245.