

1. Abstract

Precise regulation of protein homeostasis and turnover is critical for cellular health, in particular for the long-term maintenance and survival of post-mitotic cells, such as podocytes. Podocytes are highly specialized epithelial cells and present a major component of the kidney filter. In fact, podocyte injury, ultimately leads to defects of the kidney filtration barrier and to glomerular disease. A unique cell-cell contact, the slit diaphragm (SD), connects cellular processes of neighboring podocytes and acts as a central signaling platform ensuring podocyte function and survival. To manage cellular stress trafficking and function of SD proteins are regulated by posttranslational modifications such as phosphorylation and ubiquitination. HUWE1 is regulating a plethora of substrates involved in crucial cellular processes such as DNA replication and repair, cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In this thesis we aimed to investigate the role of HUWE1 in podocyte homeostasis *in vivo* and *in vitro*.

To this end, we generated mice with a podocyte-specific knockout of *Huwe1* (*Huwe1* pko). Strikingly, these mice exhibited a severe glomerular phenotype: starting at the age of 4 weeks. *Huwe1* pko mice developed heavy proteinuria and prematurely died of renal failure. Histologically, significant foot process effacement resulting in loss of slit diaphragm integrity indicated podocyte damage.

To elucidate the molecular pathways underlying the phenotype in mice, we used modern MS/MS technologies. Interestingly, immunoprecipitation experiments with different HUWE1 specific antibodies from podocytes followed by MS/MS analyses did not reveal overlapping datasets of significant interactors. In contrast, proteomic analyses of cultured podocytes with RNAi-mediated downregulation of *HUWE1* revealed significant changes in overall expression profiles including an increase in the expression of lysosomal proteins and a decrease in proteins of the DNA-damage repair pathways. In line with these results, HUWE1 deficiency induced significant accumulation of lysosomal vesicles both, *in vivo* and *in vitro*. Moreover, mTOR signaling, a major pathway regulating lysosomal biogenesis, was impaired upon loss of HUWE1. Mechanistically, loss of the E3-ligase HUWE1 resulted in a global increase of protein half-life highlighting the importance of this E3-ubiquitin ligase in podocyte's proteostasis. Taken together, this thesis identified HUWE1 as a central regulator of protein homeostasis in podocytes. Further studies are needed to analyze the impact of HUWE1 activity in podocytes as a putative new target for future diagnostic and therapeutic strategies.

2. Zusammenfassung

Die Regulierung der Proteinhomöostase sowie des Protein-Turnovers ist für die Aufrechterhaltung der zellulären Biologie von enormer Bedeutung. Besonders wichtig ist dies für post-mitotische Zellen, wie Podozyten. Podozyten sind hochspezialisierte Epithelzellen, die neben den Endothelzellen und der glomerulären Basalmembran den dreiteiligen Filter der Nieren bilden. Schäden in Podozyten führen zu einer gestörten Filtration und schließlich zu glomerulären Erkrankungen. Die von Podozyten ausgebildeten primären und sekundären Fußfortsätze umwickeln die Kapillaren im Glomerulus vollständig. Dabei bilden die sekundären Fußfortsätze benachbarter Zellen einen einzigartigen Zell-Zell-Kontakt aus, die Schlitzmembran. Diese fungiert nicht nur als Filterbarriere, sondern auch als Signalplattform, die die Podozytenfunktion reguliert und das Überleben der Zelle sicherstellt. Zelluläre Signalwege und die Funktion der Schlitzmembran Proteine werden auch durch post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung, gesteuert. Die E3-Ligase HUWE1 reguliert eine Vielzahl dieser Signalwege, inklusive DNA Replikation und Reparatur, Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose.

Im Rahmen dieser Arbeit, wurde die Rolle von HUWE1 für die Homöostase im Podozyten *in vivo* und *in vitro* untersucht. Dabei zeigte sich, dass der podozyten-spezifische Verlust von HUWE1 in Mäusen zu einer schweren glomerulären Erkrankung führt. Beginnend mit Woche 4 entwickeln die Tiere eine stark ausgeprägte Proteinurie und versterben frühzeitig. Histologisch zeichnet sich der Phänotyp durch ein Abflachen der Fußfortsätze aus, welches im Verlust der Schlitzmembranintegrität resultiert. Um die zugrunde liegenden Mechanismen im Detail verstehen zu können, wurden moderne MS/MS Techniken verwendet. Interessanterweise zeigte sich, dass bei der Analyse von Interaktomdaten, generiert mit verschiedenen HUWE1 spezifischen Antikörpern, keine gemeinsamen Interaktoren für HUWE1 in Podozyten identifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu, konnten in Proteomanalysen aus HUWE1-defizienten Podozyten signifikant regulierte Signalwege identifiziert werden. Die Expression von lysosomalen Proteinen war dabei signifikant erhöht, während Proteine, die eine Rolle bei DNA Reparatur Signalwegen spielen, reduziert waren. Des Weiteren konnte in HUWE1-defizienten Podozyten *in vitro* und *in vivo* eine signifikante Akkumulation von lysosomalen Vesikeln beobachtet werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Verlust von HUWE1 den mTOR Signalweg, ein wichtiger Regulator der Biogenese von Lysosomen, beeinträchtigt und zu einem globalen Anstieg der Protein Halbwertszeiten führt.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die E3-Ligase HUWE1 eine bedeutende Rolle in der Proteostase und Homöostase von Podozyten spielt. Weitere Studien müssen nun untersuchen, inwieweit HUWE1 als potentielles neues Zielprotein für diagnostische und therapeutische Strategien verwendet werden kann.