

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Intrazelluläres Trafficking des nierenspezifischen Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anna-Lena Daigeler

aus München

Datum der Promotion: 05.06.2016

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Abstrakt	7
	Abstract	8
3	Zielsetzung	9
4	Einleitung	10
4.1	Anatomie und Funktion der Niere	10
4.2	Der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife (TAL)	15
4.3	Der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter	16
4.3.1	Struktur von NKCC2.....	17
4.3.2	Regulation der NKCC2-Aktivität	18
4.3.3	NKCC2-Phosphorylierung	19
4.4	Zelluläres Trafficking von NKCC2	20
4.4.1	Apikales Trafficking	21
4.4.2	Subzelluläre Verteilung von NKCC2 in Lipid rafts	22
4.4.3	Clathrin-vermittelte Endozytose	23
4.4.4	VPS10p-Rezeptoren/Sortiline	24
4.5	Endokrine Regulation von NKCC2	26
5	Material und Methoden	28
5.1	Tierexperimentelle Arbeiten	28
5.1.1	Versuchstierhaltung und Behandlung	28
5.1.2	Brattleboro-Ratten	28
5.1.3	Sortilin Knockout-Mäuse	29
5.1.4	Gewebeverarbeitung und Gewebepräparation	29
5.1.4.1	Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung zur Immunhistochemie	29
5.1.4.2	Entnahme von Nierengewebe.....	29
5.1.4.3	Herstellung von Kryostatschnitten	29
5.1.4.4	Herstellung von Paraffinschnitten	30
5.1.4.5	Herstellung von Ultrakryostat-Schnitten.....	30
5.1.4.6	Konventionelle Epon-Einbettung.....	31
5.1.5	Gewebeaufbereitung für biochemische Analysen	31
5.1.5.1	Gewebeaufbereitung für Immunopräzipitation	31
5.2	Zellkultur	32
5.2.1	Zelllinien	32
5.2.2	Biochemische Aufbereitung der Zellkultur	32
5.2.3	Spezifische Vorbehandlung der Zellkulturen	32

5.2.3.1	Stimulation mit Chlorpromazin oder Sphingomyelinase	32
5.3	Proteinanalytische Methoden	33
5.3.1	Verwendete Antikörper	33
5.3.2	Immunhistochemie	34
5.3.3	Elektronenmikroskopie	34
5.3.3.1	Präparation von Plasmamembran Sheets mittels RipFlip-Methode	34
5.3.4	Immunpräzipitation	35
5.3.5	SDS-PAGE und Western Blot	36
5.3.5.1	SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese)	36
5.3.5.2	Immunoblotting	36
5.3.6	Expression von GST-Fusionsproteinen und GST-Pulldown	37
6	Ergebnisse	39
6.1	Topographische Verteilung von NKCC2 und phospho-NKCC2 in der apikalen Plasmamembran des TAL	39
6.2	Mechanismen der NKCC2-Internalisierung	43
6.2.1	Caveolae-vermittelte Endozytose	43
6.2.2	Clathrin-vermittelte Endozytose	45
6.2.2.1	Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose	48
6.2.2.2	Physikalische Interaktion von NKCC2 mit Clathrin-coated pits	50
6.2.3	Regulation der NKCC2-Endozytose durch das antidiuretische Hormon	52
6.3	Die Rolle von Sortilin bei der Internalisierung von NKCC2	55
6.3.1	Verteilung von Sortilin in der Niere und Interaktion mit NKCC2	55
7	Diskussion	59
7.1	NKCC2 befindet sich vorwiegend in <i>Lipid Raft</i>-Domänen	59
7.2	Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist der Hauptweg für die NKCC2-Internalisierung	60
7.2.1	Caveolin-1 ist nicht im TAL exprimiert	61
7.2.2	NKCC2 zeigt eine Ko-Lokalisation mit Clathrin	61
7.2.3	NKCC2 zeigt eine N- und C-terminale Interaktion mit Clathrin	61
7.2.4	Die Phosphorylierung von NKCC2 vermindert die Interaktion mit Clathrin	62
7.2.5	Die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose steigert die Oberflächenexpression von NKCC2	62
7.3	Die ADH-abhängige NKCC2-Phosphorylierung inhibiert seine Internalisierung ...	63
7.3.1	Die ADH-induzierte Phosphorylierung von NKCC2 hemmt kurzzeitig dessen Clathrin-abhängige Internalisierung	63

7.3.2	Potentielle Mechanismen der phospho-abhängigen Regulation der NKCC2-Internalisierung.....	64
7.3.3	ADH stimuliert die Umverteilung von NKCC2 in Lipid Rafts.....	65
7.4	Die Rolle von Sortilin beim zellulären Trafficking von NKCC2.....	65
7.4.1	Sortilin vermittelt die Degradation von NCC in der Niere	66
7.4.2	Die Deletion von Sortilin hat keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von NKCC2	66
8	Schlussfolgerung.....	67
9	Literaturverzeichnis	69
10	Danksagung.....	81

1 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AQP	Aquaporin
ACE	Angiotensin converting enzyme
AP	Adapterproteinkomplex
AT	Angiotensin
BSA	Bovines Serum Albumin
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
EM	Elektronenmikroskopie
ENaC	Epithelial natrium channel
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM1	Gangliosid M1
GPI	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GTPasen	Guanosintriphosphatasen
20-HETE	20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
kD	Kilodalton
M β CD	Methyl-Beta-Cyclodextrin
NKCC 1/2	Natrium ⁺ Kalium ⁺ 2Chlorid ⁻ Transporter 1/2
NCC	Natrium ⁺ 2Chlorid ⁻ Transporter
NaCl	Natriumchlorid
NHE3	Natrium/Protonen ⁺ (H ⁺) Exchanger-3
PBS	Phosphat gepufferte NaCl-Lösung
PCR	Polymerase chain reaction
PKA	Proteinkinase A
PFA	Paraformaldehyd

PGE 2	Prostaglandin E2
OSR1	Oxidative stress responsive kinase 1
RAAS	Renin-Aldosteron-Angiotensin-System
rb	Rabbit
RNA	Ribonucleic acid
mRNA	Messenger ribonucleic acid
SDS-Page	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
SorCS 1-3	Sortilin-related receptors of central nervous system 1-3
SORLA	Sorting protein-related receptor with type A repeats
si-RNA	Small interfering ribonucleic acid
SLC12A	Solute carrier family 12
SPAK	S-related proline/alanine-rich kinase
TAL	Thick ascending limb
TGN	Trans Golgi Netzwerk
THP	Tamm Horsfall Protein
VPS	Vacuolar protein sorting
WNK	With-no-lysine kinase

2 Abstrakt

Der Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Kotransporter (NKCC2) der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (*thick ascending limb*; TAL) ist essentiell für die Harnkonzentrierung und den Elektrolythaushalt. Das antidiuretische Hormon ADH aktiviert den Transporter über Stimulation seiner luminalen Translokation und Phosphorylierung an konservierten N-terminalen Threoninresten (T96, T101, and T114). Währenddessen wird NKCC2 in *Lipid rafts* eingeschlossen. Eine Deaktivierung des Transporters erfolgt über seine Dephosphorylierung und Internalisierung. Hierbei fungiert die Clathrin-abhängige Endozytose als eine der Haupttrouten. In der vorliegenden Arbeit wurde der Hypothese nachgegangen, dass die aktivierende, N-terminale Phosphorylierung von NKCC2 über Hemmung seiner Clathrin-abhängigen Internalisierung den Transporter in der Plasmamembran stabilisieren könnte. Eine Charakterisierung der Verteilung von NKCC2 in der apikalen Membran von TAL-Zellen zeigte eine anteilige Ko-Lokalisation mit Clathrin in *Non-raft* Regionen, während der phosphorylierte Transporter sich vorwiegend in durch Flotillin-1 markierten *Lipid rafts* befand und kaum mit Clathrin kolo-kalisiert war. Eine pharmakologische Inhibition der Clathrin-abhängigen Endozytose mittels Chlorpromazin in kultivierten TAL-Zellen führte zur signifikanten Steigerung der NKCC2-Oberflächenexpression und untermauerte somit die Rolle dieser Internalisierungsrouten im Kontext der NKCC2-Funktion. Die Untersuchung von N-terminalen phospho- sowie dephospho-NKCC2 Mutanten mittels Ko-Immunpräzipitation und *GST-pull-down Assays* deuteten darauf hin, dass die Phosphorylierung des Transporters seine N-terminale Bindung mit Clathrin inhibiert. Weitere Evidenz dafür wurde durch Stimulation von ADH-defizienten Brattleboro-Ratten mit dem ADH-Agonist dDAVP erbracht: die durch dDAVP induzierte Phosphorylierung von NKCC2 ging mit einer Abschwächung seiner Assoziation mit Clathrin einher. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die N-terminale Phosphorylierung von NKCC2 seine Clathrin-abhängige Internalisierung und somit seine Oberflächenexpression und Funktion moduliert.

Abstract

The Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter (NKCC2) of the thick ascending limb (TAL) plays an essential role in the urinary concentration and renal salt handling. Vasopressin stimulates NKCC2 activity by inducing its apical trafficking and phosphorylation at functionally relevant N-terminal residues (T96, T101, and T114 of rat NKCC2). The phosphorylated and thereby activated transporter is chiefly distributed in lipid raft membrane microdomains, whereas its deactivation is associated with dephosphorylation and clathrin-mediated internalization. Whether NKCC2 phosphorylation state affects its trafficking or surface expression was unclear. Therefore, the aim of this study was to evaluate effects of NKCC2 phosphorylation on its clathrin-mediated endocytosis. Evaluation of the topographic NKCC2 distribution in the apical membrane of TAL cells using antibodies that recognize native NKCC2 or its phosphorylated form showed substantial co-localization of both signals with Lipid rafts markers such as flotillin-1 and a partial co-localization of native NKCC2 with clathrin in Non-raft membrane regions was detected. Pharmacological inhibition of clathrin-mediated endocytosis with Chlorpromazin in cultured TAL cells rapidly increased NKCC2 surface expression, suggesting an essential role of this internalization route for the transporters' membrane turnover and function. Co-immunoprecipitation and GST Pulldown assays using N-terminal NKCC2 mutants mimicking its constitutive (de)phosphorylation, suggested that the N-terminal phosphorylation of the transporter may attenuate its association with clathrin-coated pits. Stimulation of NKCC2 phosphorylation *in vivo* by treating AVP-deficient Brattleboro rats with the V2 receptor agonist, dDAVP, reduced the interaction of the transporter with clathrin and increased its surface expression, thus providing further evidence for an interference between NKCC2 phosphorylation and its internalization rate. In summary, the results of this study suggest that N-terminal phosphorylation of NKCC2 attenuates its clathrin-mediated internalization and facilitates therefore its function by stabilizing the transporter in the luminal membrane.

3 Zielsetzung

Der nierenspezifische $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2) der dicken aufsteigenden Henle-Schleife spielt die Schlüsselrolle bei der Harnkonzentrierung und Regulation der renalen Salzausscheidung. Inaktivierende Mutationen im NKCC2 Gen sind ursächlich für die antenatale Form des Bartter-Syndroms und gehen mit einer schweren Störung der Harnkonzentrierung, einer Hypokalämie und metabolischer Alkalose einher. Die pharmakologische Hemmung von NKCC2 durch Verabreichung von Furosemid oder Bumetanid wird klinisch für Behandlung von Ödemen und Herzinsuffizienz breit eingesetzt. Die physiologische Regulation des Transporters erfolgt hauptsächlich auf dem endokrinen Weg, wobei das antidiuretische Hormon (ADH) als ein potenter Stimulus der NKCC2-Funktion identifiziert wurde. Auf der zellulären Ebene hängt die Aktivität von NKCC2 primär von der Oberflächenexpression seiner aktiven, phosphorylierten Form ab. ADH und andere regulatorische Faktoren beeinflussen diese Regelgrößen und steuern somit die NKCC2 Funktion. So steigert ADH die Oberflächenexpression von NKCC2 durch Stimulation des Einbaus von NKCC2-enthaltenden exozytotischen Vesikeln in die luminale Membran. Gleichzeitig erfolgt die ADH-abhängige Phosphorylierung des Transporters durch Stimulation der dafür zuständigen Kinasen. Diese Effekte werden hauptsächlich durch die ADH-abhängige Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels und Aktivierung der Protein Kinase A vermittelt. Die Oberflächenexpression von NKCC2 resultiert aus einem Gleichgewicht zwischen dem exozytotischen Einbau in die Plasmamembran und der endozytotischen Internalisierung des Transporters. Während die molekularen Komponenten des apikalen NKCC2-Traffickings in vorangegangenen Studien detailliert beleuchtet wurden, sind die Mechanismen seiner Internalisierung nur in wenigen Ansätzen untersucht worden. Potentielle Zusammenhänge zwischen der NKCC2-Phosphorylierung und Trafficking wurden ebenfalls bis dato nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese überprüft, dass NKCC2 in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsstatus hauptsächlich über den Clathrin-abhängigen Weg sowohl konstitutiv, als auch hormonell-gesteuert internalisiert wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die eingehende molekulare Charakterisierung der NKCC2-Internalisierung sowie der Regulation dieses Vorganges durch ADH.

4 Einleitung

4.1 Anatomie und Funktion der Niere

Im Säugerorganismus spielt die Niere eine wichtige Rolle in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts, des Blutdrucks sowie der Homöostase des Säure-Basen-Haushalts. Des Weiteren kommt der Niere eine entscheidende Rolle in der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen sowie bei einigen endokrinologischen Funktionen zu. Im Rahmen des Calciumhaushalts produzieren die Nieren Calcitriol, die aktive Form des Vitamin D3 [1, 2]. Die renale Synthese und Freisetzung von Renin ist für die Funktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und damit für die Volumenregulation entscheidend [3-9]. Darüber hinaus produziert die Niere Erythropoetin, welches der humoralen Stimulation der Blutbildung dient [10].

Die Nieren enthalten die harnbildenden Strukturen, zu denen die Nephrone und die Sammelrohre gehören, ebenso wie die harnsammelnden Strukturen, zu denen man die Nierenkelche und das Nierenbecken zählt. Letzteres mündet in den Harnleiter, der am Hilum aus der Niere austritt und zur Harnblase absteigt.

Betrachtet man eine einpapilläre Niere, wie sie zum Beispiel bei Ratten vorkommt, lassen sich im Längsschnitt durch die Niere zwei Anteile unterscheiden: Die Rinde (Cortex renalis) und das Nierenmark (Medulla renalis). Die Rinde umgibt das Nierenmark. Dieses hat die Form einer Pyramide, welche sich papillenförmig in das Nierenbecken zieht und aus einem Außenstreifen, Innenstreifen und der Papille besteht. Die Cortex renalis lässt sich in Rindenlabyrinth und Markstrahlen unterteilen. Große Säuger, inklusive Menschen, besitzen paarig angelegte multipapilläre Nieren. Bei diesen werden die miteinander verwachsenen Rindenteile als Columnae renales bezeichnet.

Die mikroskopisch-anatomische Baueinheit der Niere ist das Nephron. Jedes Nephron enthält die Filtereinheit, bestehend aus einem Nierenkörperchen mit Bowman-Kapsel und ein sich daran anschließendes Tubulussystem. Diesem folgt das Sammelrohrsystem.

Das Nierenkörperchen befindet sich in der Kortex renalis und besteht aus einem Konglomerat aus Kapillarschlingen. Die Kapillarschlingen des Nierenkörperchens werden vom viszeralem Epithel der Bowman-Kapsel, den Podozyten, überzogen. Das Epithel des parietalen Blattes der Bowman-Kapsel ist ein einschichtiges Plattenepithel und geht in den proximalen Tubulus über. Das Kapillarknäuel des Nierenkörperchens

einschließlich der Podozytenbedeckung bildet eine Filtrationsbarriere. Diese besteht aus der Schlitzmembran der Podozyten, dem Gefäßendothel der Kapillaren und der dazwischen gelegenen Basalmembran. Negativ geladenes Podocalyxin und Proteoglycane sortieren die zu filtrierende Substanz nach ihrer Ladung und tragen somit bei der Abstoßung von negativ geladenen Proteinen bei, während die Schlitzmembran die Produkte nach ihrer Größe sortiert (maximal 70 kD). Der Primärharn ist dementsprechend ein nahezu proteinfreies Plasmafiltrat. Die Geschwindigkeit der Filtration pro Zeit wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet und wird typischerweise über die Ausscheidungsrate des harnpflichtigen Kreatinins errechnet. Kreatinin wird fast komplett filtriert und nur zu einem vernachlässigbaren Teil im Tubulussystem resorbiert.

Der filtrierte Primärharn wird nach Bildung im Glomerulum in das Tubulussystem geleitet. Dem Glomerulum schließt sich unmittelbar das proximale Konvolut an, welches in den Intermediärtubulus übergeht. Dieser enthält die dünnen Anteile der Henle-Schleife mit ihrem in das Nierenmark absteigenden sowie den aufsteigenden Schenkel mit dem TAL (Abb. 1). Es folgt der distale Tubulus mit den Zellen der Macula densa und dem gewundenen Konvolut (*distal convoluted tubule*; DCT). Der DCT mündet über den Verbindungstubulus (*connecting tubule*; CNT) ins Sammelrohr (*collecting duct*; CD) welches den Harn aus mehreren Nephronen sammelt und ins Nierenbecken ableitet.

Während der Passage der Nierentubuli wird der Primärharn durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge zum Endharn aufkonzentriert, sodass schlussendlich ca 1 Liter Urin mit harnpflichtigen Substanzen über die ableitenden Harnwege ausgeschieden werden.

(Die wesentlichen Inhalte dieses Abschnittes sind den Lehrbüchern Benninghoff 2003 und Welsch 2006 entnommen)

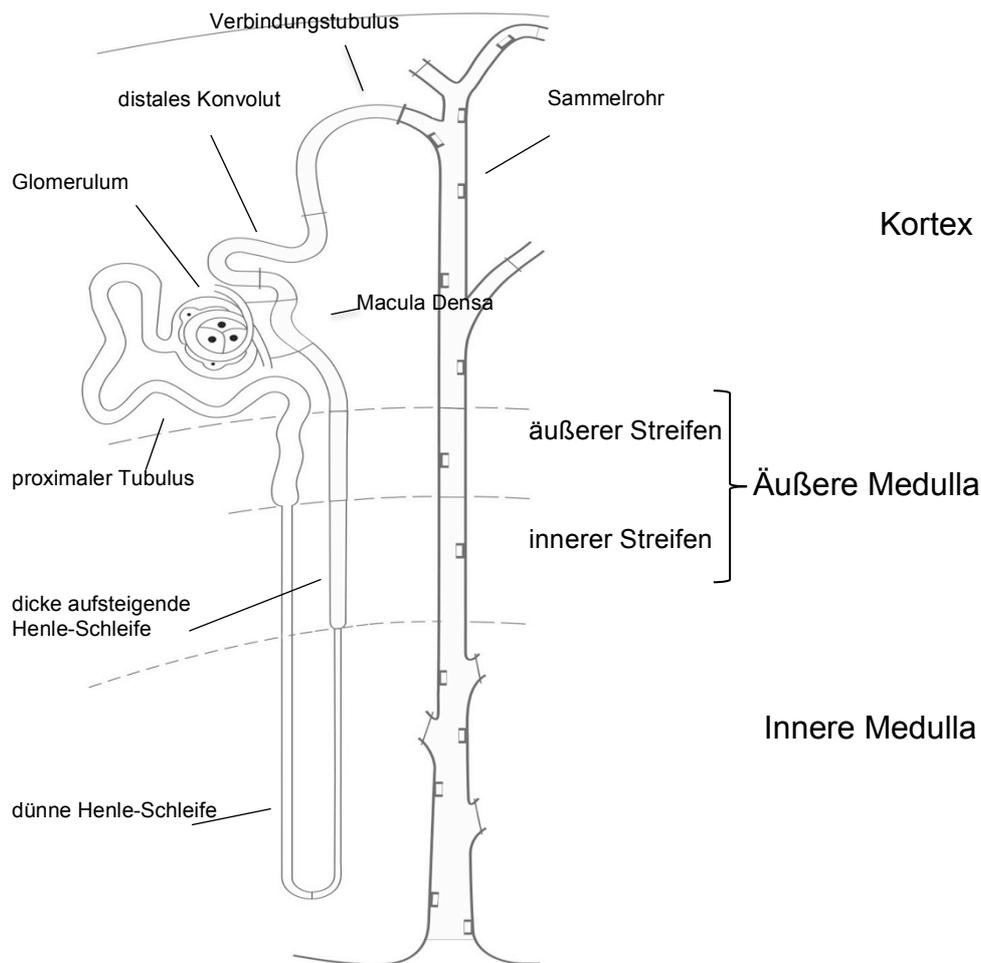


Abb. 1: Nephron als funktionelle Einheit der Niere. Dargestellt ist die Topographie eines Nephrons in den einzelnen Nierenzonen einer multipapillären Säugerniere. Schematisch sind das Glomerulum mit der Bowman-Kapsel, das Tubulussystem und ein ableitendes Sammellohr dargestellt. Das Tubulussystem gliedert sich in den proximalen Tubulus mit Pars convoluta und Pars recta, den intermediären Tubulus mit den dünnen ab- und aufsteigenden Schenkeln der Henle-Schleife mit der Macula Densa, das distale Konvolut, Verbindungstubulus und das Sammellohr.

Der proximale Tubulus besteht aus der Pars convoluta und der Pars recta und ist mit einem kubischen Epithel ausgestattet. Hier werden zwei Drittel der filtierten Elektrolyte und des Wassers, sowie fast alle Aminosäuren rückresorbiert. Der NaCl-Transport wird hier primär durch den luminalen Na^+/H^+ -Austauscher und $\text{Na}^+\text{PO}_4^{3-}$ -Kotransporter gewährleistet. Der Antrieb des Natriumtransports wird durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase erzeugt [11], während die Wasserresorption hauptsächlich durch den Wasserkanal AQP1 vermittelt wird [11]. Die Funktion des proximalen Tubulus unterliegt einer engen endokrinen Kontrolle durch mehrere Hormone wie z.B. Adrenalin, Angiotensin II oder Parathormon [11]. Eine weitere wichtige Funktion des proximalen Tubulus ist der transmembranöse Transport von im glomerulären Filter nicht

zurückgehaltenen Verbindungen mittels Megalin- und Cubilin-vermittelter Endozytose [12].

Im TAL werden 20-30% des filtrierten NaCl über den NKCC2 absorbiert. Da der TAL keine Wasserkanäle exprimiert, wird hier die NaCl-Resorption von der Wasserresorption entkoppelt. Dieser Vorgang wird als „Einzeleffekt“ des Harnkonzentrierungsmechanismus bezeichnet und führt zur progressiven Verdünnung des Harns entlang dem TAL [13]. Daher wird der TAL auch als Verdünnungssegment bezeichnet. Der NKCC2 wird durch das Diuretikum Furosemid gehemmt und ist deshalb von großer klinischer Bedeutung. Die Aktivität des Transporters wird über das antidiuretische Hormon (ADH; Vasopressin), Parathormon und einige andere Hormone, die ihre Effekte über Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels ausüben, entscheidend reguliert [11, 14]. Abgesehen von der transzellulären NaCl-Aufnahme wird im TAL ein wesentlicher Anteil an filtriertem Ca^{2+} und Mg^{2+} parazellulär rückresorbiert [14].

Der darauf folgende DCT gewährleistet die Rückresorption von 5-10% des filtrierten NaCl und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Feinregulation der Salzausscheidung [14]. Der transzelluläre NaCl-Transport wird hier luminal durch den Thiazid-sensiblen NaCl-Transporter (NCC) vermittelt. Des Weiteren werden im DCT transzellulär Ca^{2+} und Mg^{2+} wieder aufgenommen. Schließlich bestimmt die Transportaktivität von NCC die Salzbelastung des nachgeschalteten Sammelrohrs und spielt somit eine Rolle für den Na^+/K^+ -Austausch in diesen Segmenten. Der DCT ist dadurch in die Bilanzierung der renalen Kaliumausscheidung indirekt eingebunden [14, 15].

Die Sammelrohre sind schließlich für die regulierte Rückresorption von Wasser im Rahmen der Harnkonzentrierung zuständig. Hier werden unter ADH-Kontrolle die AQP2 Wasserkanäle in die luminale Plasmamembran der Hauptzellen eingebaut. Da das Sammelrohr ein mit Salzen und Harnstoff angereichertes Interstitium durchfließt, erfolgt hier ein kontinuierlicher Wasserentzug über Osmose und so die Harnkonzentrierung [13]. Wasser und Elektrolyte werden schließlich über die renalen Gefäße ins Blutplasma aufgenommen. Die Schaltzellen des Sammelrohrs erfüllen verschiedene Aufgaben in der Regulation des Säure-Basen-Haushalts. Je nach Bedarf werden hier H^+ -Ionen oder HCO_3^- -Ionen sezerniert um einen stabilen pH-Wert im Plasma aufrechtzuerhalten.

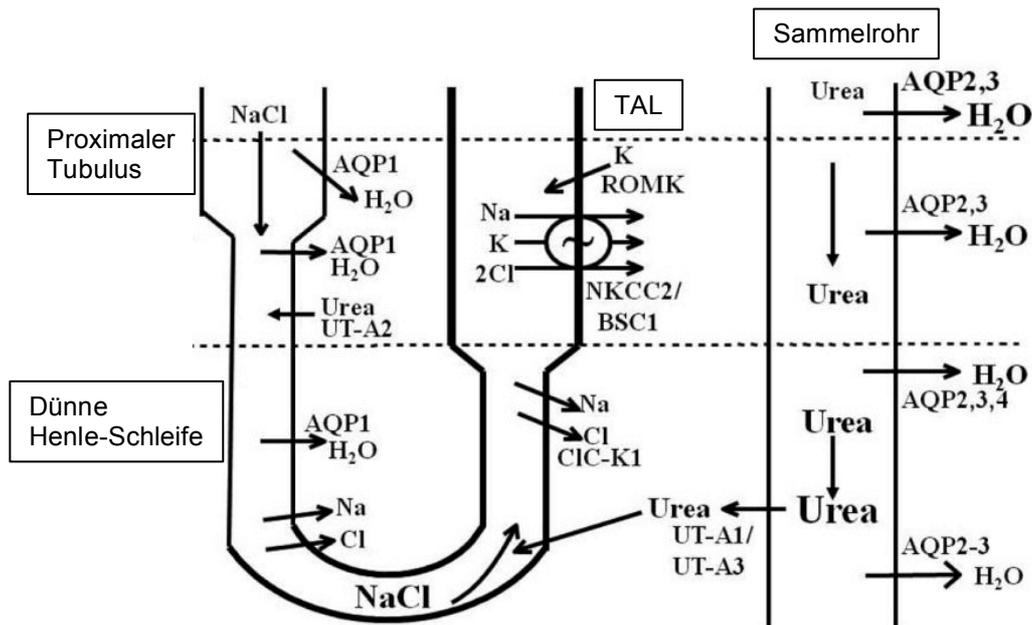


Abb. 2: Schematische Darstellung von Transportprozessen im Rahmen der Harnkonzentrierung (modifiziert nach [13]). Im linken Bildabschnitt ist die Henle-Schleife dargestellt während der rechten Abschnitt die Vorgänge im Sammelrohr wiedergibt. Im TAL findet aktive Resorption von Na^+ und Cl^- durch den NKCC2 statt. Durch gleichzeitig fehlende Wasserresorption wird der Harn im Tubulus verdünnt bzw. hypoosmolar. Gleichzeitig reichert sich im Interstitium des äußeren Nierenmarks Kochsalz an. Dadurch wird ein hyperosmolares Milieu erzeugt. Dieser NKCC2-abhängige Vorgang ist eine Voraussetzung für die weiteren Schritte der Harnkonzentrierung und wird als *single effect* bezeichnet. Eine weitere osmotische Anreicherung des medullären Interstitiums erfolgt über den passiven Austausch von NaCl und Harnstoff im dünnen absteigenden Schenkel der Henle-Schleife sowie durch eine intensive Rückresorption von Harnstoff im Sammelrohr. Eine Resorption von Wasser findet im dünnen aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife über den konstitutiv exprimierten AQP1 sowie in Hauptzellen des Sammelrohrs über den durch ADH gesteuerten luminalen AQP2 und die konstitutiven basolateral gelegenen AQP3 und AQP4 statt. Die beschriebenen Transportvorgänge sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die resorptive Leistung des Nephrons hängt vorrangig von seiner GFR ab. Die GFR wird unter anderem durch den juxtaglomerulären Apparat (JGA) reguliert. Seine drei Komponenten, die granulierten Renin-produzierenden glatten Muskelzellen des Vas afferens, die Macula Densa-Zellen und das extraglomeruläre Mesangium, sind morphologisch und funktionell miteinander verbunden und interagieren vermutlich miteinander. Die spezialisierten Zellen der Macula Densa sind im kortikalen TAL lokalisiert und haben einen engen Kontakt mit dem zugehörigen Glomerulum und dem Vas afferens über die extraglomerulären mesangialen Zellen. Diese Zellen besitzen luminal den NKCC2, gewährleisten aber vermutlich weniger den transzellulären Transport, sondern erfüllen die Aufgabe eines Sensors für die Chloridkonzentration des

vorbeifließenden Harns. Veränderungen der luminalen Salzbeladung an der Macula Densa führen so zu einer Adenosin-vermittelten Reaktion der afferenten Arteriole [16, 17]. Dieser Vorgang wird als tubuloglomeruläres Feedback (TGF) bezeichnet [18]. Als langfristige Antwort wird auch die Synthese der Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Macula Densa-Zellen moduliert. COX-2 ist ein Enzym welches die Prostaglandin E2 (PGE2)-Synthese aus Arachidonsäure katalysiert [19, 20]. PGE2 kann dann die resorptive Leistung des distalen Nephrons und die Regulation der Reninsekretion modulieren [19, 20]. Diesem Mechanismus kommt neben dem TGF vermutlich eine Bedeutung bei Blutdruck- und Volumenregulation zu. Ein Abfall des Blutdrucks und eine verminderte Durchblutung des Glomerulums führt generell zu einer Steigerung der Sekretion von Renin aus den granulierten Zellen. Renin aktiviert nachfolgend das RAAS-System. Dessen Produkt, Angiotensin 2 (Ang II) [21-23], führt im proximalen Tubulus und im distalen Nephron zu einer verstärkten Natriumresorption, was eine Erhöhung des Intravasalvolumens zur Folge hat [22, 24]. Am Vas afferens und in den peripheren Gefäßen führt Ang II zusätzlich zu einer Vasokonstriktion. Diese führt zu einer Kompensation des Blutdruckabfalls über Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstands und somit zu einer Erniedrigung der GFR.

Bei den zahlreichen Funktionen, die die Niere erfüllt, ist die Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Volumenhaushalts für das Überleben der Säuger von zentraler Bedeutung. Der Harnkonzentrierungsmechanismus spielt hierbei eine wichtige Rolle. Einer der entscheidenden Mitspieler in diesem Vorgang ist der NKCC2-Kotransporter im TAL.

4.2 Der dicke aufsteigende Schenkel der Henle-Schleife (TAL)

Der TAL kann in einen kortikalen und einen medullären Teil unterteilt werden. Die beiden Abschnitte haben zwar die gleiche Ausstattung mit Ionentransportern und Ionenkanälen, zeigen allerdings verschieden ausgeprägte Antworten auf endokrine Stimuli [25]. Der kortikale Abschnitt des TAL enthält außerdem die spezialisierten Zellen der Macula Densa. Der TAL resorbiert annähernd 25% des filtrierte NaCl. Das Epithel des TAL leistet den aktiven transzellulären NaCl-Transport bei gleichzeitiger Undurchlässigkeit für Wasser. Auf der basolateralen Seite besitzt die TAL-Zelle reichlich Na⁺/K⁺-ATPase, welche als treibende Kraft für die Aktivität des sekundär-aktiven luminalen Transporters, NKCC2, sorgt. Für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gleichgewichts besitzt die TAL-Zelle auch Kanäle für K⁺ und Cl⁻,

nämlich den luminalen *rat outer medullary potassium channel* (ROMK) sowie die basolateralen Chloridkanäle CIC-Ka und CIC-Kb mit deren funktionell wichtigen Untereinheit Barttin [26, 27]. Parazellulär werden hier Ca^{2+} und Mg^{2+} resorbiert. Dieser Vorgang wird durch *Tight Junctions* und den hier integrierten Claudinen ermöglicht [28]. Die transzelluläre NaCl-Resorption schafft hierbei ein transepitheliales Potential, welches im Wesentlichen die parazelluläre Resorption von divalenten Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}), aber auch von Na^+ ermöglicht [29] (Abb. 3).

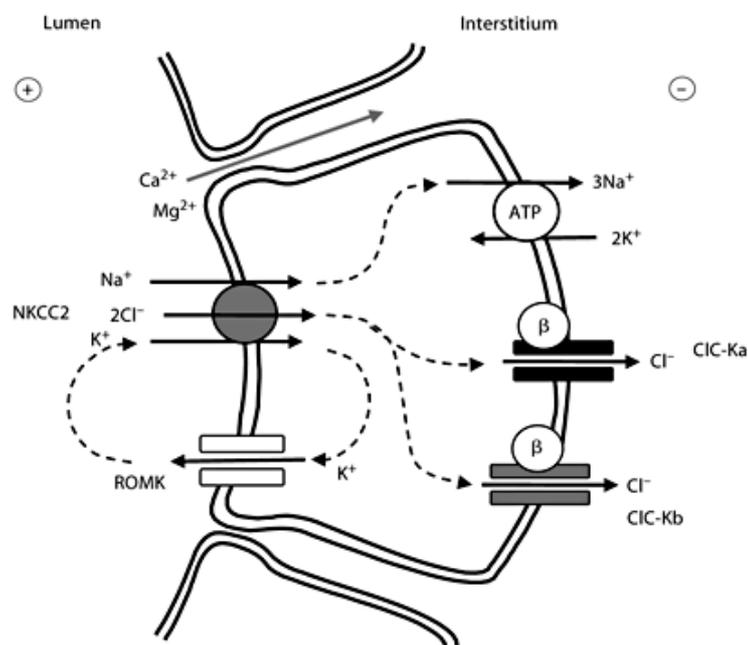


Abb. 3: Salzresorption im TAL [30]. Angetrieben durch die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase wird Natrium gemeinsam mit K^+ und Cl^- durch NKCC2 über die apikale Zellmembran in die Zelle des TAL transportiert. K^+ wird über die apikale Membran durch den ROMK Kaliumkanal wieder aus der Zelle heraus transportiert. Die zwei Chloridkanäle, CIC-Ka und CIC-Kb, und deren funktionell-relevante β -Untereinheit Barttin (β) sorgen für die basolaterale Ausschleusung von Cl^- . Diese Transportvorgänge schaffen ein lumenpositives Potential, welches die parazelluläre Resorption von Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ermöglicht.

4.3 Der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Kotransporter

Die Familie der elektroneutralen Kationen-Chlorid-Kotransporter beinhaltet bei Säugern neun Mitglieder [31, 32] und kann in zwei Hauptäste eingeteilt werden, die $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Kotransporter (SLC12A1-3) und die K^+/Cl^- -Kotransporter (SLC12A4-7) [31, 32]. NKCC2 und NCC (SLC12A1 und SLC12A3) zeigen eine nierenspezifische Expression und sind wesentlich in die Rückresorption des filtrierten NaCl involviert [31, 32]. Das dritte Gen dieser Gengruppe, SLC12A2, kodiert für den NKCC1, welcher eine ubiquitäre Expression in Epithelzellen aufweist und in zahlreiche zelluläre und systemische

Vorgänge inklusive Osmoregulation und Volumenregulation involviert ist [32]. Die vier K^+Cl^- -Kotransporter-Gene SLC12A4-7 sind in mehreren Gewebearten wie z.B. dem peripheren Nervensystem zu finden und spielen hier eine Rolle bei Zellvolumenregulation und dem transepithelialen Salztransport. Welche Substrate von SLC12A8 und SLC12A9 transportiert werden und welche physiologische Rolle die beiden Transporter spielen, ist bis jetzt noch unbekannt [33]. Inaktivierende Mutationen der renalen $Na^+(K)^+Cl^-$ -Kotransporter führen zu seltenen monogenen Erkrankungen mit Beeinträchtigung der Harnkonzentrierung bzw. der Elektrolyt- und Volumenhomöostase [32]. Hierbei ist vor allem das Bartter-Syndrom I zu nennen, welches bei inaktivierenden Mutationen von SLC12A1 verursacht wird [33-35]. Das pränatale Bartter-Syndrom I ist durch ein polyformes Krankheitsbild mit Dehydration durch Erbrechen und Polyurie sowie Nephrokalzinose gekennzeichnet. Aufgrund der Auswirkungen auf den Volumenhaushalt bei einer gestörten Funktion des NKCC2 bewirkt das Bartter-Syndrom I eine Hypokaliämie und hypochlorämische metabolische Alkalosen. Diese gehen mit erhöhten Renin- und Aldosteronspiegeln bei niedrigen bis normalen Blutdruck-Werten einher [32]. Im Bartter-Mausmodell mit einem NKCC2-*Knockout* beobachtet man in der Regel einen frühen letalen Verlauf der Tiere [36].

4.3.1 Struktur von NKCC2

Die Primärstruktur der NKCC2 von Ratte, Kaninchen, Maus und Mensch wurde in den neunziger Jahren über Homologien mit dem $Na^+-K^+-Cl^-$ -Kotransporter NKCC1 aus der rektalen Drüse des Hais festgelegt [37]. NKCC2 ist ein membranständiges Protein mit einem Molekulargewicht von 160 kD und besitzt eine für die SLC12A-Genfamilie übliche 12-Transmembrandomänen-Topologie (Abb. 4). Der intrazelluläre NH_2 -Terminus von NKCC2 enthält die meisten bis jetzt bekannten regulatorischen Phosphorylierungsstellen, während der COOH-Terminus relevante Motive für die Sortierung und das Trafficking des Transporters aufweist [36].

Es konnte gezeigt werden, dass alternatives *Splicing* von Exon 4 des SLC12A1-Transporters zur Translation von drei verschiedenen Isoformen des Transporters führt, nämlich NKCC2-A, NKCC2-B und NKCC2-F [36]. Diese Isoformen unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz der zweiten Transmembrandomäne, die vermutlich im Ionenkanalbereich liegt. Funktionell zeigen NKCC2-A, NKCC2-B und NKCC2-F eine unterschiedliche Affinität zu den drei zu transportierenden Elektrolyten Na^+ , K^+ und Cl^- .

Außerdem unterscheiden sich ihre Expressionsmuster entlang dem TAL [38-41]. Es konnte gezeigt werden, dass im medullären Teil des TAL, in dem hauptsächlich die Isoform F zu finden ist, der Salztransport im Vergleich zu kortikalen Anteilen mit einer hohen Expression an NKCC2-B geringer ist. Hinzu kommt, dass die Expressionsstärke von NKCC2-A und NKCC2-B in der Macula Densa bei hohen oder niedrigen Salzkonzentrationen variieren kann und diese Isoformen somit an Adaptionsprozessen der Macula Densa beteiligt sind [42].

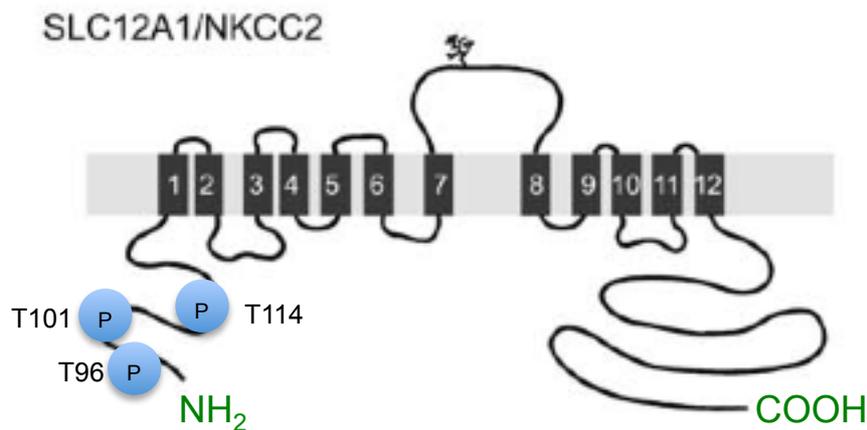


Abb. 4: Topologie von NKCC2 aus der SLC12-Familie (modifiziert nach [32]). SLC12A1/NKCC2 besteht aus 12 Transmembrandomänen, die in dieser Abbildung schematisch dargestellt und von 1-12 durchnummeriert wurden. Es findet sich ein N- (NH_2) und ein C-terminaler (COOH) intrazellulärer Terminus. An den N-terminalen Threoninen T96, T101 und T114 finden sich die Phosphorylierungsstellen (P). Zusätzlich zeichnet NKCC2 ein nach extrazellulär ragender Loop aus, welcher mit einer Glycocalix besetzt ist.

4.3.2 Regulation der NKCC2-Aktivität

Die funktionellen Eigenschaften von membranständigen Ionenkanälen und Transportern werden durch eine Reihe von Parametern bestimmt. Zu diesen gehören unter anderem die Modulation der Expression an der Zelloberfläche und die Regulation der Transportaktivität. Hierfür notwendige Stellgrößen sind die Biosynthese, intrazelluläres Trafficking und Phosphorylierung [43-48]. Diese Wege können durch endokrine Stimuli wie Glukagon, Parathormon oder das RAAS reguliert werden [46, 47, 49-53]. Die *With-no-lysine*-Kinasen (WNK-Kinasen) modulieren die Funktion der CCC-Transporter, zu denen auch NKCC2 zählt, über Phosphorylierung an konservierten N-terminalen Threoninen und Serinen [44, 54-57]. Die katalytische Wirkung der WNK-Kinasen wird durch andere Kinasen wie die *homologe SPS-related proline/alanine-rich*

kinase und die *oxidative stress responsive kinase 1* (SPAK bzw. OSR1) vermittelt [40, 44, 49, 58, 59].

4.3.3 NKCC2-Phosphorylierung

Die NKCC2-Phosphorylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation, die die Aktivität des Transporters entscheidend beeinflusst [40, 43, 44, 46, 56, 58, 60-62]. Unsere und andere Arbeitsgruppen konnte zeigen, dass die Aktivierung von NKCC2 mit der Steigerung seiner Phosphorylierung einhergeht [40, 47-49, 51-53, 56, 58, 63].

In den letzten Jahren wurde eine Reihe an regulatorischen Phosphoakzeptoren am N-Terminus von NKCC2 identifiziert [40]. Einige dieser Akzeptoren, z.B. die Threoninreste T96, T101 und T114, wurden als Substrate für SPAK und OSR-1 identifiziert.

Eine katalytisch-inaktive, trunkierte *Splice*-Variante der SPAK-Kinase kommt hauptsächlich in der Niere vor und wird deswegen als nierenspezifische (*kidney-specific*; KS) KS-SPAK bezeichnet [44]. In der Niere wird KS-SPAK vorwiegend im TAL exprimiert und übt hier dominant-negative Effekte auf die Interaktion von NKCC2 mit den katalytisch aktiven SPAK und OSR1 aus [44, 49] (Abb. 5). Eine weitere aktivierende Phosphorylierung von NKCC2 an Serin 126 wird durch die Protein Kinase A (PKA) und AMP-aktivierte Protein Kinase (AMPK) geleistet [40, 51]. Die Phosphorylierung des Transporters an mehreren Stellen wirkt offenbar synergistisch für seine Aktivierung [40, 60].

Weit weniger ist derzeit bekannt über die Mechanismen der NKCC2-Dephosphorylierung. Die Dephosphorylierung des strukturell verwandten NCC erfolgt, zumindest teilweise, unter Beteiligung der Calcineurinphosphatase (Cn), allerdings sind die genauen Mechanismen der Cn-NCC-Interaktion noch nicht charakterisiert [64]. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass die NKCC2-Dephosphorylierung ebenfalls durch Cn vermittelt werden kann. Abbildung 5 spiegelt schematisch den Stand der Kenntnis über die Phosphoregulation von NKCC2 wider.

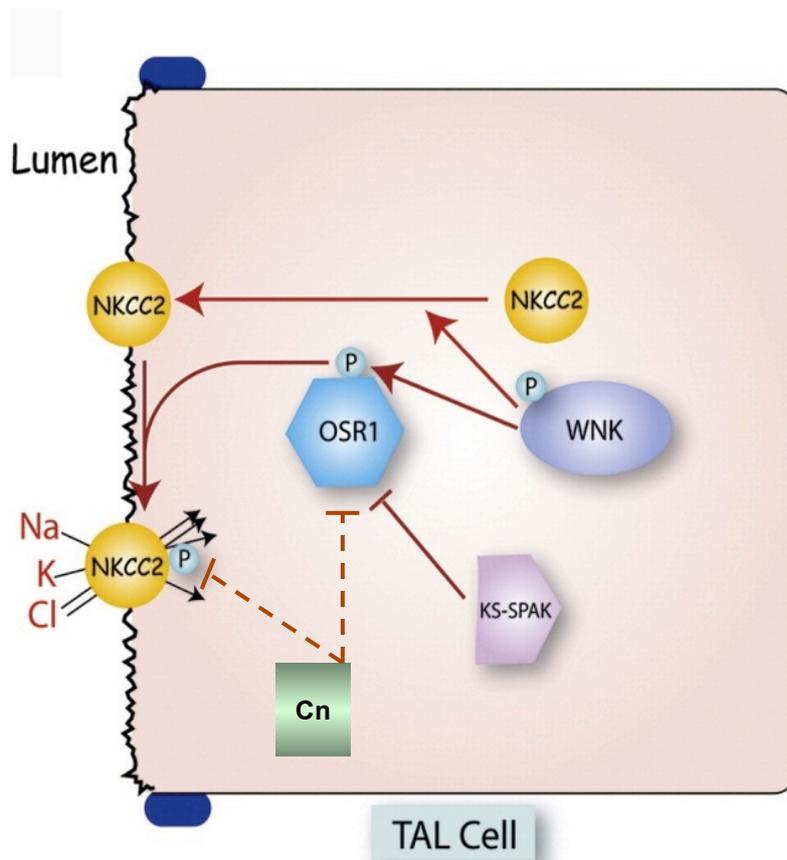


Abb. 5: Modell der Phosphoregulation von NKCC2 (modifiziert nach [44]). WNK-Kinasen phosphorylieren und aktivieren die nachgeschalteten Kinasen OSR1 und SPAK, welche NKCC2 direkt phosphorylieren und somit aktivieren können. Im TAL spielt OSR1 für die Aktivierung von NKCC2 eine bedeutende Rolle. Die verkürzte, katalytisch inaktive Isoform von SPAK (KS-SPAK) inhibiert die Phosphorylierung des Transporters dominant negativ. Calcineurin (Cn) ist als Phosphatase in die Dephosphorylierung von NKCC2 involviert.

4.4 Zelluläres Trafficking von NKCC2

Die Oberflächenexpression von NKCC2 wird durch zelluläre Traffickingvorgänge bestimmt. Eine wichtige Bedeutung nehmen die Vorgänge der konstitutiven Exozytose und Endozytose sowie das Recycling von NKCC2 ein [25, 50, 65-67] (Abb. 6).

Wie jedes membranständige Protein kann NKCC2 theoretisch über verschiedene Endozytoserouten internalisiert werden. Die konstitutive Endozytose ist dabei als Endozytose ohne hormonelle Stimulation definiert. Hierbei werden ca. 30% des internalisierten NKCC2 rezykliert, der Rest wird auf lysosomalen Weg degradiert [25, 67]. Molekulare Mechanismen, die bei diesen Vorgängen eine Rolle spielen, sind Gegenstand aktiver Forschung [65].

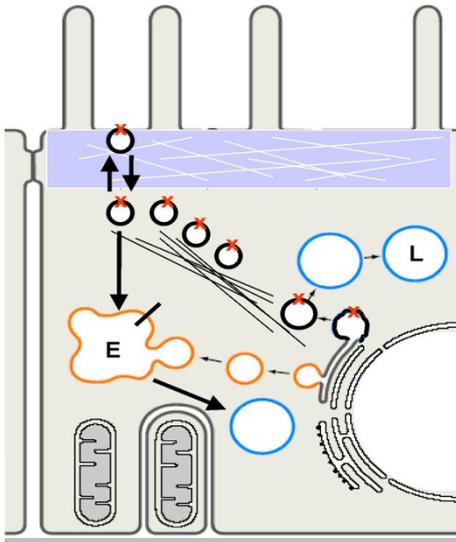


Abb. 6: Vereinfachte Darstellung der intrazellulären Wege eines transmembranständigen Proteins.

Die Proteine der Transmembrantransporter werden im TransGolgi-Netzwerk synthetisiert und über intrazelluläre Transportsysteme in apikale Bereiche der Zelle transportiert. Von hier können sie je nach Bedarf in die Plasmamembran eingebaut werden. Werden sie hier nicht mehr benötigt, können sie endozytotisch (E) wieder in die Zelle aufgenommen werden. Es folgt entweder ein Recycling in die Plasmamembran oder ein lysosomaler Abbau (L).

4.4.1 Apikales Trafficking

Die Mechanismen der apikalen Sortierung von NKCC2 sind mittlerweile gut verstanden worden. [68]. Die Oberflächenexpression von NKCC2 wird unter anderem durch kurzfristige Anpassungen der Bilanz der intrazellulären cAMP- und Ca^{2+} -Spiegel bestimmt [51, 69]. Bei kurzzeitigen Effekten führt eine Steigerung des cAMP-Spiegels zur Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) und einer schnellen Rekrutierung der apikalen NKCC2-enthaltenden Vesikel in die Plasmamembran [69]. Die meisten NKCC2-aktivierenden Hormone wie ADH oder PTH erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel in den Zellen des TAL [46, 48, 51, 53, 61]. Im Gegensatz dazu inhibiert ein Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels die NKCC2-Funktion auf eine noch nicht im Detail geklärten Weise [14]. In den letzten Jahren ist allerdings der *calcium-sensing receptor* als ein wichtiges Element dieser Ca^{2+} -Signaltransduktion erkannt worden [14].

Der C-Terminus von NKCC2 enthält ausserdem mehrere konservierte Dileucin-Motive, welche als Sortierungssignale für das anterograde Trafficking fungieren [70]. Die Glykosylierung des Transporters spielt hierbei eine essentielle Rolle [70, 71].

Es wurden in den letzten Jahren einige Proteine identifiziert, die die apikale Translokation des Transporters modulieren. Das *Secretory carrier membrane protein 2*

und die Aldolase- β inhibieren die exozytische Insertion von NKCC2 in die Plasmamembran [70], wohingegen die Fusion von NKCC2-enhaltenden zytoplasmatischen Vesikeln mit der Plasmamembran über *N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor* (SNARE)-Proteine [50, 69] wie *Vesicle-associated membrane proteins* (VAMP) VAMP1 und VAMP2 vermittelt wird [69].

Die apikale Translokation wird ebenso durch eine Insertion des Transporters in *Lipid rafts* und durch bestimmte *Lipid raft*-vermittelte Interaktionen begünstigt [53].

4.4.2 Subzelluläre Verteilung von NKCC2 in Lipid rafts

Lipid rafts sind 50 bis 200 nm große Domänen innerhalb der Plasmamembran, die mit Cholesterin, Glycosphingolipiden und Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen angereichert sind. [72, 73]. Auch Flotilline konnten in *Lipid rafts* nachgewiesen werden [72, 74-76]. Flotilline haben bei Säugetieren als Gerüstproteine (*scaffolding proteins*) vielfältige Aufgaben wie neuronale Regeneration, Zellproliferation oder Endozytose. Neben Flotillin zeichnen sich GM1 und Tamm-Horsfall-Protein (THP) als etablierte Marker für *Lipid rafts* aus [76].

Simons et al. haben das Prinzip der Subkompartimente innerhalb der Plasmamembran mit den organisierten Domänen der *Lipid rafts* beschrieben, welche bei Endozytose, Signaltransduktion und vielen anderen Membranfunktionen wie Protein-Protein- oder Lipid-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen [77-79]. In diesen Domänen lassen sich membranständige Proteine nachweisen, die bereits im Golgi-Apparat gemeinsam mit anderen funktionell verwandten Membranproteinen verpackt werden [53, 80] und dann in die Plasmamembran eingebaut werden.

Auch viele membranständige Transportproteine der Niere sind mit *Lipid rafts* strukturell und funktionell assoziiert [53, 65, 68, 72, 73]. Welker et al. konnten zeigen, dass sich NKCC2 innerhalb der Plasmamembran in *Lipid rafts* befindet. NKCC2 hat eine relativ kurze Halbwertszeit in der apikalen Membran von ca. 1 Stunde [25, 45, 50, 69, 81]. In der immunhistochemischen Visualisierung befindet sich NKCC2 innerhalb der Plasmamembran hauptsächlich in den *Lipid rafts* [50, 81] konnte und mit den *Lipid raft*-Markern GM1 und THP ko-markiert werden [53, 72]. Die *Lipid rafts* spielen für die Regulation der Oberflächenexpression und damit für den Aktivitätszustand von NKCC2 eine wichtige Rolle, da die funktionellen Eigenschaften von NKCC2 unter anderem über die Oberflächenverteilung in der Plasmamembran reguliert werden. So wird NKCC2 nach Stimulation mit ADH vermehrt in die *Lipid raft*-Fraktionen eingebaut [53, 72], nach

Zerstörung der *Lipid rafts* durch Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) vermindert sich die Oberflächenexpression von aktiviertem, phosphoryliertem NKCC2 in der Plasmamembran deutlich [53, 72, 73]. Auch die Phosphorylierung von NKCC2 wird möglicherweise durch dessen Präsenz in *Lipid rafts* begünstigt. Hierbei könnten die mit NKCC2 in *Lipid rafts* ko-lokalisierten Proteine eine Rolle spielen. So wurde gezeigt, dass die genetische Depletion von THP in Mäusen zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivität von NKCC2 führt [46].

Ebenso konnte vor kurzem gezeigt werden, dass Annexin A2 mit NKCC2 in *Lipid rafts* ko-lokalisiert ist und dessen anterogrades Trafficking stimuliert [68]. Dabei interagiert Annexin A2 mit dem N-Terminus von NKCC2, wobei diese Interaktion von den Phosphorylierungszuständen beider Proteine abhängig ist [68]. Der C-Terminus von NKCC2 scheint für die konstitutive apikale Sortierung des Transporters verantwortlich zu sein, während die regulierten Traffickingvorgänge eher von den N-terminalen, phosphorylierungsabhängigen Interaktionen des Transporters mit Annexin A2 abhängig sind.

4.4.3 Clathrin-vermittelte Endozytose

Clathrin kann in allen eukaryontischen Zellen gefunden werden und ist an der strukturellen Beschaffenheit von Membranen und am zellulären Transport von Proteinen beteiligt. Bei der Endozytose von NKCC2 bilden sich mit Clathrin besetzte Vesikel, die sogenannten *Clathrin-coated pits*, die von der Zellmembran abgeschnürt werden und NKCC2 enthalten [50, 65].

Das Clathrin-Molekül hat die Form einer Triskele und beinhaltet ein Konstrukt aus drei schweren Ketten, welche je eine leichte Kette von ungefähr 35000 Dalton bindet [82]. Die Verbindung der drei schweren Ketten erfolgt an deren C-terminalen Enden. Die N-terminalen Enden dieser Dreierstruktur sind Bindungsstellen für vielfältige Adaptermoleküle [83]. Die hexagonale Struktur eines Clathrinkäfigs kommt durch den Zusammenschluss von 36 Triskelen zustande und hat einen Durchmesser von 50 bis 100 nm [82].

Ein endozytotisches Vesikel enthält jedoch nicht nur Clathrin. Hinzu kommen akzessorische Proteine wie die Adapterproteinkomplexe (AP) AP1-4, AP180 und Epsin, welche die Bindung der Clathrinmoleküle an die Zellmembran sowie die Interaktionen der *Clathrin-coated pits* mit den zu internalisierenden Molekülen vermitteln [84]. AP2 z.B. ist an der Bindung von Clathrinvesikeln an die Membran beteiligt, indem es sowohl

an die schweren Ketten des Clathrins als auch an Membranlipide und Membranproteine bindet und damit eine Fusion erleichtert. Dynamin ist ein weiterer Bestandteil dieses Funktionskomplexes. Es gehört zur Superfamilie der Multi-Domänen-GTPasen und ist für die Abspaltung des Vesikels von der Plasmamembran verantwortlich [84, 85].

In der Niere ist Clathrin ubiquitär verteilt. Besonders intensiv konnte es in den Fußfortsätzen der Podozyten im Glomerulum, entlang der gesamten Plasmamembran im proximalen Tubulus sowie in der apikalen Membran des distalen Tubulus und des Sammelrohrs nachgewiesen werden [86]. Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist der am besten charakterisierte Weg der Wiederaufnahme von Membranproteinen. Für diesen konnte bereits ein Zusammenhang mit einigen apikalen Transportern der Niere wie NHE3 oder dem epithelialen Na^{2+} -Kanal (ENaC) gezeigt werden [65].

Aufgrund der vorangegangenen Arbeiten kann man davon ausgehen, dass auch die Internalisierung von NKCC2 unter anderem über Clathrin und Dynamin vermittelt wird [25, 50, 65], denn eine Blockade der Clathrin-/Caveolin-vermittelten Endozytose mittels M β CD oder Chlorpromazin erhöhte die Oberflächenexpression von NKCC2 [65].

4.4.4 VPS10p-Rezeptoren/Sortiline

In den letzten Jahren wurden die VPS10p-Rezeptoren (*Vacuolar protein sorting*) als essentielle Komponenten der zellulären Trafficking-Maschinerie anerkannt. Zu der VPS10p-Rezeptorfamilie zählen fünf Mitglieder, SORLA (*Sorting protein-related receptor with type A repeats*), Sortilin, SorCS1, SorCS2 und SorCS3 (*Sortilin-related receptors of central nervous system*). Funktionell sind diese Rezeptoren am besten im zentralen Nervensystem charakterisiert, wo sie eine bedeutende Rolle für das *Turnover* (Halbwertszeit) des β -Amyloidprecursors spielen und somit in die Pathogenese des Morbus Alzheimer involviert sind [87]. Ein gemeinsames Merkmal aller Mitglieder ist eine VPS10p-Domäne an ihrem N-Terminus.

In der Niere konnte eine substantielle Expression von SORLA und Sortilin nachgewiesen werden [59]. Sortilin und SORLA sind strukturell sehr ähnliche Proteine. Beide enthalten eine große nach extrazellulär bzw. luminal ragende Domäne mit einem N-terminalen Propeptid, eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen C-Terminus aus 40-80 Aminosäuren [87]. Dieser beinhaltet typische Motive für die Interaktion mit zytoplasmatischen Adapterproteinen [87]. Der N-Terminus dient als Bindungsstelle für verschiedene Liganden im Rahmen des zellulären Trafficking und

beeinflusst dadurch die Oberflächenexpression von membranständigen Proteinen [57, 59, 88]. Bei Sortilin besteht der N-Terminus ausschließlich aus der VPS10p-Domäne wohingegen SORLA noch weitere Module am N-Terminus aufweist [87].

Die Charakterisierung von *SORLA-Knockout* Mäusen gab Hinweise darauf, dass SORLA mit der zellulären Verteilung und Funktion von in die Phosphoregulation von NKCC2 involvierten Enzymen interferiert [59]. Eine genetische Deletion von SORLA war mit einer beinahe vollständigen Abwesenheit der phosphorylierten NKCC2-Form und einer veränderten zellulären Verteilung der NKCC2-aktivierenden SPAK-Kinase assoziiert [59]. Die Oberflächenexpression von NKCC2 sowie vom strukturell verwandten NCC war allerdings durch die SORLA-Depletion nicht beeinflusst. Die renale Rolle von Sortilin wurde noch nicht hinreichend beleuchtet. Publierte Daten weisen allerdings auf seine potenzielle Beteiligung am intrazellulären Trafficking von CCC hin [57, 88]. Die Arbeitsgruppen um Zhou et al. und Ellison et al. konnten nachweisen, dass Sortilin bei der Degradation des NCC-Transporters eine Rolle spielt. Die Komplexbildung von Sortilin mit NCC stellt hierbei ein Signal für die Degradation von NCC-tragenden frühen Endosomen dar [57, 88] (Abb. 7), wobei die Bindung von NCC an Sortilin durch WNK4 vermittelt wird [57]. Der NKCC2 ist dem NCC-Ionen-transporter strukturell sehr ähnlich, die Rolle der Sortiline für das zelluläre Trafficking von NKCC2 im TAL ist jedoch bislang unbekannt. Diese soll daher im Rahmen dieser Arbeit näher charakterisiert werden.

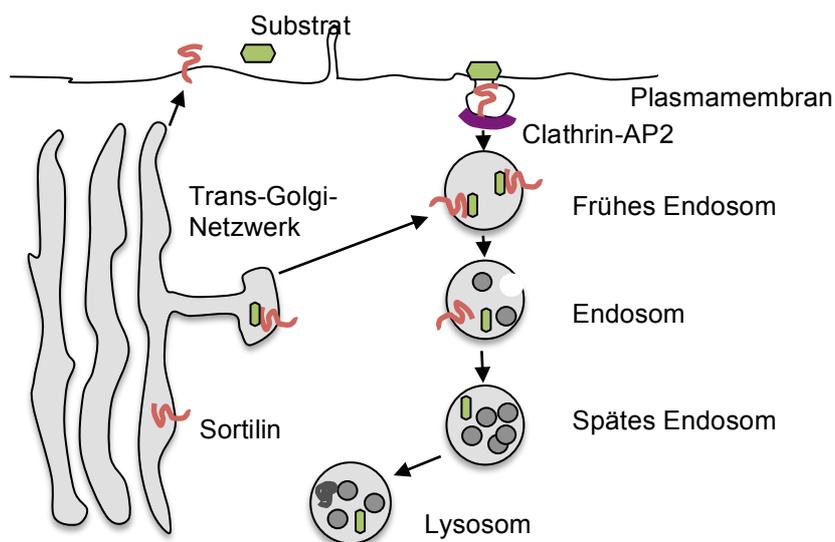


Abb. 7: Schema des lysosomalen Abbauweges von membranständigen Proteinen. Synthese von Sortilin im Trans-Golgi-Netzwerk. Sortilin (braun) wird in die apikalen Bereiche der Zelle transportiert und dann in die Wand eines sich bildenden Vesikels eingebaut. Ebenfalls zu erkennen ist wie ein Protein (grün) durch die Bildung eines Vesikels unter Beteiligung eines Clathrin-AP2-Komplexes (violett) von der

Zellmembran abgeschnürt und in ein frühes Endosom aufgenommen wird. Durch die Markierung des frühen Endosoms mit Sortilin wird das Endosom für den lysosomalen Abbau markiert. Sortilin wird zur weiteren Verwertung wieder zurück in das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert.

4.5 Endokrine Regulation von NKCC2

Die NKCC2-Aktivität wird durch Calcitonin, Glukagon und durch Prostaglandine reguliert. [11, 89] (Abb. 8). Unter diesen zahlreichen endokrinen und parakrinen Stimuli spielt ADH in der Regulation von NKCC2 eine besonders wichtige Rolle [43, 51, 58, 61, 90].

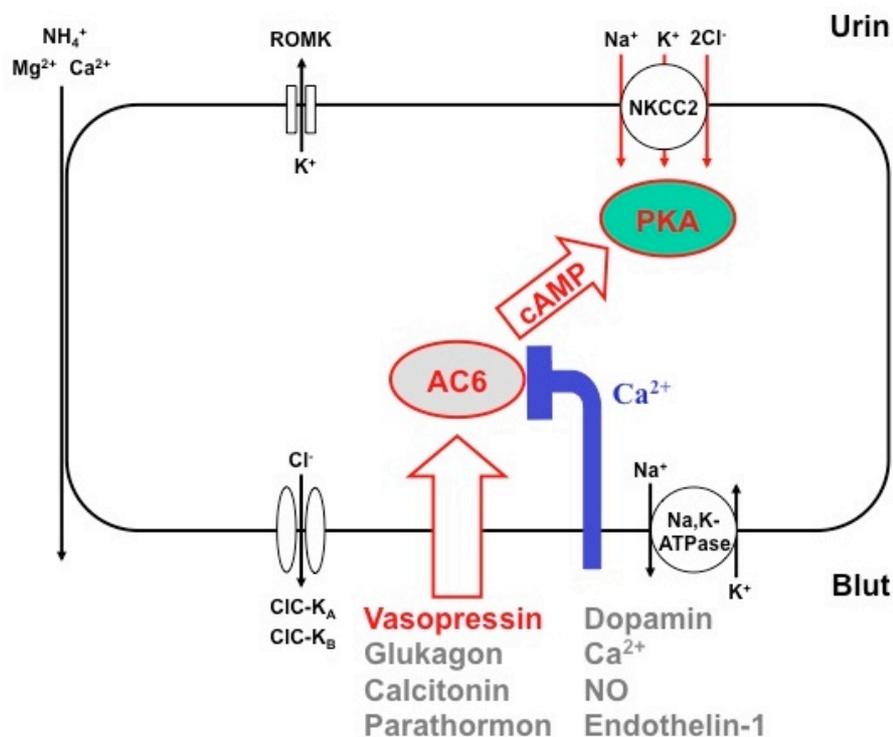


Abb. 8: Vereinfachte Darstellung der endokrinen Stimulation von NKCC2. Die NKCC2 Aktivität wird durch zahlreiche endokrine und parakrine Faktoren sowie durch das vegetative Nervensystem beeinflusst. ADH, Parathormon, Glucagon, Calcitonin und Adrenalin wirken hierbei stimulierend auf den Ionentransport, während Prostaglandine, Dopamin, Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 hingegen hemmend auf die Transportrate wirken.

ADH ist ein Peptidhormon, welches im Hypothalamus gebildet und im Hypophysenhinterlappen gespeichert wird. Im Rahmen der Volumenregulation gibt es zweierlei Stimuli für die Freisetzung von ADH. Zum einen befinden sich im Hypothalamus Osmorezeptoren welche bei Änderung der osmotischen Verhältnisse im Körper die Freisetzung von ADH aus der Hypophyse veranlassen. Die zweite Möglichkeit stellen venöse Volumenrezeptoren im rechten Vorhof des Herzens dar.

Diese registrieren einen intravasalen Volumenmangel und veranlassen daraufhin über eine β -adrenerge Stimulation die Ausschüttung von ADH aus der Hypophyse. Im TAL aktiviert ADH den V2-Rezeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-Komplex und bewirkt über eine cAMP-Freisetzung und PKA-Aktivierung einen vermehrten Einbau von NKCC2 aus zytoplasmatischen Vesikeln in die Plasmamembran [25, 52, 91]. Diese Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran wird durch die Familie der SNARE-Proteine vermittelt. Diejenigen SNARE-Proteine, die in den Vesikeln zu finden sind werden als VAMP bezeichnet und interagieren mit Proteinen in der Zielmembran, den SNAP-Proteinen (*Synaptosome-associated proteins*). Ortiz et al. konnten im TAL VAMP Typ 2 und 3 nachweisen. Diese zwei Untertypen scheinen in den durch cAMP stimulierten Einbau von NKCC2 in die Plasmamembran involviert zu sein [69]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass NKCC2 als Effektor der ADH/cAMP-Kaskade verstärkt in die *Lipid raft*-Fraktionen der Membran mit Hilfe von Annexin A2 eingebaut und anschließend phosphoryliert wird [53, 68]. Die ADH-abhängige Phosphorylierung steht demnach in funktionellem Zusammenhang mit dem Aktivitätszustand von NKCC2, indem es zu einer gesteigerten NKCC2-Transportaktivität führt und die Harnkonzentrierung potenziert [47, 92, 93].

5 Material und Methoden

5.1 Tierexperimentelle Arbeiten

5.1.1 Versuchstierhaltung und Behandlung

Die Grundsätze der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis sind in dieser Arbeit eingehalten worden. Nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes wurden Tierversuche nach Genehmigung des LAGESO Berlin durchgeführt. Die Versuchstiere wurden mit freiem Zugang zu Wasser und einer Standarddiät in geschlossenen klimatisierten Räumen mit einem 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. In allen Tierexperimenten wurden ausschließlich männliche, adulte Tiere im Alter von 10-14 Wochen verwendet. Alle Tierversuche wurden mit einer Mindestanzahl von N=4 durchgeführt.

5.1.2 Brattleboro-Ratten

Brattleboro-Ratten können durch eine spontane Mutation im Vasopressin kein ADH sezernieren und somit ihren Urin nicht konzentrieren. Dadurch produzieren sie bis zu 200ml/d Urin verglichen mit ca 15-20 ml/d bei als die Wildtyp-Ratten [94]. Durch diese Eigenschaft werden Brattleboro-Ratten als ein weit verbreitetes Tiermodell zur Untersuchung des zentralen Diabetes insipidus verwendet. Durch das Vasopressin V2-Rezeptor-Analogon dDAVP kann der intakte periphere Signaltransduktionsapparat stimuliert werden [95]. Aufgrund der Aktivierung der renalen V2-Rezeptor Signalkaskade wird die apikale Translokation von NKCC2 reguliert [63].

Die Brattleboro-Ratten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, stammen aus der lokalen Zucht (Institut für Vegetative Anatomie, Charité, Universitätsmedizin Berlin) und wurden in der Versuchstiereinrichtung der Charité (FEM) unter Standardbedingungen gehalten. Zur Induktion des kurzzeitigen (30 min) NKCC2-Transports wurde den Tieren dDAVP (10^{-7} M in *Renal Epithelial Growth Cell Medium/Promocell*) intraperitoneal injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt stattdessen 0,9% Kochsalzlösung (Vehikel). 30 min nach der Applikation wurden die Tiere beider Gruppen getötet und es erfolgte eine Perfusion über die *Aorta abdominalis* zur Fixierung der Nieren für immunhistologische Untersuchungen.

5.1.3 Sortilin Knockout-Mäuse

Die Sortilin-Knockout-Mäuse erhielten wir aus dem Labor von Prof. Thomas Willnow, Max-Delbrück-Centrum Berlin. Die weitere Aufzucht erfolgte in den Tierställen der Charité.

5.1.4 Gewebeverarbeitung und Gewebepreparation

5.1.4.1 Perfusionsfixierung und Gewebeaufbereitung zur Immunhistochemie

Zur morphologischen Untersuchung der Nieren erfolgte bei Tieren jeder Gruppe (N=6 pro Gruppe) eine Perfusionsfixierung. Dazu wurden die Tiere zunächst mittels Isofluran vornarkotisiert. Als Hauptanästhetikum wurde Nembutal (0,06 mg/g Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Der Bauchraum wurde eröffnet, die *Aorta abdominalis* freipräpariert, abgeklemmt und distal der Abgänge der *Arteriae renales* eröffnet. Anschließend wurde ein ausgezogener Polyethylenschlauch retrograd in das Gefäß eingeführt, mit einem Faden fixiert und mit dem Perfusionssystem verbunden. Nach Freigabe des Blutflusses durch das Lösen der proximalen Klemme und das Eröffnen der *Vena cava inferior* zum Druckausgleich erfolgte die Perfusion der Nieren retrograd über die *Aorta abdominalis*. Zur Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem des Tieres wurde für 30 sec eine Vorspüllösung (300 mosmol Sucrose/PBS) eingeleitet. Anschließend erfolgte die eigentliche Fixierung mittels 5 min Perfusion mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in PBS. Die Perfusionsfixierung wurde von PD Dr. Kerim Mutig durchgeführt.

5.1.4.2 Entnahme von Nierengewebe

Zur Entnahme der Nieren wurden die Ratten in einer Glasglocke mit Äther vornarkotisiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Bauchraum der Tiere entlang der *Linea alba* eröffnet. Nach Freipräparation der Nieren wurden diese entnommen, geschnitten und die medullären getrennt von den kortikalen Anteilen unter Eiskühlung präpariert.

5.1.4.3 Herstellung von Kryostatschnitten

Perfusionsfixierte Nieren wurden für die Herstellung von Cryogewebe zum Gefrierschutz über Nacht bei 4°C in einer 800 mosmol Sukroselösung/PBS eingelegt oder für die Herstellung von Paraffingewebe über Nacht in 300 mosmol Sukrose/PBS/0,02% Natriumacid bei 4°C nachfixiert. Cryogewebe wurde am Folgetag mit 2-Methylbutan schockgefroren, auf Styroporplättchen fixiert und bei -80°C gelagert.

Das Gewebe wurde für die Paraffineinbettung in 0,02% Natriumazid/PBS bis zur Einbettung gelagert.

Unfixiertes Gewebe kann durch Einfrieren gehärtet und damit schneidbar gemacht werden. Das Cryogewebe wurde mit Sukrose auf der Halterung unseres LEICA CM3050S-Geräts fixiert und mit einem Gefriermikrotom wurden 7 µm dünne Gefrierschnitte angefertigt, auf vorbeschichteten Objektträgern fixiert und bei -20°C gelagert.

5.1.4.4 *Herstellung von Paraffinschnitten*

Die Paraffineinbettung des Gewebes erfolgte automatisiert durch die Kinderpathologie der Charité Berlin (CCM). Das Paraffingewebe wurde dafür vor dem Schneiden für mindestens zwei Stunden bei -20°C gelagert. Zum Anfertigen von Paraffinschnitten wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Dieses besteht aus einer Haltevorrichtung, in die das Paraffin-Blöckchen eingespannt wird, einem Messer und einer Mechanik zur Steuerung der Schnittdicke. Der Block wird bis unmittelbar unter die Schnittebene des ebenfalls fest eingeschraubten Messers gebracht. Danach beginnt man die gewünschten Schnitte von 4 bis 7 Mm Dicke zu schneiden. Der Schnitt schiebt sich dabei auf das Messer. Von dort wird er mit einem angefeuchteten Pinsel abgehoben und in ein Warmwasserbad übertragen. Hierdurch wird der Schnitt gestreckt und von Falten befreit. Dann werden die Schnitte auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen. Die Objektträger werden in Küvetten sortiert und bis zum Färben in einem 37°C warmen Brutschrank zum Trocknen und zur besseren Haftung aufbewahrt.

5.1.4.5 *Herstellung von Ultrakryostat-Schnitten*

Perfusionsfixierte Nieren wurden in Blöcke mit einer Kantenlänge von 1mm geschnitten und in 2,3 molarer Sucroslösung, welche als Gefrierschutz fungiert, über Nacht inkubiert. Der Gewebblock wurde auf einem Aluminiumpin fixiert und die überschüssige Sucroslösung mit einem Filterpapier entfernt. Das Präparat wurde dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und hierauf in der Cryoultra-Kammer (LEICA EMFCS) eines Ultramikrotoms (Reichert Ultracut S) fixiert, welches auf -80°C abgekühlt wurde. Hierin wurden zuerst die Kanten der Gewebelöcke getrimmt und hierauf Schnitte mithilfe eines Glasmessers angefertigt. Dies geschieht bei -80°C bis -120°C. Mithilfe einer *Pick-up*-Lösung (2,3molare Sucrose, 2% Methylcellulose, beides in gleichen Teilen) werden die Schnitte aufgefangen und auf die beschichtete Seite eines Grids aufgebracht. Es ist darauf zu achten, dass diese von nun an nicht trocknen

dürfen. Das Grid wurde nun 3x 5 min in PBS gewaschen und für 30 min wurden in 5% Milch/PBS die unspezifischen Bindungen geblockt. Anschließend folgte die Inkubation in Mikrotiterplatten mit Primärantikörper/Milch über Nacht bei 4°C.

Danach wuschen wir 3x 5 min mit PBS und inkubierten die Grids 60 min bei RT mit goldmarkierten Antikörpern. Es folgten nochmal drei Waschschritte mit PBS, daraufhin eine Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd für 5 min, ein Waschschritt mit Aqua dest und die Kontrastierung in einer 4% Uranylacetat-Lösung (4°C, 4 min). Zuletzt wurde überschüssige Flüssigkeit mit einem Filterpapier vom Grid entfernt und schließlich bis zur elektronenmikroskopischen Auswertung in einer dafür vorgesehen Box gelagert.

5.1.4.6 Konventionelle Epon-Einbettung

Für Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte wurden Gewebeproben in Epon 812 eingebettet. Das Gewebe wurde nach der Perfusion in 1,5% PFA/Pikrinsäure in 0,1M Na-Kakodylatpuffer mit Sucrose (angepasste Osmolarität 300 mOsmol) über Nacht nachfixiert. Die Gewebeschnitte wurden in PBS gewaschen und zu ca. 2x1 mm großen Gewebelöcke zugeschnitten, die anschließend erneut in PBS gewaschen und daraufhin osmiert wurden (1% Osmiumtetroxid, 0,08% Kaliumhexacyanoferrat, 0,1M Natrium-Kakodylatpuffer bzw. Phosphatpuffer) wurden. Durch eine aufsteigende Ethanolreihe (30, 50, 80 und 96%) wurden die Proben entwässert. Die Gewebelöcke wurden dann jeweils 60 min in Propylenoxid/Epon im Verhältnis 2:1, 1:1 und 1:2 inkubiert und über Nacht in reinem Epon belassen. Am nächsten Tag wurden sie mit frischem Epon eingeblockt und für 2 Tage bei 60°C im Wärmeschrank auspolymerisiert. Alternativ wurden Gewebelöcke mit 2% wässriger Osmiumtetroxidlösung für 2 h osmiert. Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte schließlich am Transmissions-Elektronenmikroskop (EM).

5.1.5 Gewebeaufbereitung für biochemische Analysen

5.1.5.1 Gewebeaufbereitung für Immunopräzipitation

Nach Aufnahme der Nierenmarkscheiben in Puffer erfolgte die Homogenisierung durch einen Ultraturrax-Mixer und Aufschluss der Zellen mittels eines Ultraschallhomogenisators. Zur Entfernung der Zellkerne und nicht lysierter Zellreste wurden diese bei 4°C und bei 800 G für 15 min zentrifugiert. Der hierbei entstandene Überstand entspricht dem Proteinlysat, das anschließend weiterverarbeitet wurde.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C und unter 5% CO₂ kultiviert (Tabelle 1). Alle Zellversuche wurden mit einer Mindestanzahl von N=4 unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Tab. 1: Auflistung aller verwendeten Zelllinien

Bezeichnung	Spezies	Zelltyp	Medium	Zusätze
rbTAL	Ratte	medullärer TAL	RECGM	1% Pen/Strep
TK188	Human	Fibroblasten	DMEM	10% fötales Kälberserum (FKS), 1% Pen/Strep
HEK293	Human	Embryonische Nierenzellen	Alpha-MEM	2mM L-Glutamin, 5%FKS

RECGM = Renal Epithelial Cell Growth Medium von Promo Cell

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle's Medium von PAN Biotech

MEM = Modified Eagle's Medium von PAN Biotech

5.2.2 Biochemische Aufbereitung der Zellkultur

Kultivierte Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und dann in 100µl Homogenisierungspuffer (250mM Sucrose, 10mM Triethanolamin, Complete Protease Inhibitor, Cocktail-Tablette Firma Roche) oder RIPA-Puffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1% Na-Desoxycholat, 2,5mM Natrium Pyrophosphat, 1 Tablette Complete) abgekratzt. Die Zellen wurden stets auf Eis gelagert; danach per Ultraschall aufgeschlossen und der Ansatz zentrifugiert (4°C, 15 min). Das erhaltene Proteinlysate wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

5.2.3 Spezifische Vorbehandlung der Zellkulturen

5.2.3.1 Stimulation mit Chlorpromazin oder Sphingomyelinase

Kultivierte TAL-Zellen wurden für 30 min mit Chlorpromazin (10µg/ml) in *Renal Epithelial Growth Cell Medium* (Promocell) bei 37°C inkubiert.

Um *Lipid rafts* durch Sphingomyelinasegabe zu zerstören, wurden kultivierte TAL-Zellen mit PBS gewaschen und für 1 h mit Sphingomyelinase (100 mU/ml; Sphingomyelinase, Fa. Sigma) in *Renal Epithelial Growth Cell Medium* (Promocell) bei 37°C inkubiert. Die kultivierten TAL-Zellen wurden nach Behandlung mit Chlorpromazin oder Sphingomyelinase mittels RipFlip-Methode weiterbehandelt.

5.3 Proteinanalytische Methoden

5.3.1 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper für Western Blot und immunhistochemische Analysen waren gut charakterisiert und hinsichtlich ihrer Spezifität validiert (Tab.2 und Tab.3). Die eingesetzte Konzentration von jedem Antikörper musste spezifisch für jeden Versuch ermittelt werden. Alle Versuche wurden mit einer Mindestanzahl von N>3 durchgeführt.

Tab. 2: Übersicht eingesetzter Primärantikörper

Antikörper	Wirt	Hersteller
Clathrin heavy chain	Maus	BD Transduction Laboratories
Sortilin-1	Maus	R&D Systems
Sortilin-1	Ziege	Laboreigene Herstellung
NKCC2 2.1	Meerschweinchen	C. Lytle – nicht kommerziell
NKCC2 T4	Maus	Laboreigene Herstellung
pNKCC2 pt2	Kaninchen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof Ellison, Portland, OH
Caveolin-1	Maus	Santa Cruz Biotechnology
Flotillin-1	Maus	BD Bioscience

Tab. 3: Übersicht eingesetzter Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller	Katalog-Nummer	Verdünnung
Cy ^l m2 donkey anti rabbit IgG	Jackson Research Laboratories	Immuno 730-225-159	1:300
Cy TM 3 donkey anti mouse IgG	Jackson Research Laboratories	Immuno 711-165-153	1:300
Cy TM 3 donkey anti goat IgG	Jackson Research Laboratories	Immuno 705-154-147	1:300
Cy TM 3 donkey anti guinea pig IgG	Jackson Research Laboratories	Immuno 706-165-148	1:300

5.3.2 Immunhistochemie

Die in Paraffin eingebetteten Nierengewebebeurproben wurden in Xylol entparaffiniert, dann durch eine absteigende Ethanolreihe (100% bis 70%) je 5 min rehydriert. Die Antigene wurden durch Kochen der Proben für 6 min in 1x Citratpuffer (7,56g Zitronensäure, 48,2g Natriumcitrat) demaskiert. Die Deckgläschen wurden in PBS gestellt um ein Austrocknen zu verhindern. Gefrierschnitte wurden 30 min in 0,5% Triton[®] X-100 in PBS inkubiert, um Lipide zu entfernen und dadurch die Antikörperbindung zu erleichtern.

Paraffin- und Gefrierschnitte wurden anschließend 30 min in Blockiermedium (5% Milchpulver/PBS) bei RT inkubiert, um unspezifische Antigene zu blockieren und somit Hintergrundsignale zu minimieren. Darauf folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper. Der Primärantikörper wurde in Blockiermedium verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (Cy2- oder Cy3-konjugiert), ebenfalls in Blockiermedium verdünnt, wurden für 1 h bei RT aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Blaufärbung der Zellkerne durch 10 min Inkubation mit 4,6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI). Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen. Die Schnitte bzw. Deckgläschen wurden mit PBS/Glycerin eingedeckelt. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierungen erfolgte mit dem Konfokalmikroskop Zeiss LSM 5 Exiter (Carl Zeiss MicroImaging GmbH).

5.3.3 Elektronenmikroskopie

5.3.3.1 Präparation von Plasmamembran Sheets mittels RipFlip-Methode

Die RipFlip-Methode dient dazu, Plasmamembranen bzw. deren Strukturen wie zum Beispiel endozytotische Vesikel elektronenmikroskopisch darzustellen. Als Objektträger dienten so genannte Netzträger oder Grids (2300G) aus Kupfer, welche einen Durchmesser von 2-3 mm und eine definierte Anzahl von Gitterlinien besitzen. Wie eng die Gitterlinien auf den Grids gestaltet sind, wird in einer *mesh*-Zahl (Maschen) angegeben, also den Gitterlinien pro *inch*. So kann die *mesh*-Zahl für die zu untersuchenden Objekte angepasst werden und dient zusätzlich der Orientierung. Die zu untersuchenden Zellen wurden in Zellkulturpetrischalen auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 70-90% gezüchtet. Die Grids werden 30 min in Poly-L-Lysin-Lösung mit der beschichteten Seite auf 40µl-Tropfen inkubiert und so ein Film erzeugt, an dem die Zellen später haften. Bis zur weiteren Verwendung werden die Grids bei RT

auf Filterpapier gelagert. Die Deckgläschen wurden aus den Petrischalen genommen und die darauf gewachsenen Zellen für 7-10 min mit 0,5% PFA/PBS vorfixiert. Zwischen allen Schritten wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht austrocknen und dementsprechend der Zeitraum zwischen Absaugen und Benetzen so kurz wie möglich gehalten wurde. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS. Plastik-Deckgläschen werden in 0,1% BSA/PBS gewaschen, hierauf die Grids gelegt und die Zell-Coverslips mit der bewachsenen Seite 15 min auf die Grids aufgebracht. Es folgt ein kurzes manuelles Andrücken und schließlich Abreißen des *Coverslips*, an denen nun die Grids kleben. Um die Grids nun vom *Coverslip* zu lösen, wurden diese in Hapes gelegt und darauf in 2% PFA/Hapes eingebracht und in dieser Lösung 20 min fixiert. Es folgte ein Waschschrift in PBS. Zur Immunogoldmarkierung der Zellen wurden Gold-markierten Antikörpern verschiedener Größen (5 nm, 6 nm, 10 nm) verwendet. Zur Blockierung unspezifischer Hintergrundsignale erfolgte erst eine Inkubation in 0,1% BSA/PBS (10 min) und dreimaliges Waschen in PBS. Die Primärantikörper wurden in einer validierten Konzentration auf die Grids aufgetragen und über Nacht bei 4°C oder 60 min bei RT inkubiert. Es folgte die Inkubation mit einem spezifischen Gold-markierten Sekundärantikörper für 30 min. Nach dreimaligem Waschen mit dH₂O wurden die Grids zur selektiven Kontrastierung für 1 min in 0,3% Tanninsäure/dH₂O gelegt zweimal 5min in dH₂O gewaschen. Folgend wurden die Grids 10 min in 2% Uranylacetat/dH₂O inkubiert. Jene wurden dann noch zweimal in dH₂O gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und bis zur elektronenmikroskopischen Untersuchung in dafür vorgesehenen Boxen gelagert.

5.3.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden der polyklonale NKCC2-Antikörper sowie die als Negativkontrolle fungierenden Immunglobuline gleichen Isotyps (rb IgG) (Dianova GmbH) unter Verwendung des *Dynabeads[®] Antibody Coupling Kits* (Invitrogen Dynal AS) kovalent an die *Dynabeads[®] M-270 Epoxy* gebunden. Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation wurde entweder frisch entnommene und in IP-Puffer homogenisierte äußere Medulla von Rattennieren (siehe 4.1.5.2) verwendet. Jeweils 1 ml Proteinlysat wurde zu den Antikörper-beladenen Beads gegeben und rotierend bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit IP-Puffer (250mM Sucrose, 10mM Triethanolamin (TEA), 1x Complete Proteaseinhibitor, 50ml Aqua dest) und NaCl in aufsteigender Konzentration (150, 300 und 450 mM) für je 5 min wurden

die am Antikörper gebundenen Immunkomplexe in jeweils 30 µl 4x Laemmli-Puffer (252mM Tris HCl, 40ml 40% Glycerin, 8% SDS, 40mg 0,04% Bromphenolblau, 20ml 20% β-Mercaptoethanol) eluiert. Zur weiteren Analyse wurden diese Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 4.3.5.1) und anschließend ein Immunblot durchgeführt (siehe 4.3.5.2).

5.3.5 SDS-PAGE und Western Blot

5.3.5.1 SDS-PAGE (Natrium-Dodecyl-Sulfat-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese)

Das Verfahren der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient dazu, die in den zu untersuchenden Proben enthaltenen Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierfür wurden standardmäßig 40µg Proteinlysate mit 4x Laemmli-Puffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung über 5 min auf 95°C erhitzt. Das in Laemmli-Puffer gelöste anionische Tensid SDS sorgt dafür, dass Wasserstoffbrückenbindungen sowie Sekundär- und Tertiärstrukturen in den Proteinen aufgebrochen werden. Zusätzlich erzeugt das SDS eine negative Ladung der Proteine. Durch die einheitliche Ladung werden die Proteine dann nur noch nach ihrer Größe aufgetrennt. Dieser Vorgang erfolgte in Polyacrylamidgel. 10% Trenngel (7ml Acrylamid, 7ml Gelpuffer, 2,5ml Glycerol, 4ml Aqua dest, 10µl Temed) wurde polymerisiert und ein 3,7% Sammelgel (1ml Acrylamid, 2ml Gelpuffer, 5ml Aqua dest, 10µl Bromphenolblau, 10µl Temed) hinzugegeben. Im Sammelgel befinden sich Taschen, in die dann die Proben hineinpipettiert wurden. Die elektrophoretische Trennung der Proteinproben in Elektrophoresepuffer (30g 0,25M Tris-Base, 144g 1,92M Glycin, pH 8,3, 1l Aqua dest) erfolgte zunächst bei 100V. Mit Eintritt der Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 115V für ca. 1,5 h bei RT erhöht. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *Precision Plus ProteinTM Dual Color Standard* (Bio-Rad Laboratories GmbH) eingesetzt.

5.3.5.2 Immunoblotting

Beim Immunoblotting werden die aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE vom Elektrophorese-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und so zur weiteren quantitativen Analyse mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht. Hierfür wurden nach dem *Semi-Dry*-Prinzip zwei Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran und das Elektrophoresegel in gekühltem Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,0375% SDS, 20% Methanol) getränkt und zwischen Kathode und Anode in der

Elektrophoresekammer gepackt. Der Blot-Vorgang erfolgte bei 90mA für 90 min. Zur Qualitätskontrolle des Blotting wurden die Nitrozellulosemembranen mit 0,5% Ponceau-Rot angefärbt und durch Aqua dest wieder entfärbt. Um einen unspezifischen Hintergrund durch Antikörperreaktionen zu minimieren, inkubierte man die Nitrozellulosemembran für 30 min in Blockiermedium (5% Milch/PBS). Um die aufgetrennten Proteine darzustellen, wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit Primärantikörper, in Blockiermedium gelöst, inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen in 5% Tween/PBS entfernt. Danach erfolgte die Inkubation mit an Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT und dreimaliges Waschen mit 5% Tween/PBS. Zur Visualisierung der immunreaktiven Banden wurde die Membran für 1 min mit Luminolreagenz (*AmershamTM ECLTM Western blotting detection reagents*, GE Healthcare) benetzt. Luminol wird durch die an die Sekundärantikörper gebundene Peroxidase oxidiert und durch Lichtemission in einen energetisch günstigeren Zustand versetzt. In dieser Zeit führte die Meerrettichperoxidase zu einer durch Wasserstoffperoxid induzierten Oxidation von Luminol. Autoradiographiefilme (FUJIFILM Super RX, Fujifilm Europe GmbH) wurden in der Dunkelkammer belichtet und entwickelt. Alle Proteine wurden auf β -Aktin normiert.

5.3.6 Expression von GST-Fusionsproteinen und GST-Pulldown

Für die Herstellung von rekombinanten N- und C-Terminus-Mutanten von NKCC2 wurden *E.coli*-Rosetta-Kulturen (Merck Millipore) mit Expressionsplasmiden transfiziert und in 500 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin gegeben. Die Proteinexpression wurde mit 0,2 mM Isopropyl-1-thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG) induziert. Nach einer 15-stündigen Inkubation bei RT wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4500 xG, 10 min) sedimentiert. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte in Lysepuffer (50mM Hepes, 200mM NaCl, 10mM CaCl₂, 1x Complete Proteaseinhibitor) für 1 h bei RT und anschließende Ultraschallbehandlung. Zellreste und unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (13.000 xG, 10 min, 4°C) entfernt.

Das durch die Zentrifugation entstandene Lysat wurde abpipetiert und weiterbehandelt. Das Pellet wurde verworfen. Für die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinant hergestellten Proteine wurde das Bakterienlysate mit 250 μ l Glutathion-beschichteten *Magnet Beads* (Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt. In einer 12-stündigen Inkubationszeit bei 4°C band dann die Glutathion-S-Transferase (GST) der Fusionsproteine (NKCC2 N- oder C-Terminus) aus dem Bakterienlysate an

das Glutathion auf den *Beads*. Anschließend wurden die *Beads* mit den gebundenen rekombinanten Proteinen dreimal mit Lysepuffer gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen.

Parallel zur Inkubation der Proteine mit den *Beads* wurden HEK239-Zellen in Zellkulturschalen gezüchtet. Nach 48h wurden die Zellen in eisgekühltem Lysepuffer mit 1% Triton X-100 versetzt und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das nach der Zentrifugation (1000 xG, 15 min) erhaltene postnukleäre Proteinlysate wurde auf die *Beads* mit an diesen gebundenen Fusionsproteinen gegeben und über Nacht bei 4°C drehend inkubiert. Nach Abnahme des Lysats wurden die *Beads* dreimal mit Lysepuffer gewaschen und die gebundenen Proteinkomplexe mit 4x Laemmli-Puffer eluiert. Anschließend wurden die Eluate mit Hilfe von SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert.

6 Ergebnisse

6.1 Topographische Verteilung von NKCC2 und phospho-NKCC2 in der apikalen Plasmamembran des TAL

Zur Evaluation der Fragestellung, ob die Phosphorylierung von NKCC2 dessen Oberflächenexpression und Verteilung in der apikalen Plasmamembran beeinflusst, wurde zunächst die Verteilung von NKCC2 und seiner phosphorylierten Form in der apikalen Membran von kultivierten TAL-Zellen mittels der RipFlip-Technik untersucht. Abbildung 9 demonstriert typische Membranfragmente, die mit Hilfe der RipFlip-Methode gewonnen und mittels Raster- bzw. Transmissions-Elektronenmikroskopie (EM) visualisiert wurden. Die Plasmamembran des TAL wies in der hochauflösenden EM Regionen mit verschiedenen Elektronendichte-Eigenschaften auf, welche sich als dunklere oder hellere Domänen verschiedener Größen darstellten (Abb. 9-12). Die elektronendichten Domänen innerhalb der Plasmamembran entsprechen wahrscheinlich den an Cholesterin und Glyko- und Sphingolipiden angereicherten *Lipid rafts*, während die helleren Regionen *Non-raft*-Regionen der Plasmamembran darstellen könnten. Dass es sich bei den in der EM dunkler erscheinenden Inseln um *Lipid rafts* handelt, konnte mittels Immunogoldmarkierungen durch die etablierten *Lipid raft*-Marker Flotillin-1 und THP verifiziert werden. Die entsprechenden Signale fanden sich ausschließlich in den elektronendichten Regionen der Plasmamembran (Abb. 10-12). Immunogoldmarkierung von NKCC2 bzw. phospho-NKCC2 zeigte, dass sowohl der Transporter also auch seine phosphorylierte Variante sich vorwiegend in dunkleren Domänen der Plasmamembran befinden (Abb. 11).

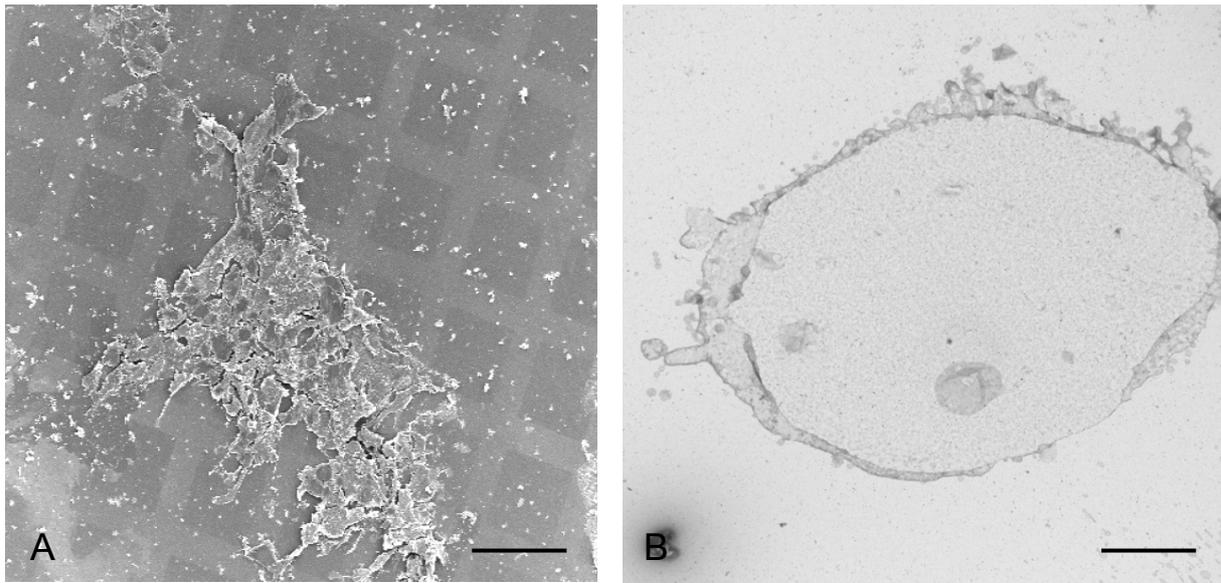


Abb. 9: Elektronenmikroskopische Darstellung von Plasmamembran-Fragmenten aus kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik. Übersichtsaufnahme eines nativen Membranfragments mittels Raster-EM (A). Übersichtsaufnahme eines nativen Membranfragments mittels Transmissions-EM (B). Der Maßstabsbalken entspricht 0,2 mm.

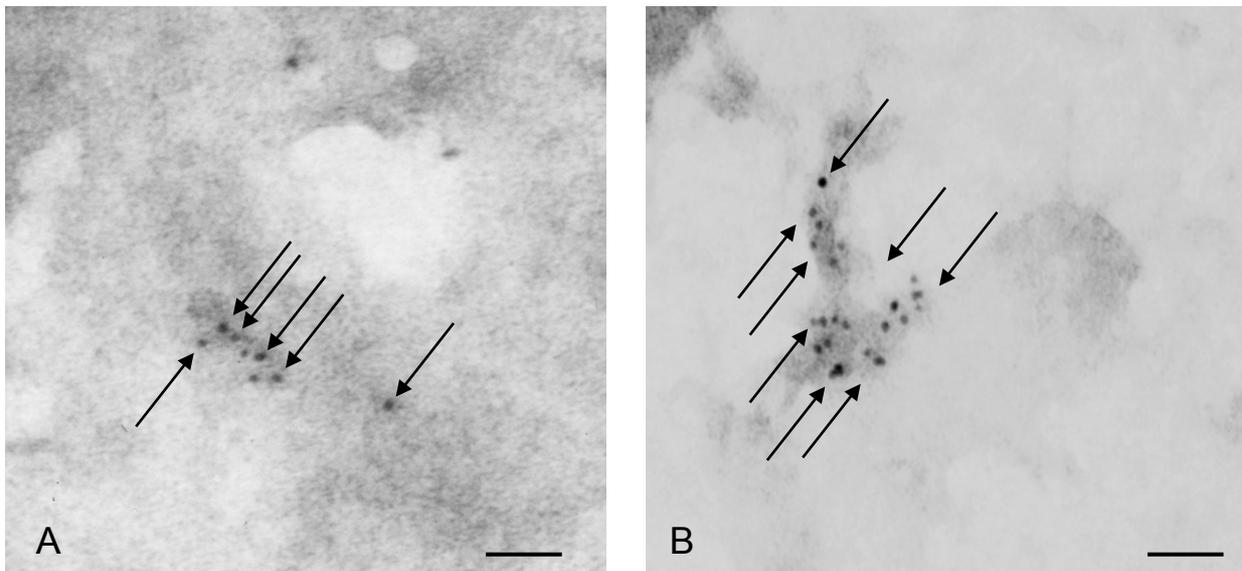


Abb. 10: Markierung von Lipid rafts durch die Lipid raft-Marker Flotillin-1 und THP mittels Immunogoldmarkierung in der apikalen Membran von kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Die Lipid raft-Marker Flotillin-1 (A, Pfeile, 6 nm) und THP (B, Pfeile, 6 nm) befinden sich hauptsächlich in den elektronendichten Regionen der apikalen Plasmamembran und definieren hier die Lipid raft-Domänen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

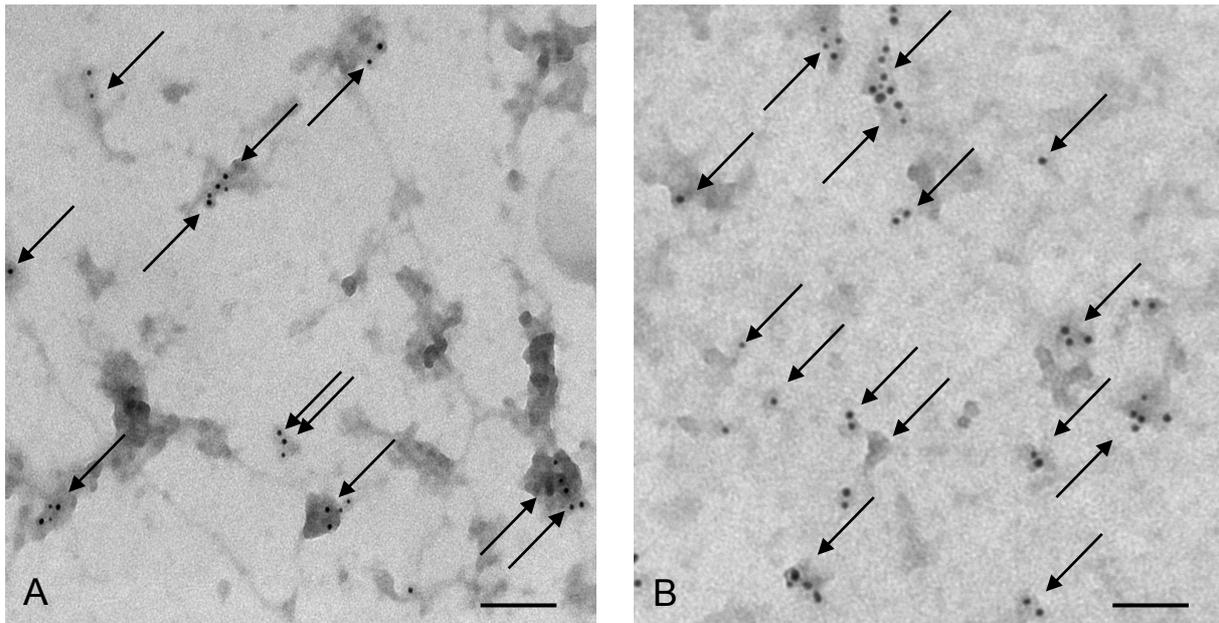


Abb. 11: Transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von NKCC2 und phospho-NKCC2 in der apikalen Plasmamembran von kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Das NKCC2-Signal (A, Pfeile, 5 nm) sowie das phospho-NKCC2-Signal (B, Pfeile, 5nm) befindet sich vorwiegend in den elektronendichten Domänen der apikalen Plasmamembran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

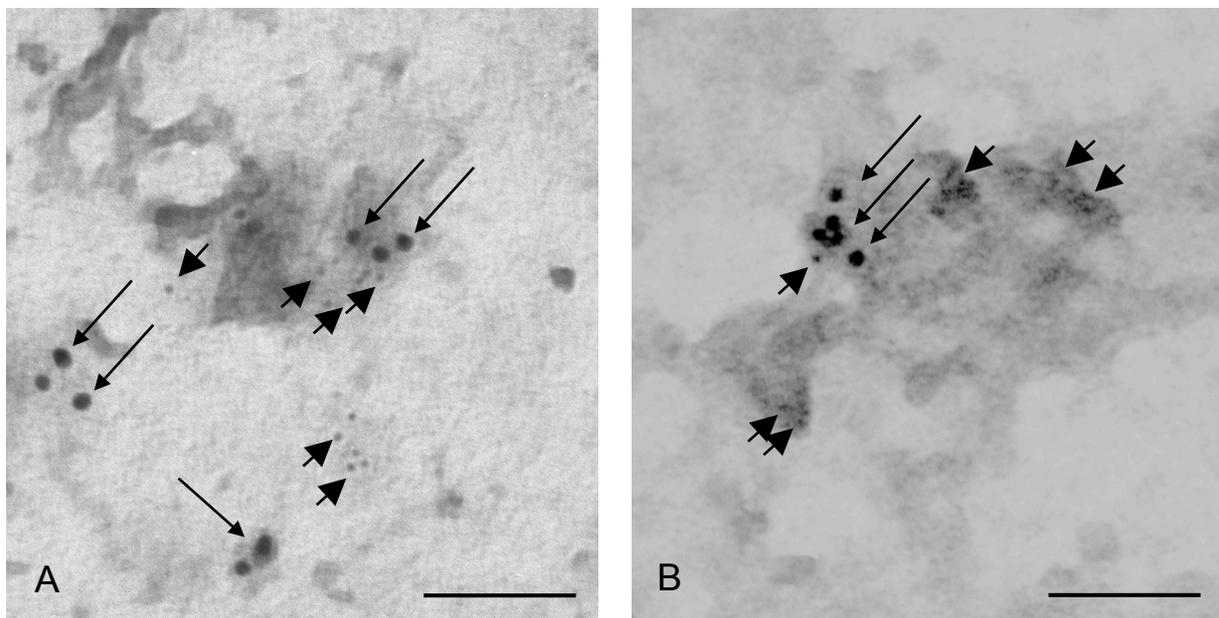


Abb. 12: Lokalisation von phospho-NKCC2 in den Lipid raft-Domänen der apikalen Plasmamembran in kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik und anschließender Immunogoldmarkierung. Immunogolddoppelmarkierung von phospho-NKCC2 (A, kurze Pfeile, 5 nm) und Flotillin-1 (A, lange Pfeile, 10 nm) sowie die Doppelmarkierung von phospho-NKCC2 (B, kurze Pfeile, 5 nm) und THP (B,

lange Pfeile, 10 nm) zeigten eine Ko-Lokalisation des Transporters mit den beiden *Lipid raft*-Markern. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

In den vorangegangenen Arbeiten aus unserem Institut konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung von *Lipid rafts* in kultivierten TAL-Zellen durch Statine oder Methyl- β -cyclodextrin das apikale Trafficking von NKCC2 inhibiert [53, 72]. Um die Relevanz der *Lipid rafts* für die Oberflächenexpression des phosphorylierten und somit aktivierten Transporters zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit die pharmakologische Zerstörung von *Lipid rafts* durch die kurzzeitige Applikation von Sphingomyelinase (30 min) im Zellkulturmedium durchgeführt. Dies führte zu einer substantziellen Verringerung der elektronendichten Domänen innerhalb der Plasmamembran von TAL-Zellen und einer signifikant verminderten Oberflächenexpression von phosphoryliertem NKCC2 (-58%, $p > 0,05$) (Abb. 13).

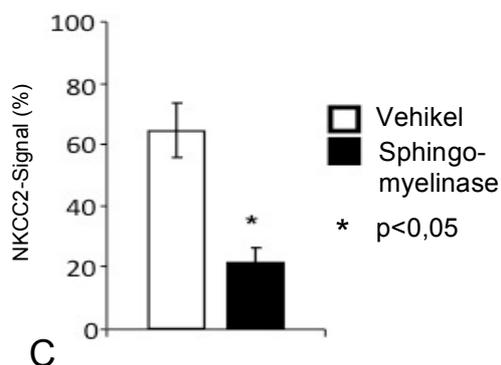
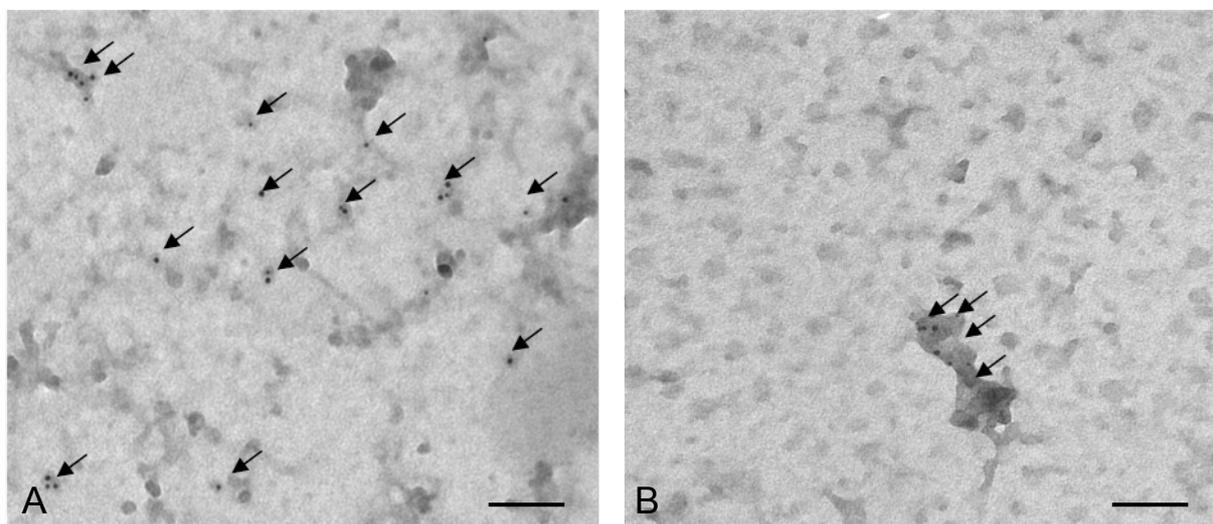


Abb. 13: Effekte der *Lipid raft*-Zerstörung mittels Sphingomyelinase auf die Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 in kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immungoldmarkierung und elektronenmikroskopischer Auswertung. Nach der Sphingomyelinase-Behandlung zeigte sich eine signifikante Verringerung der Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 (B, Pfeile, 5 nm) verglichen mit der Vehikel-Behandlung (A, Pfeile, 5 nm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Im Einklang mit den Daten aus unserer Arbeitsgruppe [53, 72] sprechen die hier dargestellten Ergebnisse dafür, dass *Lipid rafts* eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Oberflächenexpression von NKCC2 spielen. Da das phosphorylierte NKCC2 sich fast ausschließlich in *Lipid rafts* befindet, könnte die

Phosphorylierung eine Rolle bei der Verteilung des Transporters zwischen *Lipid rafts* und *Non-raft*-Membrandomänen spielen. Diese Hypothese erhielt zusätzlich unterstützende Evidenz in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit aus unserem Institut mit meiner Co-Autorenschaft: wir konnten zeigen, dass das apikale Trafficking und der Einschluß von NKCC2 in *Lipid rafts* von seiner Phosphorylierung abhängig sind [68]. Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungsstatus von NKCC2 und seiner Internalisierung näher beleuchtet.

6.2 Mechanismen der NKCC2-Internalisierung

Gegenwärtig werden verschiedene Mechanismen der NKCC2-Internalisierung diskutiert: die Caveolae-abhängige Endozytose, die Clathrin-vermittelte Endozytose sowie die Rolle von *Lipid rafts* bei der Internalisierung [50]. Um die für die NKCC2-Internalisierung relevanten Routen besser zu charakterisieren, wurde zunächst die renale Verteilung von Caveolin-1, einer zentralen Proteinkomponente der Caveolae, sowie von Clathrin als Korrelat des Clathrin-vermittelten Wegs in Bezug auf deren Ko-Lokalisation mit NKCC2 untersucht.

6.2.1 Caveolae-vermittelte Endozytose

Caveolin-1 wurde als Strukturprotein der Caveolae mit zellulären Trafficking-Vorgängen einschließlich der Internalisierung von membranständigen Proteinen in Verbindung gebracht. In vorangegangenen Arbeiten wurde eine potentielle Beteiligung der Caveolae-abhängigen Endozytose an der Regulation der Oberflächenexpression von NKCC2 diskutiert [50]. Die bisherigen Daten zur renalen Verteilung von Caveolin-1 waren jedoch nicht aufschlussreich und zum Teil kontrovers. Um festzustellen, ob der TAL eine signifikante Expression von Caveolin-1 aufweist, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die renale Verteilung von Caveolin-1 immunhistochemisch untersucht. Während Glomerulum, Sammelrohr, Gefäße und interstitielle Zellen eine reichliche Präsenz von Caveolin-1 aufwiesen, konnte im TAL kein signifikantes Caveolin-1-Signal nachgewiesen werden (Abb. 15). Im Einklang mit den immunhistochemischen Daten konnten Caveolae elektronenmikroskopisch im Sammelrohr, nicht aber im TAL visualisiert werden (Abb. 14).

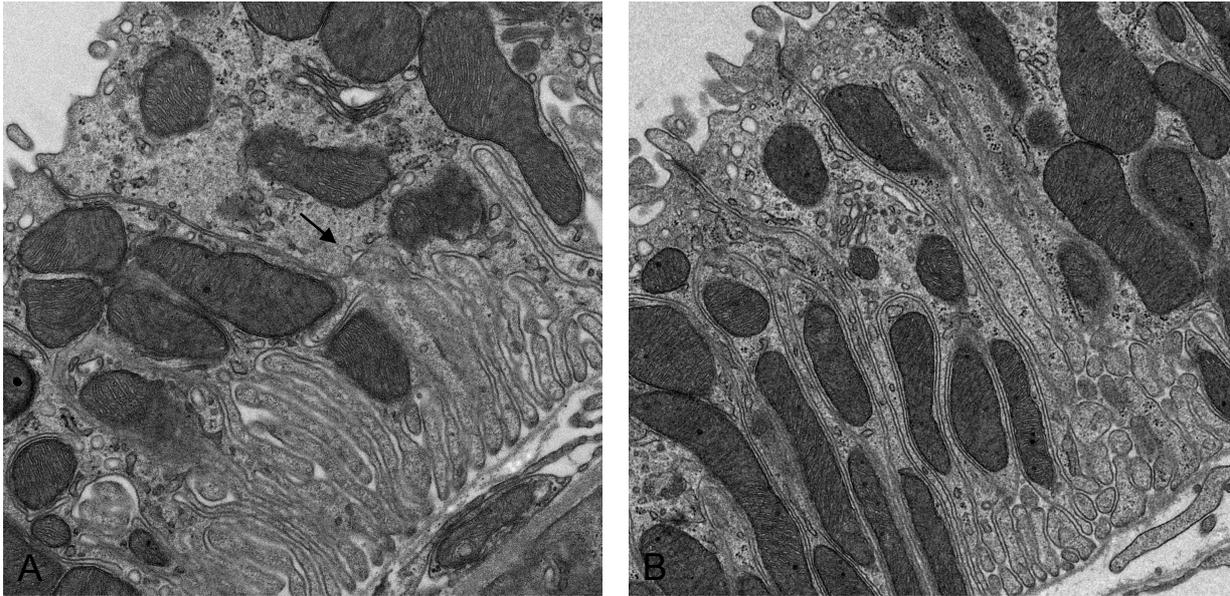


Abb. 14: Transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von Caveolae in Sammelrohr-Zellen und Abwesenheit von Caveolae in TAL-Zellen. Präparation von Rattennieren mittels EPON-Technik und elektronenmikroskopische Darstellung. Nachweis einer Caveola an der basolateralen Membran des Sammelrohrs (A, Pfeil), wohingegen im TAL weder luminal noch basolateral Caveolae nachweisbar sind (B).

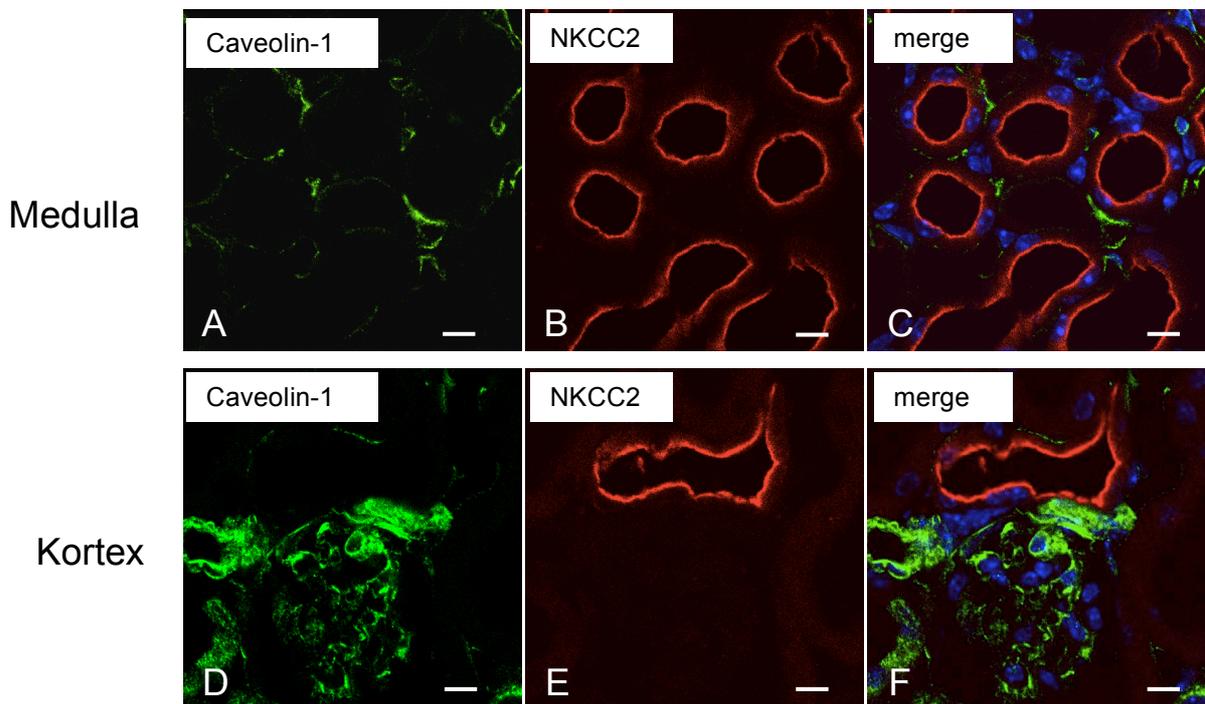


Abb. 15: Immunhistochemische Doppelmarkierung von Caveolin-1 und NKCC2 in der Rattenniere. (A-C) Doppelmarkierung von Caveolin-1 (grün) mit NKCC2 (rot) im äußeren Nierenmark der Rattenniere. Caveolin-1 wird im Interstitium und im Gefäßendothel, jedoch nicht im NKCC2-positiven TAL exprimiert (A-C). (D-F) Im Kortex der Rattenniere zeigt sich die Expression von Caveolin-1 im Glomerulum und Interstitium, jedoch nicht im TAL (D). Die Zellkerne wurden mit DAPI blau angefärbt (C, F). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Auch in kultivierten TAL-Zellen war Caveolin-1 nicht nachweisbar (Abb. 16, B), während kultivierte humane Fibroblasten im gleichen RipFlip-Experiment eine reichliche Oberflächenexpression von Caveolin-1 zeigten (Abb. 16, A).

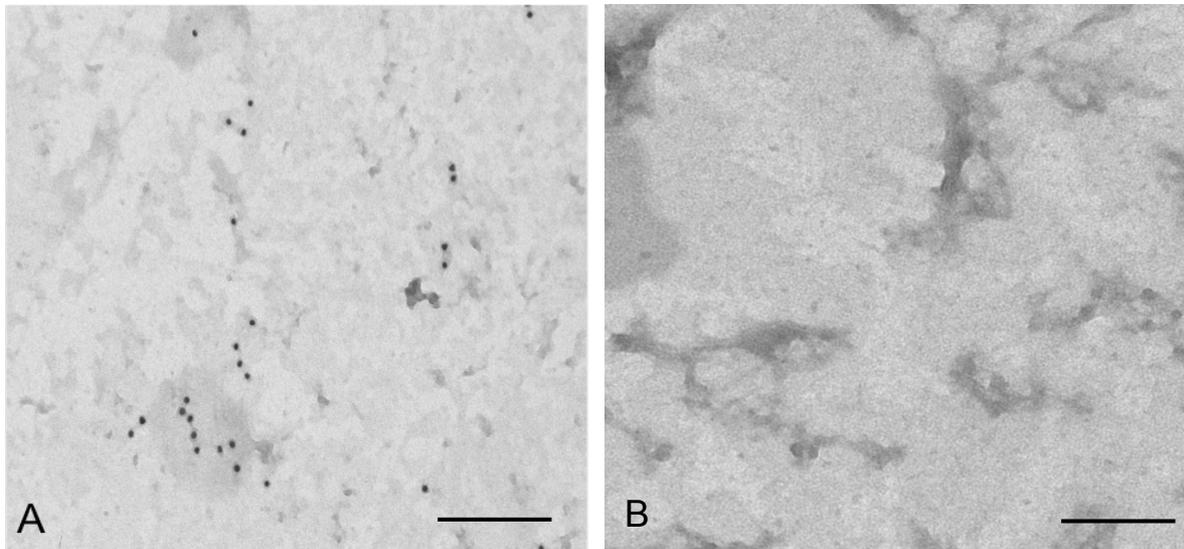


Abb. 16: Immunogoldmarkierung von Caveolin-1 in humanen Fibroblasten und fehlende Expression von Caveolin-1 in der apikalen Plasmamembran von kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten humanen Fibroblasten und TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. In humanen Fibroblasten konnte eine deutliche Expression von Caveolin-1 nachgewiesen werden (A, 10 nm), während in den kultivierten TAL-Zellen kein Nachweis von Caveolin-1 gelang (B). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Die Abwesenheit von Caveolin-1 und Caveolae im TAL konnte somit durch verschiedene Techniken sowohl *in vivo* als auch in der Zellkultur überzeugend demonstriert werden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Caveolae-vermittelte Endozytose bei der Internalisierung von NKCC2 keine Rolle spielt.

6.2.2 Clathrin-vermittelte Endozytose

Als nächstes wurde die renale Verteilung von Clathrin und dessen Ko-Lokalisation mit NKCC2 bzw. phospho-NKCC2 in TAL- und MD-Zellen der Rattenniere mittels Konfokalmikroskopie evaluiert. Clathrin zeigte eine ubiquitäre Expression entlang des Nephrons (Abb. 17). Doppelmarkierungen von Clathrin und NKCC2 demonstrierten deren partielle Ko-Lokalisation in apikalen Zellkompartiment von TAL- und MD-Zellen (Abb. 17). Im Gegensatz dazu war die Ko-Lokalisation von Clathrin und phospho-NKCC2 sowohl in TAL- als auch in MD-Zellen kaum nachweisbar (Abb. 17).

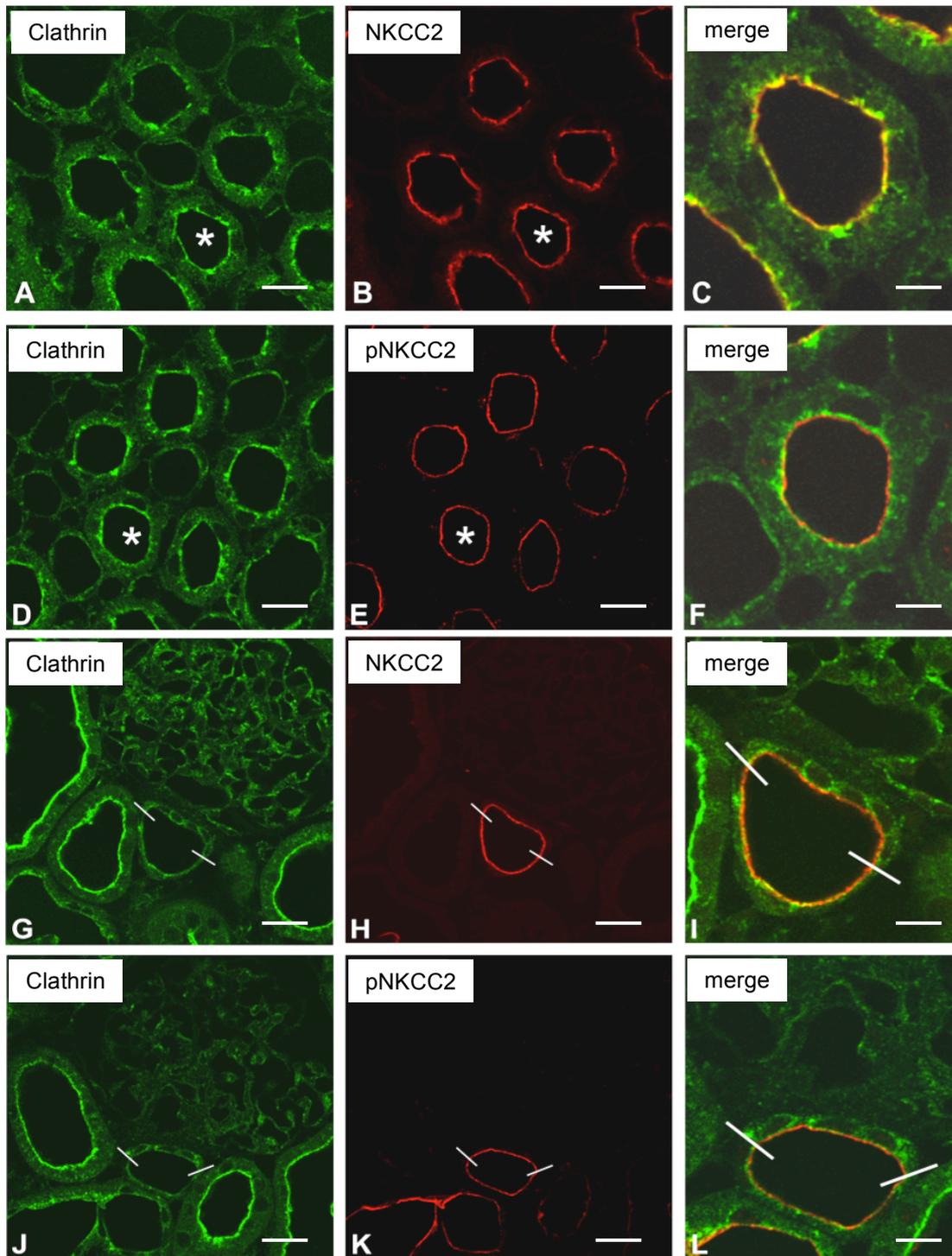


Abb. 17: Immunhistochemische Doppelmarkierung von Clathrin mit NKCC2 und phospho-NKCC2 in TAL und MD. (A-C) Die Doppelmarkierung von Clathrin (grün) und NKCC2 (rot) zeigt in der Fluoreszenzmikroskopie im medullären TAL eine substantielle Ko-Lokalisation von Clathrin mit NKCC2 (C). (D-F) Die Doppelmarkierung von Clathrin (grün) mit phospho-NKCC2 (rot) zeigt hingegen kaum Ko-Lokalisation (F). (G-L) Die Markierungen zeigen den kortikalen TAL mit den spezialisierten Zellen der MD (abgegrenzt durch Linien). (G-I) Die Doppelmarkierung von Clathrin (grün) und NKCC2 (rot) zeigt eine substantielle Ko-Lokalisation im TAL (I). In der MD zeigt sich im Vergleich eine geringere Expression von Clathrin und eine geringere Ko-Lokalisation mit NKCC2 (I). (J-L) Die Doppelmarkierung von Clathrin

(grün) mit phospho-NKCC2 (rot) zeigt eine deutlich geringere Ko-Lokalisation beider Signale sowohl in TAL als auch in der MD (abgegrenzt durch Linien). Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Die Ergebnisse der Konfokalmikroskopie konnten in kultivierten TAL-Zellen durch die RipFlip-Methode bestätigt werden. Bei der Einzelmarkierung mit einem Clathrin-Antikörper ließen sich *Clathrin-coated pits* in der apikalen Membran von TAL-Zellen darstellen (Abb. 18).

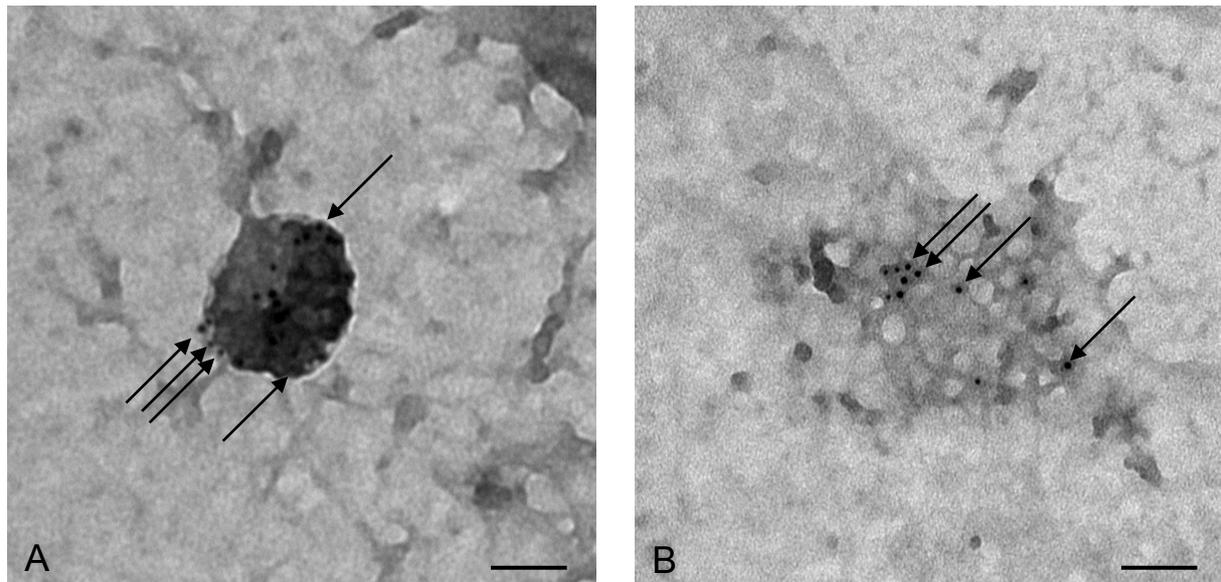


Abb. 18: Transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von *Clathrin-coated pits* mittels Immunogoldmarkierung von Clathrin in der apikalen Plasmamembran kultivierter TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Die Immunogoldmarkierung von Clathrin zeigt *Clathrin-coated pits* in verschiedenen Stadien der Ausbildung: eine Clathrin-positive Plattform der apikalen Membran (A, Pfeile, 10 nm) sowie eine vesikuläre Clathrin-positive Struktur (B, Pfeile, 10 nm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Immunogold-Doppelmarkierungen von NKCC2 und Clathrin in der apikalen Membran von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik demonstrierten eine moderate Ko-Lokalisation beider Signale, während eine Ko-Lokalisation von phospho-NKCC2 und Clathrin in einem parallelen Experiment kaum nachweisbar war (Abb. 19).

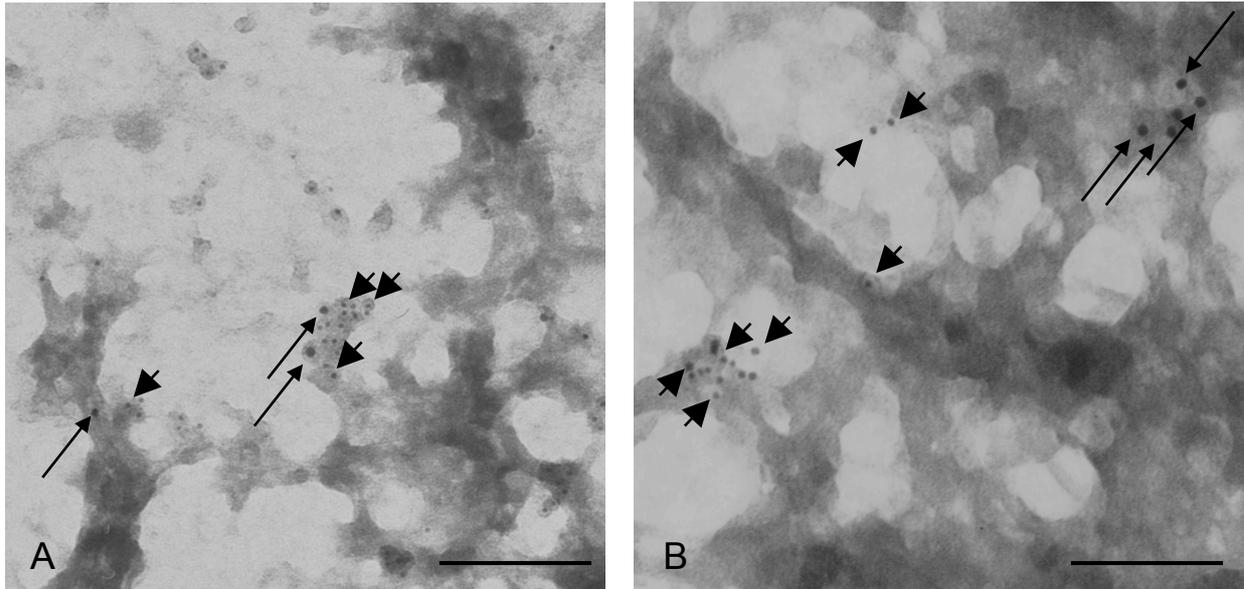


Abb. 19: Ko-Lokalisation von Clathrin mit NKCC2 und phospho-NKCC2 in der apikalen Plasmamembran kultivierter TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Die Doppelmarkierung von Clathrin (A, lange Pfeile) mit NKCC2 (A, kurze Pfeile, 5 nm) ergibt eine partielle Assoziation in der apikalen Plasmamembran in den elektronendichten Regionen. Die Doppelmarkierung von Clathrin (B, lange Pfeile, 10 nm) mit phospho-NKCC2 (B, kurze Pfeile, 6 nm) zeigt dagegen keine signifikante Ko-Lokalisation beider Signale. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

6.2.2.1 Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose

Um die funktionelle Bedeutung der Clathrin-abhängigen Endozytose bei der Regulation der NKCC2-Oberflächenexpression zu evaluieren, wurde eine akute Hemmung (30 min) der Clathrin-vermittelten Endozytose in kultivierten TAL-Zellen mittels Chlorpromazin-Behandlung durchgeführt [65]. Die Auswertung der Immunogoldsignale in der apikalen Plasmamembran zeigte eine starke Verringerung von Clathrin-positiven vesikulären Strukturen in den mit Chlorpromazin behandelten Zellen verglichen mit der Vehikel-Kontrolle – ein Hinweis darauf, dass die Ausbildung der *Clathrin-coated pits* durch die Behandlung erfolgreich gehemmt werden konnte (Abb. 20). Die Oberflächenexpression von NKCC2 stieg nach der Chlorpromazin-Behandlung signifikant an (+130%, $p < 0,05$) (Abb. 21), während die Phosphorylierung von NKCC2 sich signifikant reduzierte (-112%, $p < 0,05$) (Abb. 22).

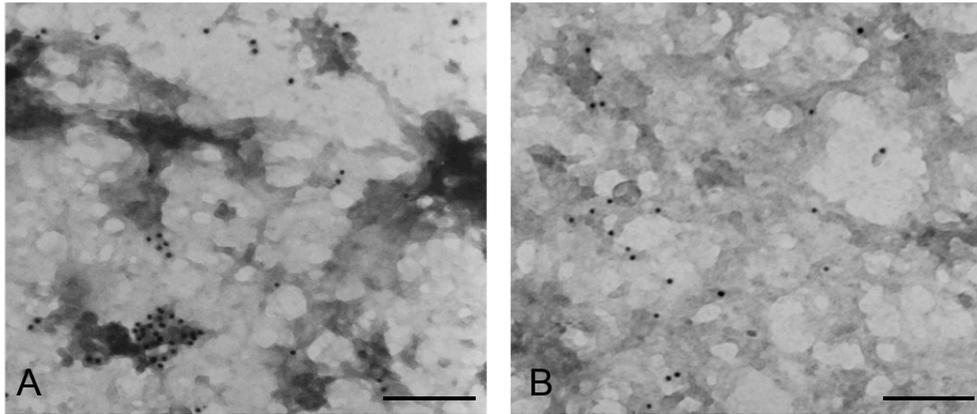


Abb. 20: Verteilung von Clathrin in der Plasmamembran nach Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose mittels Chlorpromazin in kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Mit Vehikel behandelte Zellen zeigen eine Konzentrierung des Clathrin-Signals in elektronendichten Regionen der Plasmamembran entsprechend den sich ausbildenden *Clathrin-coated pits* (A). Nach Behandlung mit Chlorpromazin zeigt Clathrin eine diffuse Verteilung (B). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

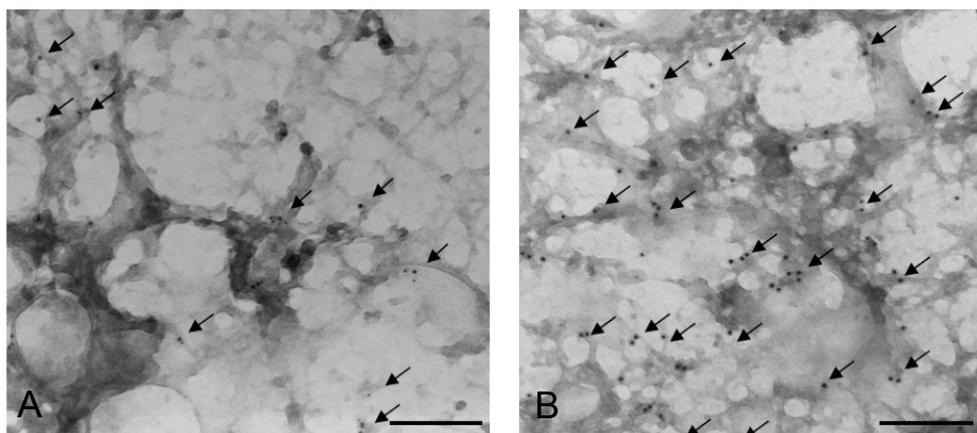
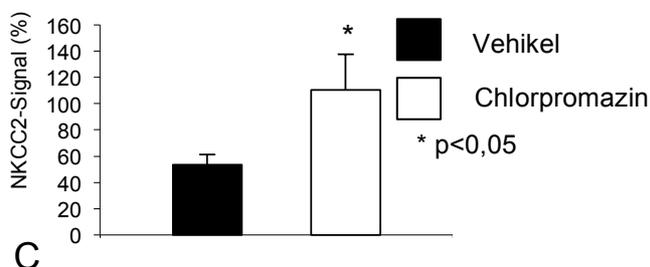


Abb. 21: Oberflächenexpression von NKCC2 nach Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose mittels Chlorpromazin in kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung.

(A-C) Im Vergleich zur Kontrolle (A, Pfeile, 6 nm) führte die Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin zur Steigerung der Oberflächenexpression von NKCC2 (B, Pfeile, 6 nm). Quantifizierung des NKCC2-Signals nach Vehikel- bzw Chlorpromazin-Behandlung (C). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.



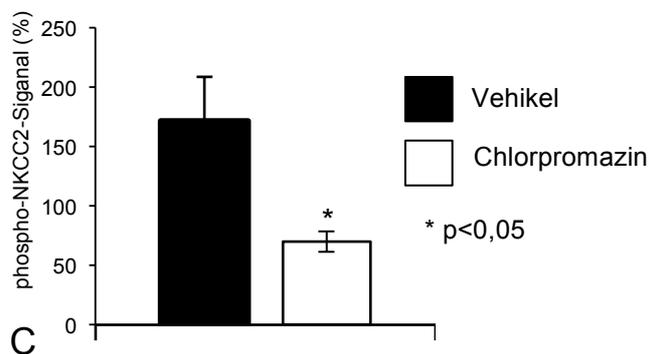
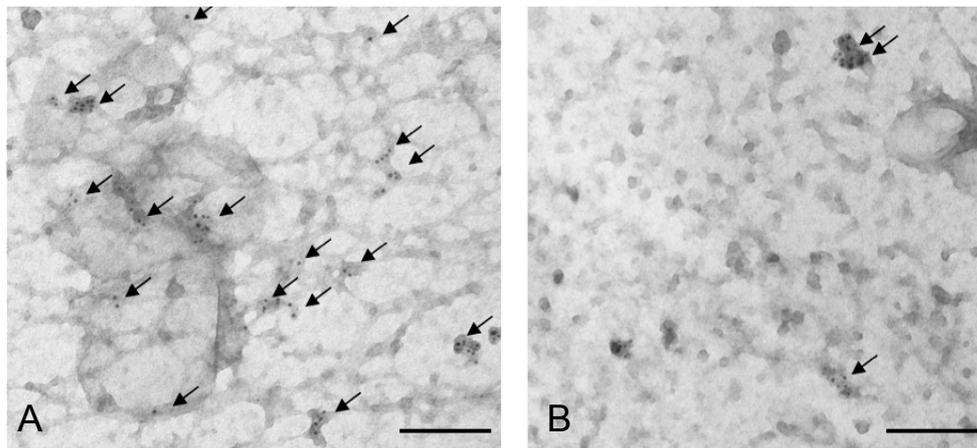


Abb. 22: Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 nach Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose mittels Chlorpromazin in kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. (A-C) Die Behandlung der Zellen mit Chlorpromazin vermindert die Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 (B, Pfeile, 6 nm) im Vergleich zur Kontrolle (A, Pfeile, 6 nm). Quantifizierung des phospho-NKCC2-Signals nach Vehikel- bzw Chlorpromazin-Behandlung (C). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Die Akkumulation des NKCC2-Signals in der apikalen Plasmamembran nach der kurzzeitigen pharmakologischen Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose spricht für eine bedeutende Rolle dieser Endozytoseroute in der Regulation der NKCC2-Oberflächenexpression. Die parallele Reduktion der NKCC2-Phosphorylierung nach der Chlorpromazin-Behandlung weist auf eine kompensatorische Anpassung der Aktivität der für NKCC2 relevanten Phosphokinasen bzw. Phosphatasen hin.

6.2.2.2 *Physikalische Interaktion von NKCC2 mit Clathrin-coated pits*

Desweiteren wurde die Rolle der NKCC2-Phosphorylierung für die Clathrin-abhängige Endozytose näher untersucht. Der Einschluss von membranständigen Proteinen in die *Clathrin coated pits* wird typischerweise über AP2 vermittelt [66]. Daher wurden zunächst die zytoplasmatischen N- und C-terminalen Sequenzen von NKCC2 auf die Präsenz von AP2-Bindungsmotiven untersucht, um deren potentielle Überlappung mit konservierten Phosphorylierungsstellen zu ermitteln. Hierbei konnte ein kanonisches YXXØ-Motiv für die Bindung mit AP2 im NKCC2 N-Terminus (YENF) sowie zwei

solcher Motive im C-Terminus identifiziert werden (YRQV, YMAW). Obwohl das N-terminale AP2-Bindungsmotiv keine direkte Überlappung mit bekannten Phosphorylierungsstellen zeigte, könnte die Phosphorylierung des Transporters theoretisch über entsprechende Veränderungen in der Konfiguration des N-Terminus die Interaktion mit *Clathrin-coated pits* beeinflussen. Die C-terminalen AP2-Bindungsmotive könnten hierbei für die konstitutive, phosphorylierungsunabhängige NKCC2-Internalisierung zuständig sein. Im nächsten Schritt wurde die Assoziation des Transporters mit *Clathrin-coated pits* mittels Ko-Immunpräzipitation verifiziert. Hierbei konnte Clathrin bei der Immunpräzipitation von NKCC2 aus Rattennierenhomogenaten als ein Bindungspartner für den Transporter nachgewiesen werden (Abb. 23).

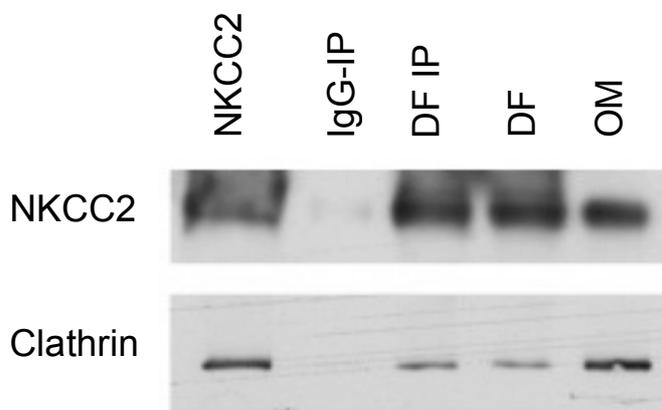


Abb. 23: Ko-Immunpräzipitation von NKCC2 und Clathrin aus Nieren-Homogenat. Die erhaltenen Eluate wurden mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde NKCC2 nachgewiesen und Clathrin als ko-immunpräzipitierendes Protein von NKCC2 detektiert. Die untersuchten Proteine fehlten in der IgG-Kontroll-Immunpräzipitation (IgG-IP), konnten aber in den Durchflussproben (DF) bzw. in dem ursprünglichen Gewebehomogenat der äußeren Medulla detektiert werden (OM, *outer medulla*).

Um die Effekte der NKCC2-Phosphorylierung an verschiedenen N-terminalen Bindungsstellen auf deren Interaktion mit *Clathrin-coated pits* zu überprüfen, wurden verschiedene phospho- bzw. dephospho-NKCC2-N-terminale Mutanten als rekombinante GST-Fusionsproteine für *GST-pull-down Assays* hergestellt. *GST-pull-down Assays* mit dem unveränderten N- bzw. C-Terminus von NKCC2 als *Bait* zeigten, dass Clathrin an beide Termini bindet. Der Einsatz von N-terminalen NKCC2-Mutanten, die deren Phosphorylierung (T/S->D) oder Dephosphorylierung (T/S->A) an relevanten Aminosäuren (T96, T101, T114 und S126) simulieren sollten, wies darauf hin, dass die Phosphorylierung von NKCC2 dessen N-terminale Interaktion mit Clathrin inhibiert (Abb. 24). Diese Daten stehen im Einklang mit der Hypothese, dass die NKCC2-

Phosphorylierung die Internalisierungsrate von NKCC2 modulieren kann und somit den Transporter in der apikalen Plasmamembran stabilisieren könnte.

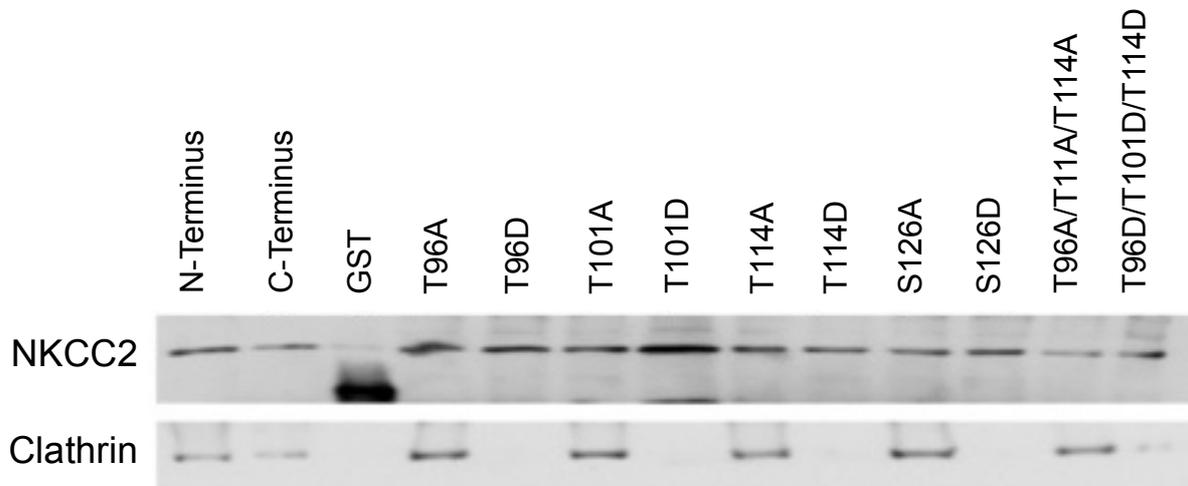


Abb. 24: GST-pull-down Assay von rekombinanten NKCC2-Termini. Darstellung mittels Western Blot. Der zytoplasmatische N- und C- Terminus von NKCC2 wurden als rekombinante GST-Fusionsproteine exprimiert und an Gluthation-Beads gebunden. Zusätzlich wurden N-terminale Mutanten hergestellt, welche entweder Phosphorylierung (T/S->D) oder Dephosphorylierung (T/S->A) simulieren. Rattennieren wurden lysiert und mit den Fusionsproteinen inkubiert und die gebundenen Proteinkomplexe eluiert. Die Western Blot Analyse zeigt, dass Clathrin sowohl mit dem N- als auch mit dem C-Terminus von NKCC2 interagieren kann. Die N-terminale Bindung von Clathrin an NKCC2 scheint durch die Phosphorylierung der Transporters abgeschwächt zu sein, da die entsprechenden phospho-N-terminalen Mutanten keine signifikante Interaktion mit Clathrin zeigten.

6.2.3 Regulation der NKCC2-Endozytose durch das antidiuretische Hormon

Die exozytische Insertion von NKCC2 in die apikale Membran unterliegt der Regulation durch ADH. Um die Effekte von ADH auf die NKCC2-Internalisierung zu beleuchten, wurden kultivierte TAL-Zellen kurzzeitig (30 min) mit einem Vasopressin V2-Rezeptor-Analogon (dDAVP) behandelt. Hier bewirkte dDAVP (10^{-7} M in Zellkulturmedium) eine Steigerung der Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 (+53%) mit gleichzeitiger Verringerung der Ko-Lokalisation von NKCC2 mit Clathrin (Abb. 25, 26).

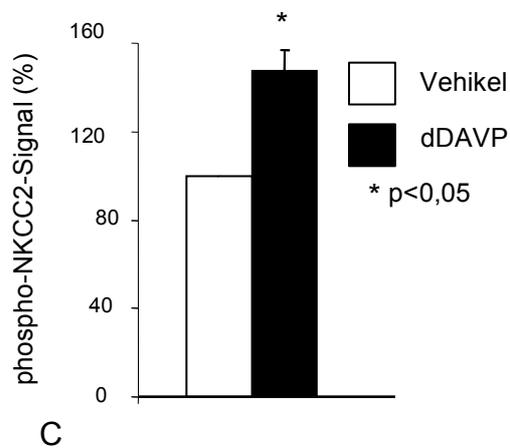
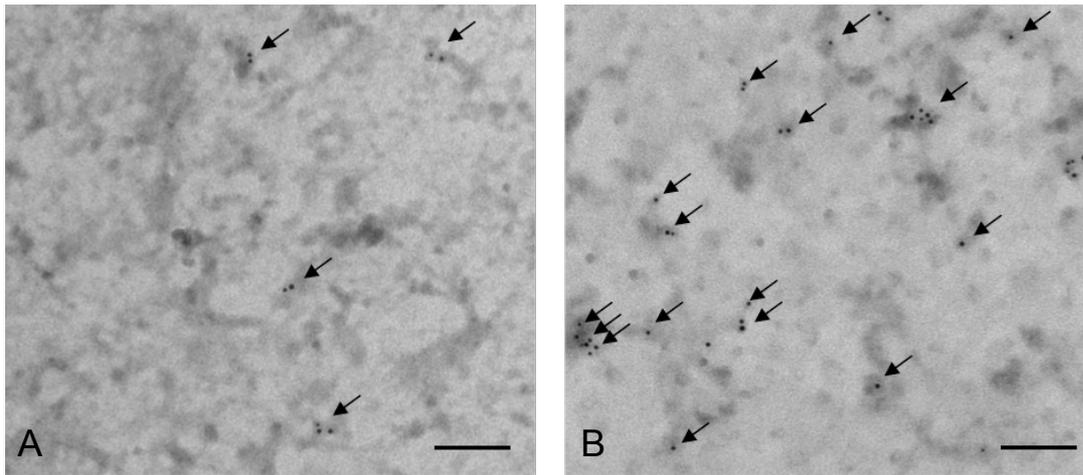


Abb. 25: Gesteigerte Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 nach Stimulation mit dDAVP in der apikalen Plasmamembran kultivierter TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immungoldmarkierung. (A-C) Vergleichen mit der Kontrolle (A, Pfeile, 6 nm) führte die 30 min Behandlung der kultivierten TAL-Zellen mit dDAVP zur gesteigerten Oberflächenexpression von phospho-NKCC2 (B, Pfeile, 6 nm) in der Plasmamembran im Vergleich zum Vehikel (A, Pfeile). Quantifizierung des phospho-NKCC2-Signals nach Vehikel- und dDAVP-Behandlung (C). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

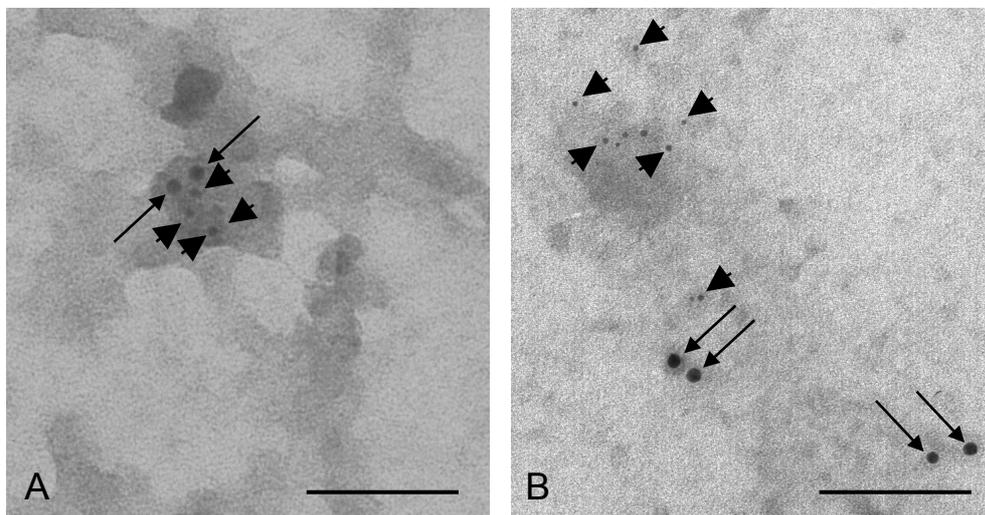


Abb. 26: Verminderte Ko-Lokalisation von NKCC2 mit Clathrin nach kurzzeitiger dDAVP-Behandlung in der apikalen Plasmamembran von kultivierten TAL-Zellen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immungoldmarkierung. Vergleichen mit der Kontrolle (A) führte die 30 min Behandlung der kultivierten TAL-Zellen mit dDAVP einer verminderten Ko-Lokalisation von NKCC2 (kurze Pfeile, 5 nm) mit Clathrin (B, lange Pfeile, 10 nm) in der Plasmamembran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Weiterhin wurden die kurzzeitigen Effekte (30 min) von dDAVP (1µg/kg Körpergewicht) auf die Interaktion zwischen NKCC2 und Clathrin mittels Ko-Immünpräzipitation aus Nierenhomogenaten von Brattleboro-Ratten untersucht. Es konnte eine signifikante Abschwächung der Assoziation zwischen NKCC2 und Clathrin nach der dDAVP-Stimulation festgestellt werden (A, -71%, $p < 0,01$) (B, -62%, $p < 0,01$) (Abb. 27).

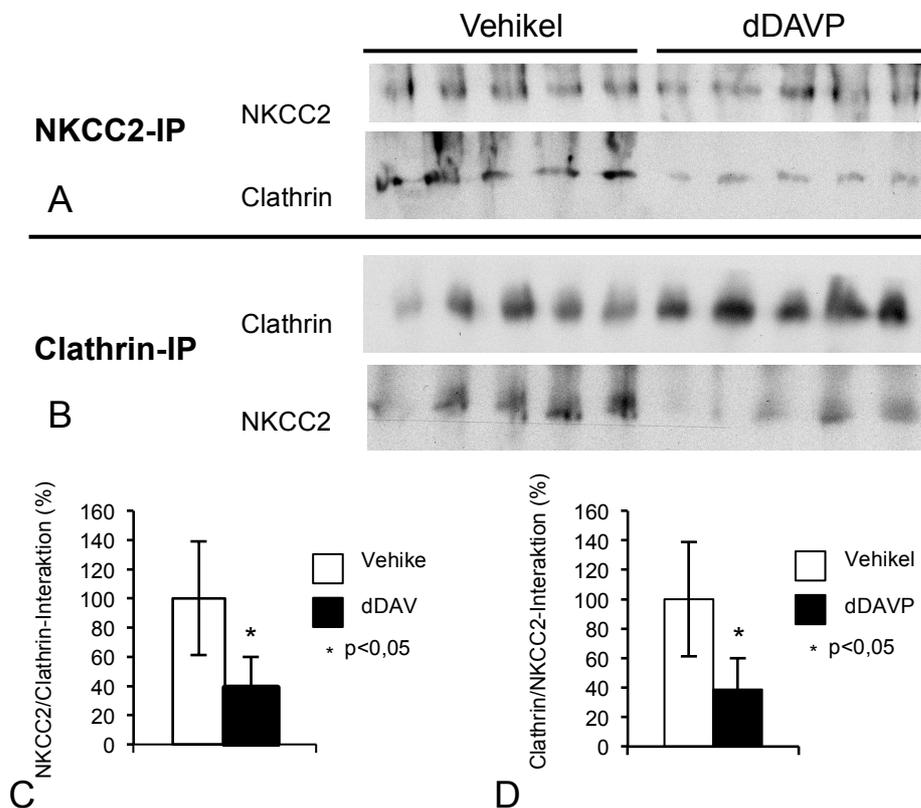


Abb. 27: Effekte von dDAVP auf die Interaktion zwischen NKCC2 und Clathrin in medullären Homogenaten. Ko-Immünpräzipitation und Darstellung mittels Western Blot. Immunpräzipitation von NKCC2 und Nachweis von Clathrin als ko-immunpräzipitiertes Produkt mittels Western Blot (A). Immunopräzipitation von Clathrin und Nachweis von NKCC2 als ko-immunpräzipitiertes Produkt mittels Western Blot (B). Quantifizierungen der Clathrin/NKCC2-Signalverhältnisse (C) bzw. der NKCC2/Clathrin-Signalverhältnisse (D) als Äquivalent der Interaktion zwischen den beiden Produkten. Die Daten entsprechen Mittelwerten +/- SD.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ADH nicht nur eine Steigerung der apikalen NKCC2-Insertion, sondern auch eine Verringerung von dessen Internalisierung bewirken könnte. Der letztere Effekt könnte auf eine gesteigerte NKCC2-Phosphorylierung mit der daraus resultierenden Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose zurückgeführt werden.

6.3 Die Rolle von Sortilin bei der Internalisierung von NKCC2

Mitglieder der VPS10p-Rezeptor-Familie können das intrazelluläre Trafficking von NKCC2 und NCC modulieren. Zwei Mitglieder dieser Familie, nämlich SORLA und Sortilin, sind in der Niere exprimiert. Sortilin wurde bereits bei der Regulation des intrazellulären Traffickings von NCC beschrieben [57]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen NKCC2 und NCC wurde im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von Sortilin in der Regulation des NKCC2-Traffickings überprüft.

6.3.1 Verteilung von Sortilin in der Niere und Interaktion mit NKCC2

Die Verteilung von Sortilin in der Niere wurde bisher nur in Teilaspekten untersucht [57]. Deswegen haben wir zunächst eine immunohistochemische Lokalisationsstudie durchgeführt. In der Mausniere wurde eine partielle Ko-Lokalisation von Sortilin mit NKCC2 im apikalen Zellkompartiment von TAL-Zellen detektiert (Abb. 28). Weiterhin konnte die bereits beschriebene Expression von Sortilin im DCT bestätigt werden. Der verwendete Antikörper produzierte kein Signal in den Sortilin-defizienten Tieren, welche hier als Negativ-Kontrolle fungierten (Abb. 28, 29).

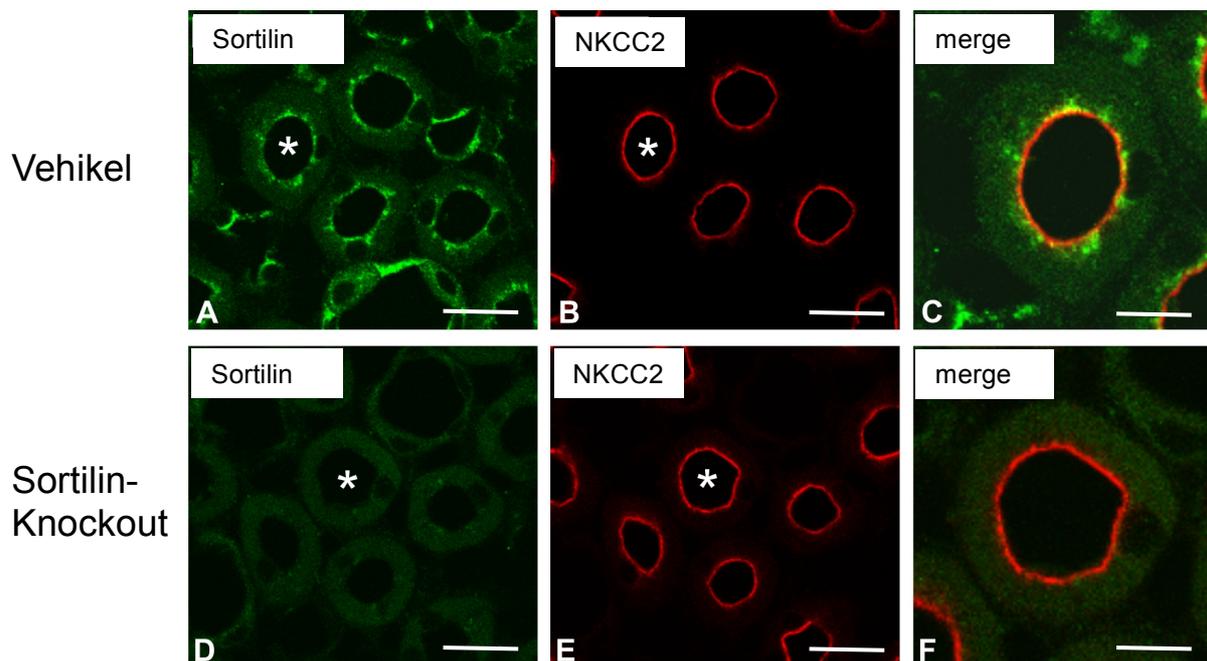


Abb. 28: Ko-Lokalisation von Sortilin mit NKCC2 im TAL in Wildtyp- und Sortilin-Knockout-Tieren. (A-C) Die Konfokalmikroskopie zeigt eine vorwiegend apikale Verteilung vom Sortilin (grün) im TAL und dessen partielle Ko-Lokalisation mit NKCC2 (rot). Der Stern in (B) markiert den vergrößerten TAL (C) und demonstriert die anteilige Ko-Lokalisation von Sortilin und NKCC2 (C). (D-F) Im Sortilin-*Knockout*-Modell konnte kein Sortilin im TAL nachgewiesen werden (D, F). Der Stern in (E) markiert den vergrößerten TAL in (F). NKCC2 wird in den *Knockout*-Tieren in gleicher Intensität wie im Wildtyp-Modell exprimiert (B, E). Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

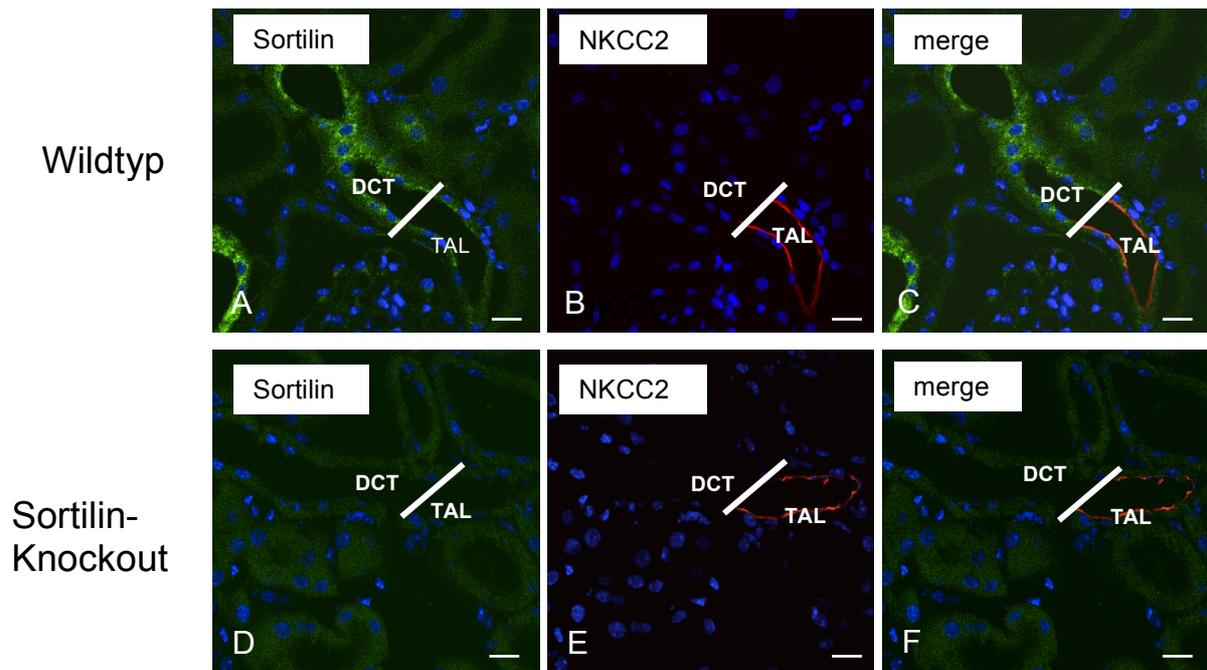


Abb. 29: Ko-Lokalisation von Sortilin und NKCC2 in DCT und TAL in Wildtyp- und Sortilin-Knockout-Mäusen. Die Trennlinie markiert DCT und TAL. (A-C) Die Konfokalmikroskopie zeigt im Wildtyp-Modell eine apikale Verteilung von Sortilin (grün) im DCT, im TAL wird deutlich weniger Sortilin exprimiert. Im TAL kann eine partielle Ko-Lokalisation von Sortilin und NKCC2 (rot) nachgewiesen werden. (D-F) Eine Negativkontrolle erfolgt mittels Sortilin-Knockout-Modell, hier kann keine Sortilin-Expression nachgewiesen werden. Die Zellkerne sind mittels DAPI blau angefärbt (A-E). Der Maßstabsbalken entspricht 20µm.

Bei der Immunpräzipitation von NKCC2 aus Rattennierenhomogenaten wurden Sortilin und Clathrin als ko-immunpräzipitierende Produkte detektiert (Abb. 30). Dieses Ergebnis wies auf eine Interaktion zwischen NKCC2 und Sortilin hin, welche bei der Clathrin-abhängigen NKCC2-Internalisierung eine Rolle spielen könnte.

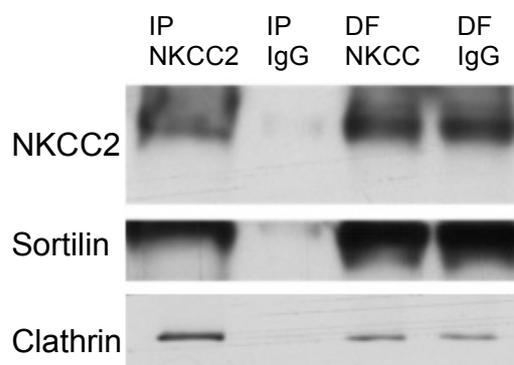


Abb. 30: Assoziation von NKCC2 mit Sortilin und Clathrin in der Ratten-Niere. NKCC2 wurde aus Homogenaten von Rattennieren immunpräzipitiert und die erhaltenen Eluate mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde NKCC2 nachgewiesen und Sortilin sowie Clathrin als ko-immunpräzipitierende

Proteine von NKCC2 detektiert. Alle untersuchten Proteine fehlten in der IgG-Kontroll-Immunpräzipitation (IP IgG), konnten aber in den Durchflussproben detektiert werden (DF NKCC2 und DF IgG).

Die Evaluierung von kultivierten TAL-Zellen zeigte eine starke endogene Expression von Sortilin in der apikalen Plasmamembran des TAL (Abb. 31).

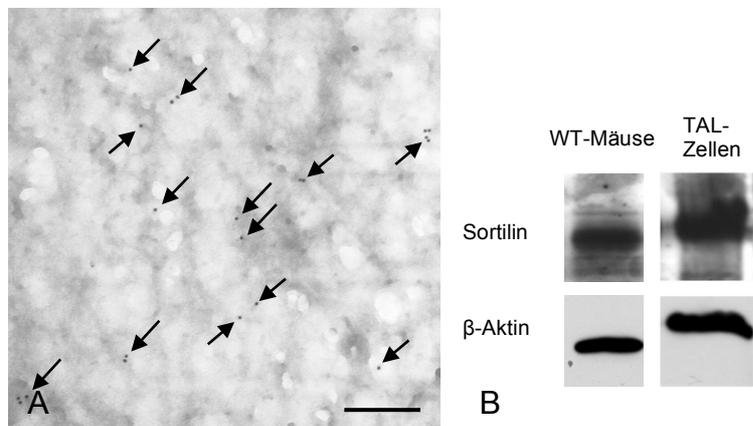


Abb. 31: Transmissions-elektronenmikroskopische Darstellung von Sortilin mittels Immunogoldmarkierung in der apikalen Plasmamembran von kultivierten TAL-Zellen und Sortilin-Nachweis in Wildtyp-Mäusen. Präparation von apikalen Membranfragmenten von kultivierten TAL-Zellen mittels RipFlip-Technik mit anschließender Immunogoldmarkierung. Es zeigt sich eine homogene Expression von Sortilin in der apikalen Plasmamembran des TAL (A, Pfeile, 5 nm). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm. Im Western Blot wurde die Expression von Sortilin in TAL-Zellen nachgewiesen (B). Nierenhomogenate dienten als Positivkontrolle (B). Ladungskontrolle mittels β-Aktin.

Trotz dieser Hinweise auf eine Rolle von Sortilin bei der Regulation des NKCC2-Traffickings ergab die Untersuchung der Oberflächenexpression von NKCC2 in Sortilin-defizienten Mäusen keinen signifikanten Unterschied verglichen mit den Kontrollmäusen (Abb. 32).

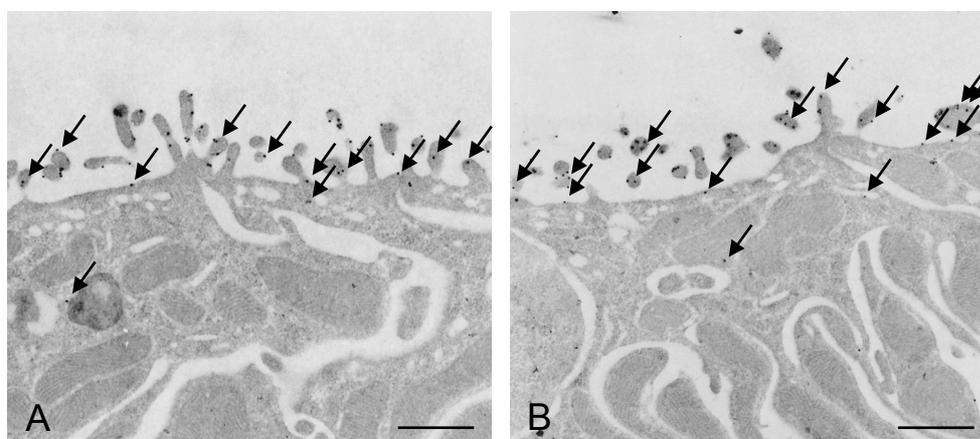


Abb. 32: Elektronenmikroskopische Darstellung von NKCC2 mittels Immunogold-Markierung in der apikalen Plasmamembran von Wildtyp- und Sortilin-1 *Knockout*-Ratten. Die Nieren wurden im *LR-White*-Medium eingebettet, geschnitten und anschließend elektronenmikroskopisch untersucht.

NKCC2 ist hauptsächlich in der apikalen Plasmamembran der TAL-Zelle exprimiert (A, B, Pfeile, 6 nm). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Oberflächenexpression von NKCC2 in Vehikel (A) und Knockout-Tieren (B). Der Maßstabsbalken entspricht 100 nm.

Es wurde außerdem die Expression von Sortilin in kultivierten TAL-Zellen mittels des si-RNA-vermittelten *Knockdowns* unterdrückt und Effekte dieser Manipulation auf die endogene NKCC2-Expression evaluiert. Auch hier konnten keine Sortilin-abhängigen Veränderungen der NKCC2-Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 33).

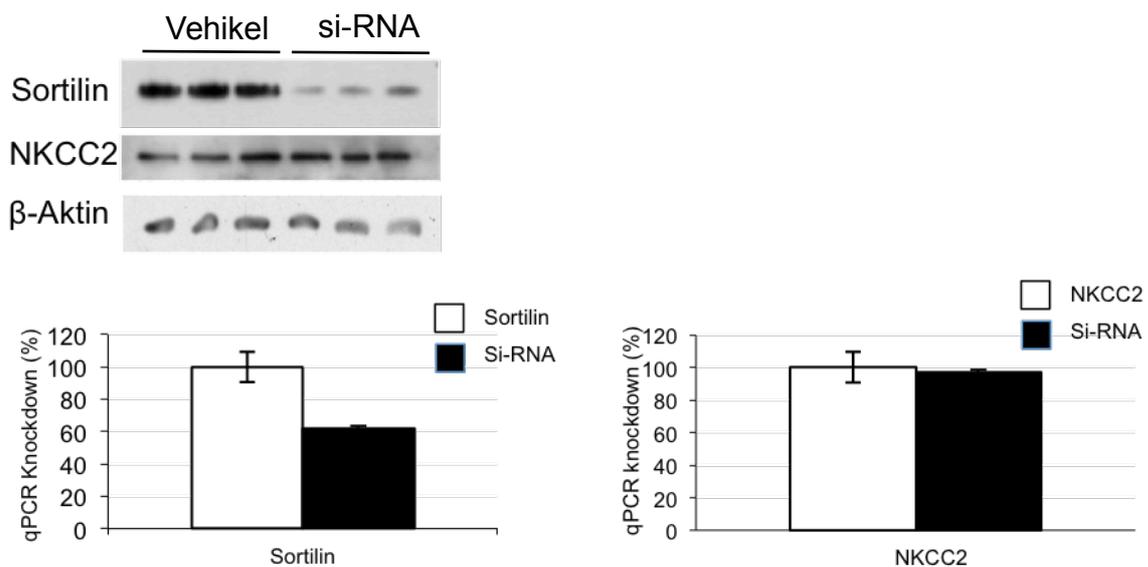


Abb. 33: Hemmung der Sortilinexpression auf RNA-Ebene mittels si-RNA in kultivierten TAL-Zellen. Darstellung mittels Western Blot. Nach si-RNA-Behandlung der kultivierten TAL-Zellen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Sortilin-Expression, während die NKCC2-Expression unverändert bleibt. Ladungskontrolle mittels β -Aktin.

Somit scheint Sortilin, trotz seiner Ko-Lokalisierung und Interaktion mit NKCC2, keine bedeutende Rolle in der Regulation des Transporters zu spielen.

7 Diskussion

Die Niere erfüllt im Säugerorganismus vielfältige Aufgaben, wobei die Volumenregulation einen wichtigen Baustein in der Physiologie dieses Organs darstellt. Innerhalb des Tubulussystems erfüllt der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife essentielle Aufgaben im Rahmen der Harnkonzentrierung. Der transzelluläre Transport von Natrium und Chlorid erfolgt hier über den luminalen NKCC2-Kotransporter. Die endokrine Kontrolle durch ADH moduliert seine Funktion. Auf der zellulären Ebene wird die Aktivität von NKCC2 posttranslational durch zelluläres Trafficking und durch Phosphorylierung gesteuert [60, 96]. ADH stimuliert über die Freisetzung von cAMP das apikale Trafficking von NKCC2 und steigert damit Oberflächenexpression und Funktion des Transporters [69]. Die exozytische Insertion des Transporters aus apikalen Vesikeln in die Plasmamembran ist hierbei erkannt [50, 63]. SNARE-Proteine wie VAMP2 und VAMP3 [69, 97] sowie Annexin 2 wurden als ADH-abhängige Komponenten der exozytischen Traffickingmaschinerie identifiziert. Im Gegensatz dazu sind die Schritte der Internalisierung von NKCC2 weniger gut verstanden [47, 53, 65]. Die Phosphorylierung von NKCC2 kann hier möglicherweise auf Internalisierungsschritte modulierend einwirken. Membranständige *Lipid rafts*, die NKCC2 beherbergen, können weiterhin für seine Funktion eine Rolle spielen und mit der Internalisierung in Zusammenhang stehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das zelluläre Trafficking des Kotransporters mit dem Fokus auf Mechanismen seiner Endozytose näher zu charakterisieren.

7.1 NKCC2 befindet sich vorwiegend in *Lipid Raft*-Domänen

Die Oberflächenexpression von NKCC2 wird durch das Verhältnis zwischen seinem apikalen Trafficking und seiner Internalisierung bestimmt. Über die RipFlip-Methode und transmissionselektronenmikroskopische Auswertung konnten wir in dieser Arbeit eine Ko-Lokalisation von NKCC2 mit dem GPI-verankerten Marker THP in der apikalen Plasmamembran des TAL nachweisen. Der etablierte *Lipid raft*-Marker Flotillin-1 trug weiterhin dazu bei, die elektronendichten cholesterinreichen *Raft*-Regionen der Plasmamembran anhand von kultivierten TAL-Zellen zu identifizieren und diese gegen proteinreiche Membrandomänen ("Proteininseln") abzugrenzen; solche Membrandomänen können anteilig *Raft*-Domänen einschliessen [73, 77, 98]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorangegangenen Arbeiten unserer Gruppe, welche

zeigen konnten, dass EM-topographisch NKCC2 innerhalb der Plasmamembran in *Rafts* angereichert vorliegt [72]. Die Ko-Lokalisation von NKCC2 mit THP in *Rafts* hat offenbar einen die Aktivität des Transporters begünstigenden Einfluß [27]. Generell können GPI-verankerte Proteine offenbar dazu beitragen, regulatorische *Scaffolding platforms* unter Beteiligung von *Raft*-Lipiden zu organisieren [73, 77, 99]. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese und liefern weitere Evidenz dafür, dass der Einbau von NKCC2 in *Lipid rafts* seine Oberflächenexpression und Funktion beeinflusst [46, 53, 75]. Zur näheren Charakterisierung der Bedeutung der *Lipid rafts* für die Funktion von NKCC2 dienten die Versuche mit Sphingomyelinase an kultivierten TAL-Zellen. Die enzymatische Spaltung von Sphingomyelin zur Zerstörung von *Lipid raft*-Membrandomänen und wurde bereits für die Behandlung von TAL-Zellen etabliert [100]. Weitere Daten unserer Gruppe zeigten, dass die Behandlung von kultivierten TAL-Zellen mit Sphingomyelinase bei verringerter Dichte von *Lipid rafts* eine verminderte Oberflächenexpression des phosphorylierten NKCC2 im TAL erbrachte [72]. Die Unterdrückung der *Lipid rafts* erbrachte eine inhibitorische Wirkung auf das ADH-induzierte apikale Trafficking des Transporters [53]. Die EM-topographische Verteilung von phosphoryliertem, aktivem NKCC2 zwischen den elektronendichten *Raft*-Domänen und *Non-raft* Regionen der Plasmamembran wurde ebenfalls untersucht. Phospho-NKCC2 war fast ausschließlich in den *Raft*-Domänen lokalisiert. Wahrscheinlich erfolgt die Phosphorylierung von NKCC2 nach seinem Einbau in die apikalen *Lipid rafts* [68]. Eine Cholesterin-Depletion führte zuvor auch funktionell zu einer deutlichen Reduktion der NKCC2-Aktivität [53]. Das apikale Trafficking von NKCC2 ist weiterhin von einer Interaktion des *Lipid raft*-Proteins Annexin 2 mit NKCC2 in seiner N-terminal de-phosphorylierten Konformation abhängig [98].

Aus den vorliegenden Ergebnissen wird im Einklang mit vorher publizierten Studien deutlich, dass sowohl der Einbau von NKCC2 in *Lipid raft*-Membrandomänen als auch der regulatorische Schritt der Phosphorylierung die aktive Form von NKCC2 in der luminalen TAL-Membran bestimmen.

7.2 Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist der Hauptweg für die NKCC2-Internalisierung

Die Clathrin-abhängige Endozytose wurde als Hauptinternalisierungsweg für viele membranständige Proteine beschrieben [50, 65, 68, 101]. Vorangegangene Arbeiten

erbrachten bereits Evidenz dafür, dass NKCC2 ebenfalls durch diesen Weg aus der Plasmamembran internalisiert wird [65].

7.2.1 Caveolin-1 ist nicht im TAL exprimiert

Neben diesem Weg wurden auch *Lipid raft*-abhängige und Caveolin-abhängige Endozytosewege beschrieben, die bei der Internalisierung des Transporters eine Rolle spielen können [65]. Die vorliegende Arbeit konnte allerdings eine Expression von Caveolin-1 im TAL nicht nachweisen. Da Caveolin-1 ein wichtiges Strukturprotein der Caveolae ist, fehlten im Einklang mit der Abwesenheit von Caveolin-1 im TAL auch die Caveolae in diesem Nephronsegment. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen somit darauf hin, dass die Caveolin-abhängige Endozytose für die Internalisierung von NKCC2 nicht bedeutsam ist.

7.2.2 NKCC2 zeigt eine Ko-Lokalisation mit Clathrin

Im Gegensatz dazu konnten die Daten, die eine Clathrin-abhängige Endozytose von NKCC2 beschreiben [50, 65], durch diese Arbeit bestätigt und in neuen Aspekten beleuchtet werden. Die Immunogoldtechnik zeigte eine Ko-Lokalisation von NKCC2 mit Clathrin in den Protein-Inseln der apikalen Plasmamembran von kultivierten TAL-Zellen. Außerdem konnte mittels Ko-Immünpräzipitation eine Interaktion dieser beiden Proteine gezeigt werden.

7.2.3 NKCC2 zeigt eine N- und C-terminale Interaktion mit Clathrin

Um den Internalisierungsmodus von NKCC2 detaillierter zu charakterisieren, wurde die Aminosäuresequenz des Transporters bioinformatisch ausgewertet. Hierbei wurden potentielle Bindungsstellen für AP2 im N- sowie im C-Terminus identifiziert. Da der Einschluss von membranständigen Proteinen in die *Clathrin coated pits* in der Regel über AP2 vermittelt wird [66], könnte NKCC2 hiernach über seine zytoplasmatischen Termini mit *Clathrin-coated pits* interagieren. Weitere Evidenz hierfür erbrachte der *GST-pull-down Assay*. Hier konnte sowohl die N- als auch die C-terminale Interaktion von NKCC2 mit Clathrin nachgewiesen werden. Die Verwendung von N-terminalen NKCC2-Konstrukten, die durch entsprechende Mutationen bekannter, wichtiger Phosphorylierungsstellen eine konstitutive Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung des Transporters simulieren, wies darauf hin, dass die Phosphorylierung von NKCC2 seine N-terminale Interaktion mit Clathrin vermindern oder gänzlich verhindern könnte. Diese Daten sind im Einklang mit den vorangegangenen Studien am strukturell

ähnlichen NCC zu sehen, die eine wichtige Rolle der N-terminalen NCC-Phosphorylierung für dessen Oberflächenexpression demonstrierten [56]. Die Clathrin-abhängige Endozytose von NCC scheint hiernach hauptsächlich über dessen N-terminale Interaktion mit AP2 vermittelt zu werden. Die alternative, C-terminale Interaktion von NKCC2 mit Clathrin könnte die Internalisierung des Transporters allerdings unabhängig von seiner N-terminalen Phosphorylierung dennoch über AP2 ermöglichen. Somit wären bei der N-terminalen Phosphorylierung von NKCC2 keine grundsätzlich bestimmenden, sondern eher modulierende Effekte auf dessen Oberflächenexpression zu erwarten.

7.2.4 Die Phosphorylierung von NKCC2 vermindert die Interaktion mit Clathrin

Im Einklang mit dieser Vermutung konnten wir hier eine moderate Assoziation des N-terminal phosphorylierten Transporters mit *Clathrin coated pits* durch Immunogold-Markierung und Immunpräzipitation nachweisen. Diese Interaktion war jedoch substantiell schwächer als die entsprechende des dephosphorylierten Transporters mit Clathrin. Die in vorigen Arbeiten postulierte *Lipid raft*-abhängige Endozytose könnte neben der Clathrin-abhängigen Route an der Internalisierung des phosphorylierten Transporters beteiligt sein und die Clathrin-abhängige Endozytose somit ergänzen [65]. Das Zusammenspiel dieser beiden Wege während der Regulation der NKCC2-Oberflächenexpression ist momentan noch wenig beleuchtet und erfordert weitere Untersuchungen. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass durch die Zerstörung der *Lipid rafts* die Endozytoserate von NKCC2 ohne Reduktion der zellulären Gesamtmenge von NKCC2 deutlich abnimmt [65].

7.2.5 Die Hemmung der Clathrin-abhängigen Endozytose steigert die Oberflächenexpression von NKCC2

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zur näheren Charakterisierung der Clathrin-abhängigen Endozytose von NKCC2 ihre Hemmung mittels Chlorpromazin durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigen die dominante Rolle der Clathrin-abhängigen Endozytose und sind im Einklang mit früheren Ergebnissen [73, 102]. Die Oberflächenexpression von NKCC2 in der apikalen Plasmamembran des TAL im Zellkulturansatz war dementsprechend nach der kurzzeitigen Hemmung der Ausbildung von *Clathrin-coated pits* um das Doppelte gesteigert. Parallel dazu zeigte sich eine deutlich verringerte Phosphorylierung von NKCC2. Dieser Effekt könnte eine

kompensatorische Deaktivierung des Transporters zum Schutz vor osmotischem Stress bzw. Zellschwellung darstellen.

7.3 Die ADH-abhängige NKCC2-Phosphorylierung inhibiert seine Internalisierung

Die Aktivitätssteigerung über Phosphorylierung N-terminaler Threonin- bzw. Serinreste, entscheidende posttranslationale Modifikation der Kotransporter NKCC2 und NCC, ist etabliert [61]. Eine schnelle Zunahme der NKCC2 Phosphorylierung wurde als Antwort auf die extrinsische Stimulation der ADH-V2 Rezeptor-Achse in vivo und in kultivierten Zellen dokumentiert [53]. Parallel dazu bewirkt ADH eine Steigerung der Oberflächenexpression von NKCC2 [12, 29]. Die ADH-abhängige Steigerung des intrazellulären cAMP-Spiegels mit konsekutiver Aktivierung der PKA und Insertion von NKCC2-enthaltenden Vesikeln in die apikale Plasmamembran des TAL wird hierbei als der Hauptmechanismus für die Steigerung der NKCC2-Oberflächenexpression betrachtet [48, 98, 103].

7.3.1 Die ADH-induzierte Phosphorylierung von NKCC2 hemmt kurzzeitig dessen Clathrin-abhängige Internalisierung

Jedoch weisen einige Studien darauf hin, dass das Ausmaß der ADH-Wirkung auf die Oberflächenexpression von NKCC2 einzig durch diese exozytotische Komponente nicht erklärt werden kann [25, 50]. ADH sollte hiernach zusätzlich zur Stimulation der apikalen Translokation von NKCC2 auch dessen Internalisierung hemmen [25, 50]. Der Mechanismus, der zur Stabilisierung des Transporters in der apikalen Plasmamembran führt, war bislang allerdings weitgehend unklar. Die Internalisierung und Degradation des NCC im distalen Konvolut war durch seine N-terminale Phosphorylierung an den konservierten Threoninen deutlich verlangsamt [98]. Die Bindungsstudien im Rahmen der vorliegenden Arbeit wiesen ihrerseits entsprechend darauf hin, dass die Phosphorylierung von NKCC2 seine Clathrin-abhängige Endozytose inhibieren könnte. Um die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse zu überprüfen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zusammenhänge zwischen der NKCC2-Phosphorylierung und seiner Interaktion mit Clathrin in vivo an Vasopressin-defizienten Brattleboro-Ratten untersucht. Die deutliche Abschwächung der Interaktion zwischen NKCC2 und Clathrin nach einer kurzzeitigen Stimulation von Brattleboro-Ratten mit dDAVP spricht dafür,

dass die ADH-vermittelte Steigerung der Oberflächenexpression von NKCC2 auch mit einer gewissen Hemmung seiner Internalisierung einhergeht. Diese Schlussfolgerung wurde durch die Experimente an kultivierten TAL-Zellen im Rahmen dieser Arbeit untermauert. Ähnlich wie in den Experimenten an Brattleboro-Ratten konnte auch in Zellkultur gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Behandlung mit dDAVP zu einer Steigerung der NKCC2-Phosphorylierung und gleichzeitig einer Abschwächung seiner Assoziation mit Clathrin führte.

7.3.2 Potentielle Mechanismen der phospho-abhängigen Regulation der NKCC2-Internalisierung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen somit umfassend, dass bei der ADH-vermittelten Stimulation der Funktion von NKCC2 kurzzeitig die Stabilisierung des phosphorylierten Transporters in der apikalen Plasmamembran von Bedeutung ist. Allerdings scheint - im Gegensatz zum NCC - die Phosphorylierung von NKCC2 dennoch in der langfristigen Perspektive keine grundlegenden Effekte auf seine Oberflächenexpression und Gesamtmenge auszuüben [43, 53, 61]. Die Analyse von Mausmodellen mit konstitutiv erhöhter (SPAK-defiziente Mäuse) oder erniedrigter NKCC2-Phosphorylierung (SORLA-defiziente Mäuse) zeigte nämlich keine substanziellen Veränderungen der Oberflächenexpression oder Gesamtmenge von NKCC2 [49], [59]. Daher ist davon auszugehen, dass die ADH-vermittelte Phosphorylierung von NKCC2 keine langfristigen Veränderungen der NKCC2-Oberflächenexpression in der Plasmamembran verursacht; lediglich kurzfristig modulierende Effekte der Oberflächenexpression sind daher offenbar Funktion der Phosphorylierung.

Die hier durchgeführten Bindungsstudien weisen weiter darauf hin, dass NKCC2 sowohl über seinen N- als auch über seinen C-Terminus mit Clathrin interagieren kann. Es wäre also möglich, dass der Transporter unabhängig von seiner N-terminalen Phosphorylierung auch über eine C-terminale Assoziation mit *Clathrin-coated pits* konstitutiv internalisiert werden kann, während die N-terminale, phosphorylierungsabhängige Internalisierungsrouten den dynamischen, kurzzeitigen Anpassungen seiner Oberflächenexpression dienen könnten. In diesem Kontext könnte die ADH-abhängige NKCC2-Aktivierung sowohl über eine Steigerung seiner Membraninsertion aus den zytoplasmatischen Vesikeln als auch über eine phosphorylierungsabhängige Verringerung seiner Internalisierungsrate erfolgen. Das

Gleiche könnte im Prinzip für alle NKCC2-aktivierenden Hormone gelten, die in TAL-Zellen die cAMP/PKA-abhängige Signalkaskade stimulieren. So wurden auch Parathormon und Glukagon in der Vergangenheit als aktivierende, endokrine Stimuli identifiziert. Diese Hormone können ebenfalls eine kurzfristige Phosphorylierung von NKCC2 stimulieren [47, 61]. Die Kinasen, die die Phosphorylierung von NKCC2 cAMP-abhängig gewährleisten, sind allerdings in ihrer Identität noch nicht endgültig geklärt. Vorangegangene Arbeiten aus unserem Institut zeigten allerdings bereits, dass SPAK und OSR1 Kinasen hierbei aktiviert werden [49].

7.3.3 ADH stimuliert die Umverteilung von NKCC2 in Lipid Rafts

Insgesamt scheint anhand der experimentell induzierten Wirkung von ADH auf den TAL die Phosphorylierung hinsichtlich der Oberflächenexpression von NKCC2 auf mehreren Wegen effektiv zu sein. ADH stimuliert die Umverteilung von NKCC2 von *Non-raft*-Regionen der Plasmamembran in die *Lipid rafts* und induziert gleichzeitig die Phosphorylierung von NKCC2. Die Verringerung der Interaktion zwischen NKCC2 und Clathrin könnte zum Teil so auch durch die räumliche Trennung beider Proteine in der apikalen Plasmamembran zustande kommen, da Clathrin grundsätzlich ein *Non-raft* Protein ist und nicht gleichzeitig in *Rafts* verschoben würde. Die Umverteilung des Transporters in *Lipid rafts* scheint auch seine Phosphorylierung zu begünstigen, obwohl die dafür verantwortlichen Mechanismen noch wenig verstanden sind. Frühere Arbeiten zeigten, dass bestimmte Proteine der *Lipid rafts*, wie THP, die Phosphorylierung und Funktion von NKCC2 modulieren könnten [46].

7.4 Die Rolle von Sortilin beim zellulären Trafficking von NKCC2

Die multifaktorielle Rolle von Sortilin im Rahmen von neurologischen und kardiovaskulären Erkrankungen wurde bereits eingehend studiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Sortilin als genetischer Risikofaktor in neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer impliziert ist [104]. Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen konnte in der Vergangenheit die Bedeutung des Sortilin-vermittelten Traffickings belegt werden. So korrelieren zirkulatorische Lipoproteine eng mit der Sortilin-Expression in Hepatozyten [104].

7.4.1 Sortilin vermittelt die Degradation von NCC in der Niere

Hinsichtlich der renalen Bedeutung von VPS10p-Domäne-Rezeptoren wurden bereits die in der Niere exprimierten Mitglieder dieser Familie, SORLA und Sortilin, mit der Regulation der distalen Salztransporter in Zusammenhang gebracht [57, 59]. Hierbei soll Sortilin unter anderem die WNK4-abhängige Internalisierung und Degradation von NCC vermitteln [57]. Hier wurde nun untersucht, ob Sortilin auch in die Regulation der NKCC2-Endozytose involviert sein könnte.

7.4.2 Die Deletion von Sortilin hat keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von NKCC2

Trotz der Ko-Lokalisation zwischen NKCC2 und Sortilin im TAL von Wildtypmäusen und deren Interaktion bei der Ko-Immünpräzipitation, wurden bei der Analyse von Sortilin-*Knockout*-Mäusen keine Effekte der Sortilin-Deletion auf die Oberflächenexpression oder Gesamtmenge von NKCC2 detektiert. Um weitere Einblicke in die Rolle von Sortilin in TAL-Zellen zu gewinnen, wurde die Expression des Rezeptors mittels des si-RNA-vermittelten *Knockdowns* in kultivierten TAL-Zellen unterdrückt. Dabei konnten ebenfalls keine signifikanten Effekte auf die zelluläre Menge von NKCC2 festgestellt werden. Obwohl diese Daten eine Rolle des Sortilins in der renalen Regulation von NKCC2 nicht vollständig ausschließen, scheint dieser Sortierungsrezeptor von keiner wesentlichen Bedeutung für das NKCC2-Trafficking bzw. -*Turnover* zu sein.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für eine substantielle Rolle der Clathrin-abhängigen Endozytose in der Regulation der Oberflächenexpression von NKCC2. Die N-terminale Phosphorylierung des Transporters scheint darüber hinaus seine Internalisierung graduell zu hemmen.

8 Schlussfolgerung

Der nierenspezifische $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter (NKCC2) vermittelt die transzelluläre Rückresorption vom Natriumchlorid in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife (*thick ascending limb*; TAL) und ist essenziell für die Harnkonzentrierung und Volumenregulation. Die Aktivität des Transporters hängt von der Oberflächenexpression seiner aktiven, phosphorylierten Form ab. Das antidiuretische Hormon ADH aktiviert den Transporter über Stimulation seiner luminalen Translokation sowie über Steigerung seiner Phosphorylierung an konservierten N-terminalen Threoninresten (T96, T101, und T114). Im Rahmen seines apikalen Traffickings wird NKCC2 in die cholesterin- und lipidreichen Mikromembrandomänen der apikalen Plasmamembran, die *Lipid rafts*, eingeschlossen. Die Internalisierung des Transporters findet hauptsächlich über die Clathrin-vermittelte Endozytose statt. Die genauen Mechanismen der Internalisierung von NKCC2 sind jedoch bislang nur unzureichend charakterisiert worden. Um neue Einblicke in die Regulation der Oberflächenexpression und Funktion von NKCC2 im TAL zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine nähere Charakterisierung der Mechanismen der NKCC2-Endozytose unternommen und die Effekte der NKCC2-Phosphorylierung auf die Internalisierung des Transporters beleuchtet. Die Verteilung des NKCC2 zwischen *Lipid rafts* und *Non-raft* Membranregionen wurde durch hochauflösende Immunogold-basierte EM des Transporters mittels der RipFlip-Technik charakterisiert. Hierbei wurde das phosphorylierte NKCC2 vorwiegend in *Lipid raft* Domänen detektiert und zeigte in *Non-raft* Regionen nur eine geringe Ko-Lokalisierung mit Clathrin. Diese Experimente wurden durch funktionelle Studien mit pharmakologischer Zerstörung der *Lipid rafts* Domänen in kultivierten Zellen ergänzt. Hierbei konnte die in vorangegangenen Arbeiten postulierte Rolle der *Lipid rafts* für die NKCC2-Funktion bestätigt werden. Die prominente Bedeutung des Clathrin-vermittelten Internalisierungswegs für die Regulation der Oberflächenexpression von NKCC2 konnte in der vorliegenden Arbeit morphologisch und funktionell belegt werden. Alternative endozytotische Routen wie die Caveola-vermittelte Internalisierung konnten ausgeschlossen werden. Bei der Charakterisierung des Mechanismen der Clathrin-vermittelten NKCC2-Endozytose konnte sowohl eine N- als auch eine C-terminale Assoziation von NKCC2 mit *Clathrin-coated pits* gezeigt werden. Bindungs-Assays mit N-terminalen NKCC2-Konstrukten, die seine konstitutive Phosphorylierung oder Dephosphorylierung simulierten, deuteten

darauf hin, dass die Phosphorylierung des Transporters seine N-terminale Interaktion mit Clathrin inhibieren könnte. Diese Vermutung wurde durch Experimente an kultivierten TAL-Zellen sowie an Brattleboro-Ratten untermauert. Eine kurzzeitige Stimulation der NKCC2-Phosphorylierung mit einem V2-Rezeptor-spezifischen ADH-Analogen dDAVP verringerte die Ko-Lokalisation und Interaktion von NKCC2 mit Clathrin in beiden experimentellen Modellen. In Anbetracht der Rolle von Sortilin, einem Mitglied der VPS10p-Domäne Rezeptor-Familie, bei der Internalisierung des strukturell mit NKCC2 verwandten NCC wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich untersucht, ob Sortilin an der Clathrin-vermittelten NKCC2-Endozytose beteiligt ist. Trotz einer anteiligen Ko-Lokalisation zwischen NKCC2 und Sortilin im apikalen Bereich von TAL-Zellen sowie einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen bei deren Ko-Immunpräzipitation lieferte die Charakterisierung von Sortilin-*Knockout* Mäusen sowie Sortilin-*Knockdown* Experimenten an kultivierten TAL-Zellen keine Evidenz für eine Rolle von Sortilin bei der Regulation der Oberflächenexpression von NKCC2. Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit neue Aspekte der Regulation von NKCC2 durch phosphorylierungsabhängige Modulierung seiner Clathrin-vermittelten Internalisierung charakterisiert.

9 Literaturverzeichnis

Bücher:

* Benninghoff, Drenckhahn. Nieren. In: *Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1; 16. Auflage, 2003. Kapitel 8.3. Urban & Fischer Verlag München. ISBN 3-437-42340-1

* Sobotta, Welsch. Harnorgane. In: *Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. 2. Auflage, 2006. Kapitel 12. Elsevier GmbH, München. ISBN 978-3-437-44430-2

Abbildungen:

Die Verwendung von Bildmaterial in der Einleitung dieser Doktorarbeit wurde freundlicherweise von den verantwortlichen Autoren und den veröffentlichenden Verlagen genehmigt.

Literatur:

1. Vaidya, A., J.M. Brown, and J.S. Williams, *The renin-angiotensin-aldosterone system and calcium-regulatory hormones*. J Hum Hypertens, 2015.
2. Vaidya, A., *Vitamin D and cardio-metabolic disease*. Metabolism, 2013. **62**(12): p. 1697-9.
3. Brown, J., et al., *Aldosterone, parathyroid hormone, and the use of Renin-Angiotensin-aldosterone system inhibitors: the multi-ethnic study of atherosclerosis*. J Clin Endocrinol Metab, 2015. **100**(2): p. 490-9.
4. Brown, J.M. and A. Vaidya, *Interactions between adrenal-regulatory and calcium-regulatory hormones in human health*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2014. **21**(3): p. 193-201.
5. Hasegawa, H. and I. Komuro, *[The progress of the study of RAAS]*. Nihon Rinsho, 2009. **67**(4): p. 655-61.
6. Dang, A., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) block revisited*. Natl Med J India, 2008. **21**(4): p. 210.
7. Beitelshes, A.L. and I. Zineh, *Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) pharmacogenomics: implications in heart failure management*. Heart Fail Rev, 2010. **15**(3): p. 209-17.
8. Uri, K., et al., *New perspectives in the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) IV: circulating ACE2 as a biomarker of systolic dysfunction in human hypertension and heart failure*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e87845.
9. Leoncini, G., F. Viazzi, and R. Pontremoli, *RAAS inhibition and renal protection*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(7): p. 971-80.
10. Ogle, J.W., R.D. Lange, and C.D. Dunn, *Production of erythropoietin in vitro: a review*. In Vitro, 1978. **14**(11): p. 945-50.
11. Greger, R., *Physiology of renal sodium transport*. Am J Med Sci, 2000. **319**(1): p. 51-62.

12. Amsellem, S., et al., *Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(11): p. 1859-67.
13. Sands, J.M. and H.E. Layton, *The physiology of urinary concentration: an update*. Semin Nephrol, 2009. **29**(3): p. 178-95.
14. Gamba, G. and P.A. Friedman, *Thick ascending limb: the Na(+):K (+):2Cl (-) co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR*. Pflugers Arch, 2009. **458**(1): p. 61-76.
15. Soundararajan, R., D. Pearce, and T. Ziera, *The role of the ENaC-regulatory complex in aldosterone-mediated sodium transport*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**(2): p. 242-7.
16. Castrop, H., et al., *Physiology of kidney renin*. Physiol Rev, 2010. **90**(2): p. 607-73.
17. Bell, P.D., et al., *Macula densa cell signaling involves ATP release through a maxi anion channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4322-7.
18. Ren, Y., et al., *Role of macula densa adenosine triphosphate (ATP) in tubuloglomerular feedback*. Kidney Int, 2004. **66**(4): p. 1479-85.
19. Peti-Peterdi, J. and R.C. Harris, *Macula densa sensing and signaling mechanisms of renin release*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(7): p. 1093-6.
20. Chen, L., et al., *Stimulation of renin secretion by angiotensin II blockade is G α -dependent*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 986-92.
21. Herichova, I. and K. Szantooova, *Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives*. Endocr Regul, 2013. **47**(1): p. 39-52.
22. Zaika, O., et al., *Direct activation of ENaC by Angiotensin II: recent advances and new insights*. Curr Hypertens Rep, 2013. **15**(1): p. 17-24.
23. Crowley, S.D. and T.M. Coffman, *Recent advances involving the renin-angiotensin system*. Exp Cell Res, 2012. **318**(9): p. 1049-56.
24. Liu, F.Y. and M.G. Cogan, *Role of angiotensin II in glomerulotubular balance*. Am J Physiol, 1990. **259**(1 Pt 2): p. F72-9.
25. Ares, G.R., P.S. Caceres, and P.A. Ortiz, *Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(6): p. F1143-59.
26. Renigunta, A., et al., *The glycolytic enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and enolase interact with the renal epithelial K⁺ channel ROMK2 and regulate its function*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(4): p. 663-72.
27. 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.
28. Gunzel, D. and A.S. Yu, *Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle*. Pflugers Arch, 2009. **458**(1): p. 77-88.
29. Breiderhoff, T., et al., *Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. 14241-6.
30. Jeck, N. and H.W. Seyberth, *Loop disorders: insights derived from defined genotypes*. Nephron Physiol, 2011. **118**(1): p. p7-14.
31. Hebert, S.C., G. Gamba, and M. Kaplan, *The electroneutral Na(+)-(K⁺)-Cl⁻ cotransport family*. Kidney Int, 1996. **49**(6): p. 1638-41.
32. Hebert, S.C., D.B. Mount, and G. Gamba, *Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 580-93.

33. Gagnon, K.B. and E. Delpire, *Physiology of SLC12 transporters: lessons from inherited human genetic mutations and genetically engineered mouse knockouts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **304**(8): p. C693-714.
34. Fremont, O.T. and J.C. Chan, *Understanding Bartter syndrome and Gitelman syndrome*. World J Pediatr, 2012. **8**(1): p. 25-30.
35. Kleta, R. and D. Bockenhauer, *Bartter syndromes and other salt-losing tubulopathies*. Nephron Physiol, 2006. **104**(2): p. p73-80.
36. Haas, M. and B. Forbush, 3rd, *The Na-K-Cl cotransporters*. J Bioenerg Biomembr, 1998. **30**(2): p. 161-72.
37. Xu, J.C., et al., *Molecular cloning and functional expression of the bumetanide-sensitive Na-K-Cl cotransporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2201-5.
38. Gimenez, I., P. Isenring, and B. Forbush, *Spatially distributed alternative splice variants of the renal Na-K-Cl cotransporter exhibit dramatically different affinities for the transported ions*. J Biol Chem, 2002. **277**(11): p. 8767-70.
39. Payne, J.A. and B. Forbush, 3rd, *Alternatively spliced isoforms of the putative renal Na-K-Cl cotransporter are differentially distributed within the rabbit kidney*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4544-8.
40. Richardson, C., et al., *Regulation of the NKCC2 ion cotransporter by SPAK-OSR1-dependent and -independent pathways*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 5): p. 789-800.
41. Mount, D.B., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL I. Molecular characterization and intrarenal localization*. Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F347-58.
42. Castrop, H. and J. Schnermann, *Isoforms of renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2: expression and functional significance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(4): p. F859-66.
43. Gimenez, I. and B. Forbush, *Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26946-51.
44. McCormick, J.A., et al., *A SPAK isoform switch modulates renal salt transport and blood pressure*. Cell Metab, 2011. **14**(3): p. 352-64.
45. Mount, D.B., *Membrane trafficking and the regulation of NKCC2*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(3): p. F606-7.
46. Mutig, K., et al., *Activation of the bumetanide-sensitive Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter (NKCC2) is facilitated by Tamm-Horsfall protein in a chloride-sensitive manner*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30200-10.
47. Mutig, K., et al., *Vasopressin V2 receptor expression along rat, mouse, and human renal epithelia with focus on TAL*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **293**(4): p. F1166-77.
48. Paliege, A., et al., *Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(7): p. F865-74.
49. Saritas, T., et al., *SPAK Differentially Mediates Vasopressin Effects on Sodium Cotransporters*. J Am Soc Nephrol, 2013.
50. Ares, G.R. and P.A. Ortiz, *Constitutive endocytosis and recycling of NKCC2 in rat thick ascending limbs*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **299**(5): p. F1193-202.
51. Ecelbarger, C.A., et al., *Regulation of the abundance of renal sodium transporters and channels by vasopressin*. Exp Neurol, 2001. **171**(2): p. 227-34.

52. Garay, R.P., et al., *Regulation of renal Na-K-Cl cotransporter NKCC2 by humoral natriuretic factors: relevance in hypertension*. Clin Exp Hypertens, 1998. **20**(5-6): p. 675-82.
53. Welker, P., et al., *Renal Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter activity and vasopressin-induced trafficking are lipid raft-dependent*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(3): p. F789-802.
54. Mederle, K., et al., *Loss of WNK3 is compensated for by the WNK1/SPAK axis in the kidney of the mouse*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(9): p. F1198-209.
55. van der Lubbe, N., et al., *Aldosterone does not require angiotensin II to activate NCC through a WNK4-SPAK-dependent pathway*. Pflugers Arch, 2012. **463**(6): p. 853-63.
56. Yang, S.S., et al., *Phosphorylation regulates NCC stability and transporter activity in vivo*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(10): p. 1587-97.
57. Zhou, B., et al., *WNK4 enhances the degradation of NCC through a sortilin-mediated lysosomal pathway*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(1): p. 82-92.
58. Gamba, G., *The natriuretic hormone vasopressin is a new player in the modulation of renal Na⁺-Cl⁻ cotransporter activity*. Kidney Int, 2010. **78**(2): p. 127-9.
59. Reiche, J., et al., *SORLA/SORL1 functionally interacts with SPAK to control renal activation of Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter 2*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(12): p. 3027-37.
60. Gimenez, I. and B. Forbush, *Regulatory phosphorylation sites in the NH₂ terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2)*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(6): p. F1341-5.
61. Mutig, K., et al., *Short-term stimulation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(3): p. F502-9.
62. Richardson, C., et al., *Activation of the thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter by the WNK-regulated kinases SPAK and OSR1*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 5): p. 675-84.
63. Meade, P., et al., *cAMP-dependent activation of the renal-specific Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is mediated by regulation of cotransporter trafficking*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(6): p. F1145-54.
64. Hoorn, E.J., et al., *The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension*. Nat Med, 2011. **17**(10): p. 1304-9.
65. Ares, G.R. and P.A. Ortiz, *Dynamin2, clathrin, and lipid rafts mediate endocytosis of the apical Na/K/2Cl cotransporter NKCC2 in thick ascending limbs*. J Biol Chem, 2012. **287**(45): p. 37824-34.
66. Di Rubbo, S., et al., *The clathrin adaptor complex AP-2 mediates endocytosis of brassinosteroid insensitive1 in Arabidopsis*. Plant Cell, 2013. **25**(8): p. 2986-97.
67. Hunziker, W. and H.J. Geuze, *Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins*. Bioessays, 1996. **18**(5): p. 379-89.
68. Dathe, C., et al., *Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter*. J Biol Chem, 2014.
69. Ortiz, P.A., *cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(3): p. F608-16.
70. Zaarour, N., et al., *Multiple evolutionarily conserved Di-leucine like motifs in the carboxyl terminus control the anterograde trafficking of NKCC2*. J Biol Chem, 2012. **287**(51): p. 42642-53.

71. Paredes, A., et al., *Activity of the renal Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter is reduced by mutagenesis of N-glycosylation sites: role for protein surface charge in Cl⁻ transport.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(5): p. F1094-102.
72. Welker, P., et al., *Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **292**(3): p. R1328-37.
73. Wilson, B.S., et al., *Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(6): p. 2580-92.
74. Abrami, L., et al., *Cross-talk between caveolae and glycosylphosphatidylinositol-rich domains.* J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30729-36.
75. Boerke, A., et al., *Removal of GPI-anchored membrane proteins causes clustering of lipid microdomains in the apical head area of porcine sperm.* Theriogenology, 2013.
76. Zhao, F., et al., *Research advances on flotillins.* Virol J, 2011. **8**: p. 479.
77. Simons, K. and J.L. Sampaio, *Membrane organization and lipid rafts.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(10): p. a004697.
78. Simons, K. and W.L. Vaz, *Model systems, lipid rafts, and cell membranes.* Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004. **33**: p. 269-95.
79. Brown, D.A., *Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals.* Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 430-9.
80. Nichols, B.J., et al., *Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and Golgi complex.* J Cell Biol, 2001. **153**(3): p. 529-41.
81. Carosino, M., G. Procino, and M. Svelto, *Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter type 2 trafficking and activity: the role of interacting proteins.* Biol Cell, 2012. **104**(4): p. 201-12.
82. Smith, C.J. and B.M. Pearse, *Clathrin: anatomy of a coat protein.* Trends Cell Biol, 1999. **9**(9): p. 335-8.
83. Smith, C.J., N. Grigorieff, and B.M. Pearse, *Clathrin coats at 21 A resolution: a cellular assembly designed to recycle multiple membrane receptors.* EMBO J, 1998. **17**(17): p. 4943-53.
84. McMahon, H.T. and E. Boucrot, *Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(8): p. 517-33.
85. Elde, N.C., et al., *Elucidation of clathrin-mediated endocytosis in tetrahymena reveals an evolutionarily convergent recruitment of dynamin.* PLoS Genet, 2005. **1**(5): p. e52.
86. Hasse, S., E.J. Ungewickell, and S. Groos, *Clathrin and clathrin-accessory proteins in rat kidney cortex epithelia.* Histochem Cell Biol, 2006. **126**(2): p. 219-29.
87. Hermey, G., *The Vps10p-domain receptor family.* Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(16): p. 2677-89.
88. Subramanya, A.R. and D.H. Ellison, *Sorting out lysosomal trafficking of the thiazide-sensitive Na-Cl Co-transporter.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(1): p. 7-9.
89. Herrera, M., et al., *Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production.* J Biol Chem, 2009. **284**(3): p. 1454-60.
90. Kim, G.H., et al., *Vasopressin increases Na-K-2Cl cotransporter expression in thick ascending limb of Henle's loop.* Am J Physiol, 1999. **276**(1 Pt 2): p. F96-F103.
91. Hebert, S.C., P.A. Friedman, and T.E. Andreoli, *Effects of antidiuretic hormone on cellular conductive pathways in mouse medullary thick ascending limbs of*

- Henle: I. ADH increases transcellular conductance pathways. *J Membr Biol*, 1984. **80**(3): p. 201-19.
92. Plata, C., et al., *Isoforms of the Na-K-2Cl cotransporter in murine TAL II. Functional characterization and activation by cAMP*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(3 Pt 2): p. F359-66.
 93. Rascher, W., [*Cardiovascular effect of the antidiuretic hormone arginine vasopressin*]. *Klin Wochenschr*, 1985. **63**(19): p. 989-99.
 94. Schmale, H., et al., *The mutant vasopressin gene from diabetes insipidus (Brambleboro) rats is transcribed but the message is not efficiently translated*. *EMBO J*, 1984. **3**(13): p. 3289-93.
 95. Notman, D.D., M.A. Mortek, and A.M. Moses, *Permanent diabetes insipidus following head trauma: observations on ten patients and an approach to diagnosis*. *J Trauma*, 1980. **20**(7): p. 599-602.
 96. Alexander, R.T., H. Dimke, and E. Cordat, *Proximal tubular NHEs: sodium, protons and calcium? Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **305**(3): p. F229-36.
 97. Boerke, A., et al., *Capacitance-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction*. *Theriogenology*, 2008. **70**(8): p. 1188-96.
 98. Dathe, C., et al., *Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(14): p. 9983-97.
 99. Rajendran, L. and K. Simons, *Lipid rafts and membrane dynamics*. *J Cell Sci*, 2005. **118**(Pt 6): p. 1099-102.
 100. Zager, R.A., *Plasma membrane cholesterol: a critical determinant of cellular energetics and tubular resistance to attack*. *Kidney Int*, 2000. **58**(1): p. 193-205.
 101. Gimenez, I., *Molecular mechanisms and regulation of furosemide-sensitive Na-K-Cl cotransporters*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006. **15**(5): p. 517-23.
 102. Rodal, S.K., et al., *Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(4): p. 961-74.
 103. Amlal, H., et al., *Na(+)-K+(NH4+)-2Cl- cotransport in medullary thick ascending limb: control by PKA, PKC, and 20-HETE*. *Am J Physiol*, 1996. **271**(2 Pt 1): p. C455-63.
 104. Wilson, C.M., et al., *The implications of sortilin/vps10p domain receptors in neurological and human diseases*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014. **13**(8): p. 1354-65.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anna-Lena Daigeler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Intrazelluläres Trafficking des nierenspezifischen Natrium-Kalium-2Chlorid-Kotransporters“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Anteilserklärung an etwaig erfolgten Publikationen

Anna-Lena Daigeler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

1. Dathe, C., et al., *Annexin A2 mediates apical trafficking of renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter*. J Biol Chem, 2014. **289**(14): p. 9983-97.

Durchführung von RipFlip-Experimenten an kultivierten TAL-Zellen und Visualisierung am Transmissions-EM

2. Paliege, A., et al., *Group VIA phospholipase A2 is a target for vasopressin signaling in the thick ascending limb*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(7): p. F865-74.

Durchführung von RipFlip-Experimenten an kultivierten TAL-Zellen und Visualisierung am Transmissions-EM

3. Panoulas, V.F., et al., *Pocket-size hand-held cardiac ultrasound as an adjunct to clinical examination in the hands of medical students and junior doctors*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2013. **14**(4): p. 323-30.

Durchführung transthorakaler Echokardiographien und Auswertung des Lerneffekts anhand von Diagnosestellung im Rahmen einer Famulatur

Aktive Kongressbeiträge:

09/2011 **Poster #P258:** *„Renal Na⁺K⁺2Cl⁻-Cotransporter is structurally or functionally associated with Lipid Rafts“*

Daigeler AL, Dathe C, Kahl T, Wilson BS, Bleich M, Bachmann S, Mutig K
(Deutscher Kongress für Nephrologie, Berlin)

11/2011: **Poster #FR-PO1763:** *„Renal Na⁺K⁺2Cl⁻-Cotransporter is structurally or functionally associated with Lipid Rafts“*

Daigeler AL, Dathe C, Kahl T, Wilson BS, Böhlick A, Bleich M, Bachmann S, Mutig K
(Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Portland/USA)

10/2012: **Poster #P050:** *„Constitutive Trafficking of the renal Na⁺K⁺2Cl⁻-Cotransporter in the thick ascending limb of Henle“*

Daigeler AL, Dathe C, Kahl T, Wilson BS, Bleich M, Bachmann S, Mutig K
(Deutscher Kongress für Nephrologie Hamburg)

10/2014: **Poster #P300:** *„NKCC phosphorylation modulates its clathrin-mediated internalization“*

Daigeler AL, Dathe C, Wilson BS, Bachmann S, Mutig K
(Deutscher Kongress für Nephrologie, Berlin)

11/2014: **Poster #FR-PO006:** *„NKCC phosphorylation modulates its clathrin-mediated internalization“*

Daigeler AL, Dathe C, Wilson BS, Bachmann S, Mutig K
(Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia/USA)

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Danksagung

Diese Promotionsarbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen nie möglich gewesen. Ich möchte meiner Familie und meinem Freund danken, die mir uneingeschränkte Unterstützung und zu jedem Zeitpunkt ein offenes Ohr geschenkt haben.

Ebenso hat mich im Rahmen dieser Arbeit ein großartiges Team aus dem Institut für Vegetative Anatomie begleitet und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Hierbei sind vor allem unsere MTAs John Horn, Kerstin Riskowsky und Elisabeth Schindler zu nennen, die mir die vielen Stunden am Elektronenmikroskop und im Labor zu einer unvergesslichen Zeit gemacht und bei inhaltlichen oder technischen Fragen jederzeit weitergeholfen haben.

Dazu haben natürlich auch die anderen Doktoranden Turgay, Tom, Aljona, Christin und all die anderen beigetragen, die mir mit unerschöpflicher Geduld und großer Hilfsbereitschaft zu Freunden geworden sind.

PD Dr. Kerim Mutig hat mich zuerst als Dozent, dann als Betreuer durch mein gesamtes Studium begleitet und hat einen essenziellen Anteil an dieser Arbeit geleistet. In unzähligen Stunden war er stets bemüht, diese Arbeit zu unterstützen und voranzutreiben.

Schließlich möchte ich mich besonders bei Prof. Bachmann bedanken, der mir ermöglicht hat, diese Arbeit selbständig und nach eigenem Ermessen zu gestalten. Durch die Unterstützung von Herrn Bachmann durfte ich bereits früh meine Forschungsergebnisse von internationalem Fachpublikum vorstellen und somit einen ersten Einblick in Forschung mit all den schönen und widrigen Seiten zu erlangen. Dies hat mich bestärkt, auch weiterhin in der Nephrologie Wissenschaft zu betreiben.